

- silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi, *Mycobiology*, 40: 53-58.
- Li, F., Wang, Y.F., Yang, Evans, D.G., Forano, C., Duan, X., 2005. Study on adsorption of glyphosate (N-phosphonomethyl glycine) pesticide on Mg Al-layered double hydroxides in aqueous solution. *J. Hazard Mater.*, 125: 89-95.
- Luan, L.Q., Anh, N.T.N., Tuan, N.X., Xo, D.H., 2017. Study on preparation of LDH nanoparticles immobilize organic salicylate with a potential as a naturally safety fungicide for plants, *Proc. IWNA Phan Thiet*, 217-222.
- Oancea, S. and Oancea, A.V., 2005. Biological evaluation of layered double hydroxide effect on the growth of the corn plants. *Lucrari Stiintifice*, 53: 49-51.
- Othman, M.R., Helwania, Z., Martunusa and Fernando W. J. N., 2009. Synthetic hydrotalcites from different routes and their application as catalysts and gas adsorbents: a review. *Appl. Organomet.*, 23 (9): 335-346.
- Prithiviraj, B., Singh, U. P., Manickam, M. and Ray A.B., 1997. Antifungal activity of anacardic acid, a naturally occurring derivative of salicylic acid, *Can. J. Bot.*, 75: 207-211.
- Wodnicka, A., Huzar, E., Krawczyk, M., Kwiecień, H., 2017. Synthesis and antifungal activity of new salicylic acid derivatives. *Pol. J. Chem. Technol.*, 19: 143-148.

Study on the antifungal efficiency of LDH microparticles immobilized salicylate against *Rhizoctonia solani* causing collar root rot disease on *Brassica integrifolia*

Le Quang Luan, Tran Le Truc Ha, Nguyen Xuan Tuan

Abstract

In this study, LDH (Layered double hydroxides) microparticles immobilized salicylate (SA) at various concentrations extracted from *Salix babylonica* was used as a natural biological fungicide for evaluating the *in vitro* inhibited efficiency on the growth of *Rhizoctonia solani* and the *in vivo* effect for treating the collar root rot disease (Rhizoctonia disease) caused by *R. solani* fungus on *Brassica integrifolia* in greenhouse. The results showed that in PGA medium, the growth of *R. solani* was completely inhibited by the addition of 20 mg/mL LDH immobilized SA (LDH/SA) microparticles after cultivation of 40 hours. The results in a greenhouse also showed that the treatment of 10 mg/mL SA/LDH microparticles reduced the disease incidence into 4.4% from 80% after 12 treating days. The SA/LDH microparticles has the potential to apply as a natural biological fungicide with safety and high efficiency for treating the Rhizoctonia disease in *Brassica integrifolia* in particular and in leafy vegetables in general.

Keywords: Layered double hydroxides (LDH), salicylate (SA), *Rhizoctonia solani*, collar root rot disease, *Brassica integrifolia*

Ngày nhận bài: 28/10/2020

Ngày phản biện: 7/11/2020

Người phản biện: TS. Đoàn Thị Thanh

Ngày duyệt đăng: 25/11/2020

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT EXOPOLYSACCHARIDE TỪ CÁC THỰC PHẨM LÊN MEN

Nguyễn Phú Thọ^{1,2}, Nguyễn Thị Tố Uyên³,
Nguyễn Thị Thanh Xuân², Hoàng Quốc Khánh⁴, Nguyễn Hữu Thanh²

TÓM TẮT

Exopolysaccharide được sản xuất từ vi khuẩn lactic là các polymer tự nhiên nhận được nhiều sự chú ý của các nhà nghiên cứu vì các lợi ích mà nó mang lại cho hệ vi sinh vật đường ruột và tăng cường khả năng miễn dịch ở động vật. Để phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất exopolysaccharide từ các sản phẩm

¹ Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Khoa Nông nghiệp - Tài nguyên thiên nhiên, Đại học An Giang

³ Trung tâm Ứng dụng tiến bộ Khoa học và Công nghệ Cần Thơ (CASTA)

⁴ Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

lên men truyền thống, sáu mẫu sản phẩm lên men truyền thống đã được thu thập tại An Giang, Việt Nam. Kết quả đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất exopolysaccharide. Phân tích đa dạng di truyền cho thấy hệ số tương đồng dao động từ 0,58 đến 1 và các chủng vi khuẩn được phân thành 3 nhóm chính, dựa vào độ khác biệt về hệ gen. Trong số các chủng phân lập được, chủng L6 có khả năng sản xuất EPS cao nhất với hàm lượng đạt 5,72 g/L môi trường nuôi. Định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA và so sánh trình tự tương đồng với ngân hàng gen trên NCBI, kết quả cho thấy chủng L6 tương đồng 99,33% với chủng *Lactobacillus plantarum* strain MG26. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy tiềm năng sử dụng chủng vi khuẩn phân lập được cho việc khai thác sản xuất exopolysaccharide ứng dụng trong chăn nuôi và thủy sản.

Từ khóa: Exopolysaccharide, vi khuẩn lactic, *Lactobacillus plantarum*, tăng cường hệ miễn dịch

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Exopolysaccharide (EPS) là các polymer tự nhiên có nhiều chức năng sinh học quan trọng và là một trong những thành phần chính tham gia cấu tạo nên vách tế bào của vi sinh vật (Badel-Berchoux *et al.*, 2011). EPS có thể được sản xuất bởi thực vật, tảo, nấm và vi khuẩn bao gồm cả vi khuẩn lactic (Dilna *et al.*, 2015).

Vi khuẩn lactic có vai trò quan trọng trong công nghiệp sản xuất các sản phẩm lên men, probiotic, và sản xuất EPS do chúng không gây nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe của người và vật nuôi (Surayot *et al.*, 2014). Trong những năm gần đây, EPS do vi khuẩn lactic sản xuất đã nhận được nhiều sự quan tâm tích cực; chủ yếu là vì chúng có lợi cho sức khỏe cho người, vật nuôi và thủy sản. EPS đã được chứng minh là có các tính chất quan trọng như chống oxy hóa, giảm cholesterol, kháng u, kháng virus và tăng cường hoạt động điều hòa miễn dịch (Madhuri *et al.*, 2014). Ngoài ra, nghiên cứu cũng đã chứng minh tiềm năng prebiotic của EPS được sản xuất từ vi khuẩn lactic như kích thích tăng mật độ của vi khuẩn *Bifidobacteria* (Hongpattarakere *et al.*, 2012).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất nhiều EPS thì có thể chịu đựng tốt hơn các điều kiện môi trường cực đoan như nhiệt độ cao, pH thấp, thẩm thấu cao (Stack *et al.*, 2009) và sống sót qua đường tiêu hóa tốt hơn so với các chủng sản xuất ít hoặc không sản xuất EPS. Do đó, việc lựa chọn các chủng giống vi khuẩn lactic ban đầu có khả năng sản xuất EPS cao sẽ mang lại một số lợi thế đáng kể so với chủng sản xuất EPS thấp từ việc khai thác EPS cũng như khả năng sản xuất sinh khối phục vụ cho công nghiệp lên men, chăn nuôi, thủy sản... Ngoài ra, vi khuẩn lactic được cho là an toàn để có thể sử dụng cho công nghiệp thực phẩm, dược phẩm cho người và động vật.

Hầu hết vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất EPS có thể được phân lập từ các thực phẩm lên men khác nhau như pho mát, sữa chua, kefir và các sản phẩm

sữa lên men khác (Patil *et al.*, 2015). Hiện nay, các kiến thức liên quan đến việc phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất EPS từ các sản phẩm lên men tại Việt Nam là rất ít. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện để phân lập vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất EPS cao từ các sản phẩm lên men nhằm ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và chế phẩm sinh học cho vật nuôi và thủy sản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu để phân lập các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất EPS gồm củ kiệu muối chua (ký hiệu: CK), nước nho lên men (ký hiệu: L), dưa cải muối chua (ký hiệu: DC), rau muống muối chua (ký hiệu: RM), cơm mẻ (ký hiệu: CC) và nem chua (ký hiệu: N) được thu thập từ chợ Long Xuyên, An Giang mang về phòng thí nghiệm để phân lập và đánh giá đặc tính sinh lý, sinh hóa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn Lactic

Cân 10 g mỗi mẫu thực phẩm lên men cho vào các bình tam giác chứa 90 ml môi trường MRS lỏng đã thanh trùng, ủ kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ để tăng sinh mẫu. Mẫu sau khi tăng sinh được pha loãng ở nồng độ 10^{-5} , trải 0,1 mL trên môi trường thạch MRS (yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1%, D-glucose 2%, K_2HPO_4 0,2%, $MgSO_4$ 0,02%, $MnSO_4$ 0,004%, Tween 80 0,1%, $C_2H_3NaO_2$ 0,5%, bổ sung $CaCO_3$ với nồng độ là 5 g/L). Ủ ở 37°C trong 36 giờ. Chọn các khuẩn lạc làm tan $CaCO_3$ (tạo vòng trong suốt quanh khuẩn lạc do $CaCO_3$ bị phân giải bởi axit lactic) để cấy truyền nhiều lần cho đến khi có được dòng vi khuẩn thuần (Nongpanga Khunajakr *et al.*, 2008). Tất cả các chủng thuần được bảo quản ở -20 °C trong môi trường phân lập tương ứng và bổ sung thêm 30% (thể tích) glycerol làm chất bảo vệ tế bào. Tiến hành xác định các đặc điểm hình thái và sinh hóa (nhuộm Gram và hoạt tính catalase) của các dòng vi khuẩn phân lập được.

2.2.2. Tách chiết DNA, RAPD - PCR và phân nhóm đa dạng di truyền

Các dòng vi khuẩn lactic phân lập được nuôi qua đêm trong 5 ml môi trường MRS. DNA được phân lập theo phương pháp phenol - chloroform được mô tả bởi Giraffa và cộng tác viên (2000). Phản ứng khuếch đại RAPD-PCR được thực hiện trong thể tích phản ứng 50 µl chứa 25 µL Master Mix 2X; 18 µL PCR water; 2 µL DNA khuôn và 5 µL mỗi M13 (10 pmol/µL). Mẫu đối chứng âm DC (-) sử dụng nước thay cho DNA khuôn. Mỗi M13 được dùng để thực hiện phản ứng RAPD-PCR có trình tự 5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'. Chu trình nhiệt RAPD-PCR được thực hiện trong 35 chu kỳ ở 94°C trong 1 phút, 40°C trong 20 giây, 72°C trong 2 phút (Andrighetto *et al.*, 2001). Các sản phẩm khuếch đại được phân tách bằng cách điện di trên gel agarose 2% (w/v) trong đệm TAE 1X. Xây dựng biểu đồ quan hệ di truyền và phân tích nhóm theo phương pháp toán học UPGMA được thực hiện bằng phần mềm NTSYS pc 2.1.

2.2.3. Sàng lọc khả năng sinh EPS và định danh các dòng vi khuẩn

Để đánh giá khả năng sản xuất EPS, các chủng đã được làm thuần được cấy vào 100 mL môi trường MRS lỏng, ủ ở 37°C trong 36 giờ và lắc với tốc độ 150 vòng/phút, các mẫu sau khi nuôi cấy được mang đi phân tích hàm lượng EPS. Dòng vi khuẩn sản xuất EPS cao nhất được định danh dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA với cặp mồi được sử dụng là 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') và 1492r (5'GGTTACCTTGTACGACTT 3') (Masumizu *et al.*, 2019). Sử dụng phần mềm Nucleotide BLAST để so sánh mức độ tương đồng của chuỗi trình tự vùng 16S rRNA với dữ liệu trên ngân hàng gene của NCBI (National Center for Biotechnology Information) để xác định tên loài của chủng vi khuẩn.

2.2.4. Ly trích và xác định EPS

EPS ly trích từ huyền phù tế bào được thu hoạch tại thời điểm 36 giờ sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C theo phương pháp được mô tả bởi Salazar và cộng tác viên (2009); Nguyen và cộng tác viên (2014). Tổng EPS thô được thu hoạch bằng cách trộn 100 mL dịch sau nuôi cấy với một lượng NaOH để đạt nồng độ 2M và được khuấy nhẹ qua đêm ở nhiệt độ phòng (25°C). Sau đó, ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ xác vi khuẩn và lấy dịch trong phía trên. EPS thô được kết tủa bằng ethanol 96% (v/v) lạnh. Quá trình kết tủa được thực hiện ở 4°C trong 24 giờ. EPS kết tủa trong cồn được thu

hoạch bằng cách ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút. Cuối cùng, EPS thô được sấy khô ở nhiệt độ là 55°C cho đến khối lượng không đổi. Cân khối lượng EPS thu được và nhân với 100 để tính khối lượng EPS (g/L) trong một lít môi trường. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01 đến tháng 08 năm 2020 tại Trung tâm Ứng dụng tiến bộ Khoa học và Công nghệ Cần Thơ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được

Các chủng vi khuẩn lactic sau khi phân lập được xác định các đặc điểm sinh lý và sinh hóa theo mô tả của Kandler và Weiss (1986). Từ 6 loại thực phẩm lên men ban đầu phân lập được 19 chủng vi khuẩn Lactic, đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn này được trình bày ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy các chủng vi khuẩn lactic phân lập được đều là vi khuẩn Gram dương do bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm crystal violet. Trong khi đó, kết quả thử nghiệm catalase đều âm tính. Ngoài ra, quan sát hình thái khuẩn lạc sau 36 giờ nuôi cấy trên môi trường MRS cho thấy các khuẩn lạc đều có màu trắng sữa hoặc trắng ngà, tròn, bóng, lồi, bìa nguyên, tế bào có hình que thẳng hoặc cong, dài hoặc ngắn.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái, sinh hóa của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ thực phẩm lên men

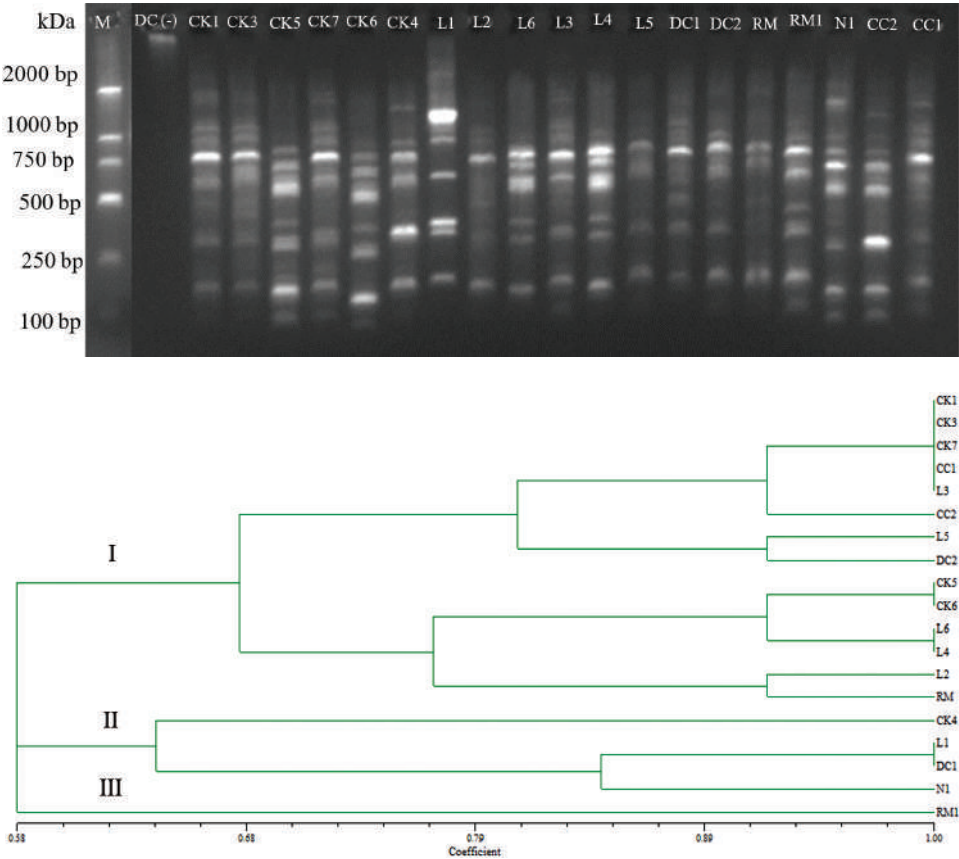
Chủng vi khuẩn	Gram	Hình dạng tế bào	Thử nghiệm catalase
CK1, CK3, CK4, CK5, L1, L2, L3, L5, L6, DC2, RM, RM1, CC1, CC2	+	Que ngắn	-
CK6, CK7, L4, DC1	+	Que dài	-
N1	+	Cầu	-

Các chủng vi khuẩn lactic phân lập được đều có đặc điểm điển hình của một vi khuẩn lactic như đã được mô tả bởi các nghiên cứu trước đó của Mai Đàm Linh và cộng tác viên (2008); Huỳnh Ngọc Tâm và cộng tác viên (2016). Marroki và cộng tác viên (2011) khi phân lập các dòng vi khuẩn Lactic trên sữa dê cũng có các đặc điểm hình thái tương tự. Như vậy, các chủng vi khuẩn mới phân lập được đều thuộc chi *Lactobacillus*.

3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn lactic phân lập được

Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được tách chiết thu nhận DNA tổng số, sau đó thực hiện kỹ

thuật RAPD-PCR và phân tích sự đa dạng di truyền qua cây phát sinh loài được vẽ/dựng bằng phần mềm NTSyspc 2.1 (Hình 1).



Hình 1. Cây phát sinh loài của các dòng vi khuẩn lactic phân lập được.

Cây phân loài được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard và thuật toán UPGMA. Từ kết quả phân loài cho thấy 19 dòng vi khuẩn này được phân ra làm 3 nhóm chính với hệ số tương đồng nằm trong khoảng từ 0,58 đến 1.

Nhóm I bao gồm 14 dòng vi khuẩn, trong đó có 5 dòng được phân lập từ củ kiệu muối chua (CK1, CK3, CK5, CK6, CK7), 5 dòng được phân lập từ nước nho lên men (L2, L3, L4, L5, L6), 2 dòng có nguồn gốc từ cơm mẻ (CC1, CC2), 1 dòng từ dưa cải muối chua (DC2) và 1 dòng từ rau muống muối chua (RM). Trong nhóm này, các chủng phân lập CK1, CK3, CK7, CC1 và L3 có quan hệ rất chặt về mặt di truyền, đạt 100%. Tương tự, dòng CK5 và CK6, cũng như dòng L4 và L6 có mức độ tương đồng 100%.

Nhóm II có 4 dòng vi khuẩn phân lập được từ bốn nguồn khác nhau củ kiệu muối chua (CK4), nước nho lên men (L1), dưa cải muối chua (DC1) và nem chua (N1). Trong đó dòng L1 và DC1 có mức độ tương đồng cao nhất (100%).

Nhóm III chỉ có duy nhất dòng RM1 được phân lập từ rau muống muối chua.

Từ kết quả phân tích này cho thấy các chủng vi khuẩn dù được phân lập từ cùng một mẫu nhưng có thể xuất hiện ở các nhóm phân loài khác nhau. Điều này thể hiện sự đa dạng trong phân loài của các dòng vi khuẩn lactic trong các sản phẩm lên men.

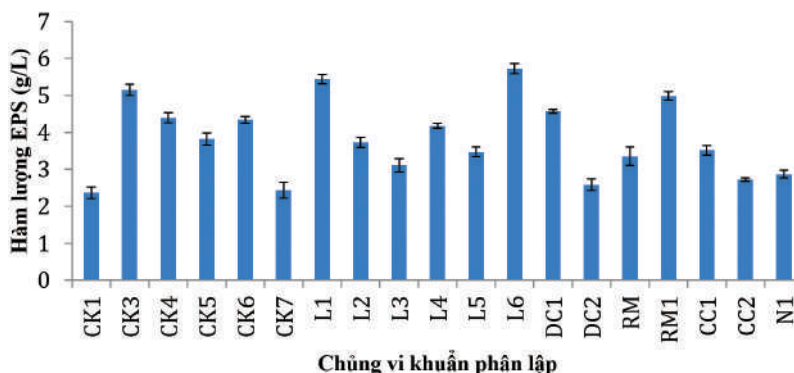
3.3. Khả năng sản xuất EPS của các chủng vi khuẩn phân lập được

Để lựa chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất EPS cao, nghiên cứu đã đánh giá khả năng sản xuất EPS của các dòng phân lập được trong môi trường MRS. Khả năng sản xuất EPS của các dòng vi khuẩn được thể hiện ở hình 2. Trong cùng một điều kiện, hầu hết các chủng phân lập đều có khả năng sản xuất EPS. Năng suất EPS dao động từ 3,54 đến 5,72 g/L. Tuy nhiên, chủng L6 cho thấy khả năng sản xuất EPS cao nhất (5,72 g/L).

So với các công bố được trước đây (Jiang and Yang, 2018) về khả năng sản xuất EPS của các dòng

vi khuẩn lactic, năng suất EPS được tổng hợp bởi vi khuẩn lactic chỉ đạt từ vài chục đến vài trăm mg/L. Chỉ có một số ít dòng có khả năng sinh sản xuất EPS cao đến hàng ngàn mg/L như *L. casei*

KL14KX774469 hay *L. rhamnosus* C83 (Gamar *et al.*, 2003). Kết quả nghiên cứu này cho thấy năng suất EPS của các chủng vi khuẩn CK3, L6 và L1 đạt được khá cao, hơn 5000 mg/L.



Hình 2. Hàm lượng exopolysaccharide được tổng hợp bởi các dòng vi khuẩn lactic mới phân lập được

3.4. Định danh chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất EPS cao

Với khả năng sản xuất EPS cao nhất, chủng L6 được được giải trình tự gene bằng phản ứng PCR với cặp mồi 1492R và 27F khuếch đại vùng gen 16S rRNA dài 1.194 nucleotide. Kết quả so sánh trình tự tương đồng bằng công cụ Nucleotide BLAST tại <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> cho thấy trình tự gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn L6 tương đồng 99,33% với trình tự gen của *L. plantarum* strain MG26. Do đó, chúng tôi chỉ định dòng L6 phân lập là dòng *L. plantarum* VAL6.

Lactobacillus là chi chiếm ưu thế nhất trong nhóm LAB (Elagöz *et al.*, 1996). Trong số các loài thuộc *Lactobacillus*, *L. plantarum* là chủng linh hoạt nhất với các đặc tính hữu ích và thường có trong nhiều sản phẩm thực phẩm lên men (Guidone *et al.*, 2013). Ngoài ra, *L. plantarum* còn được sử dụng rộng rãi trong lên men công nghiệp; được công nhận và đảm bảo các tiêu chuẩn về an toàn (Ricci *et al.*, 2017). Kết quả nghiên cứu này đã phân lập thành công chủng *L. plantarum* VAL6 sản xuất EPS cao có thể được sử dụng như một chủng giống với đặc tính mới có lợi cho việc ứng dụng trong sản xuất dược phẩm, chăn nuôi, thủy sản và môi trường.

IV. KẾT LUẬN

Từ 6 mẫu thực phẩm lên men truyền thống được thu thập tại An Giang (Việt Nam) đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn lactic có hệ số di truyền khác biệt từ 0.58 đến 1 được phân chia thành 3 nhóm. Dòng L6 có khả năng sản xuất EPS cao nhất (5,72 g/L). Kết quả định danh phân tử cho thấy dòng L6 tương đồng 99,33% với *L. plantarum* strain MG26 và được

bổ sung vào bộ sưu tập với tên gọi là *L. plantarum* VAL6. Chủng *L. plantarum* VAL6 có tiềm năng sử dụng cho các mục đích khác nhau như khai thác sản xuất EPS; sử dụng làm chủng giống trong lên men công nghiệp; hay sử dụng như một vi khuẩn probiotic trong chăn nuôi và thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Mai Đàm Linh, Đỗ Minh Phương, Phạm Thị Tuyết, Kiều Hữu Ảnh và Nguyễn Thị Giang, 2008. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn thành phố Hà Nội. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, (24): 221-226.
- Huỳnh Ngọc Tâm, Trần Thanh Trúc, Nguyễn Văn Mười, và Hà Thanh Toàn, 2016. Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn từ dưa lê non (*Cucumis melo* L.) muối chua. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Nông nghiệp - Thủy sản - Công nghệ Sinh học*, 18. doi:10.22144/ctu.jsci.2016.017.
- Andrighetto, C., Zampese, L., and Lombardi, A., 2001. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33 (1): 26-30. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00939.x.
- Badel-Berchoux, Stéphanie, Bernardi, T., and Michaud, Philippe, 2011. New perspective for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 29: 54-66. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.011.
- Dilna, Sasidharan Vasanthakumari, Surya, Harikumar, Aswathy, Ravindran Girija, Varsha, Kontham Kulangara, Sakthikumar, Dasappan Nair, Pandey, Ashok, and Nampoothiri, Kesavan Madhavan,

2015. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT - Food Science and Technology*, 64 (2): 1179-1186. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040.
- Elagöz, Aram, Abdi, Akila, Hubert, Jean-Claude, and Kammerer, Benoit**, 1996. Structure and organisation of the pyrimidine biosynthesis pathway genes in *Lactobacillus plantarum*: a PCR strategy for sequencing without cloning. *Gene*, 182 (1): 37-43. doi:https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00461-1.
- Gamar, L., Blondeau, K., and Simonet, J. -M.**, 2003. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of applied microbiology*, 83: 281-287. doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00228.x
- Giraffa, Giorgio, Rossetti, Lia, and Neviani, Erasmo**, 2000. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of microbiological methods*, 42: 175-184. doi:10.1016/S0167-7012(00)00172-X.
- Guidone, Angela, Zotta, Teresa, Ross, Reynolds, Stanton, Catherine, Rea, Mary, Parente, Eugenio, and Ricciardi, Annamaria**, 2013. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A multivariate screening study. *Food Science and Technology*, 56. doi:10.1016/j.lwt.2013.10.036.
- Hongpattarakere, Tipparat, Cherntong, Nantina, Wichienchot, Santad, Kolida, Sofia, and Rastall, Robert A.**, 2012. In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87 (1): 846-852. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.085.
- Jiang, Yunyun, and Yang, Zhennai**, 2018. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, 47: 229-240. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.060.
- Kandler, O. and Weiss, N.**, 1986. *Genus Lactobacillus Beijerinck 1901*, 212. AL. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2: 1209-1234.
- Madhuri, K., and Vidya Prabhakar, Kodali**, 2014. Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 30: 1401-1410. doi:10.13005/ojc/300362.
- Marroki, Ahmed, Zúñiga Cabrera, Manuel, Mebrouk, Kihal, and Pérez Martínez, Gaspar**, 2011. Characterization of lactobacillus from algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 158-171.
- Masumizu, Y., Zhou, B., Kober, Akmh, Islam, M. A., Iida, H., Ikeda-Ohtsubo, W., and Kitazawa, H.**, 2019. Isolation and Immunocharacterization of *Lactobacillus salivarius* from the Intestine of Wakame-Fed Pigs to Develop Novel "Immunosynbiotics". *Microorganisms*, 7 (6): doi:10.3390/microorganisms7060167.
- Nguyen, Huu Thanh, Razafindralambo, Hary, Blecker, Christophe, N'Yapo, Charles, Thonart, Philippe, and Delvigne, Frank**, 2014. Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying. *Biochemical Engineering Journal*, 88: 85-94. doi:10.1016/j.bej.2014.04.005.
- Nongpanga Khunajakr, Aporn Wongwicharn, Duangtip Moonmangmee and Sukon Tantipaiboonvut**, 2008. Screening and identification of lactic acid bacteria producing antimicrobial compounds from pig gastrointestinal tracts. *KMITL Sci. Tech. J.*, 8 (1): 8-17.
- Patil, Prasad, Wadehra, Akanksha, Munjal, Kanchan, and Behare, Pradip**, 2015. Isolation of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria from dairy products. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 34. doi:10.18805/ajdfr.v34i4.6878.
- Ricci, Antonia, Allende, Ana, Bolton, Declan, Chemaly, Marianne, Davies, Robert, Girones, Rosina, Fernández Escámez and Pablo Salvador**, 2017. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. *EFSA Journal*, 15 (3). doi:10.2903/j.efsa.2017.4663.
- Salazar, Nuria, Ruas-Madiedo, Patricia, Kolida, Sofia, Collins, Michelle, Rastall, Robert, Gibson, Glenn, and de los Reyes-Gavilán, Clara G.**, 2009. Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *International journal of food microbiology*, 135 (3): 260-267. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.017.
- Stack, Helena, Kearney, Niamh, Stanton, Catherine, Fitzgerald, Gerald, and Ross, R.**, 2009. Association of Beta-Glucan Endogenous Production with Increased Stress Tolerance of Intestinal Lactobacilli. *Applied and environmental microbiology*, 76: 500-507. doi:10.1128/AEM.01524-09.
- Surayot, Utoomporn, Wang, Jianguo, Seesuriyachan, Phisit, Kuntiya, Ampin, Tabarsa, Mehdi, Lee, Yongjin, You, Sangguan**, 2014. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation. *International journal of biological macromolecules*, 68. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.005.

Screening and identification of lactic acid bacteria producing exopolysaccharides from fermented food

Nguyen Phu Tho, Nguyen Thi To Quyen, Nguyen Thi Thanh Xuan,
Hoang Quoc Khanh, Nguyen Huu Thanh

Abstract

Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria are natural polymers that are of great interest to researchers because of its benefits, such as stimulating beneficial gut microbiota and enhancing immunity in animals. To isolate and select strains of lactic acid bacteria capable of producing exopolysaccharides from traditional fermentation products, six samples of traditional fermented products were collected in An Giang, Viet Nam. 19 strains of lactic acid bacteria which were capable of producing exopolysaccharides were isolated. Among isolated strains, the strain L6 showed the highest ability to produce EPS with a yield of 5,72 g/L of the culture medium. The results of molecular identification based on 16S rRNA sequencing analysis and compared with other 16S rRNA gene sequences in GenBank by using the NCBI Basic Local Alignment Search Tools, nucleotide (BLASTn) program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verified that L6 strain showed 99.33% similarity to *L. plantarum* strain MG26. These results suggest the potential of using this strain to exploit exopolysaccharide production for applications in livestock and aquaculture.

Keywords: Exopolysaccharides, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, immuno stimulation

Ngày nhận bài: 20/10/2020

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Giang

Ngày phản biện: 06/11/2020

Ngày duyệt đăng: 25/11/2020

ĐẶC ĐIỂM ĐẤT TRỒNG BẠC HÀ DẠI VÙNG CAO NGUYÊN ĐÁ ĐỒNG VĂN - TỈNH HÀ GIANG

Lê Thị Mỹ Hào¹, Phạm Đức Thụ¹, Hoàng Trọng Quý¹, Phạm Ngọc Sơn¹

TÓM TẮT

Cây bạc hà dại (*Elsholtzia cypriani*) tại vùng cao nguyên đá Đồng Văn thường mọc trên đất trồng cây hàng năm, thuộc các loại đất: Đất nâu đỏ trên đá macma bazơ và trung tính (Fk); đất đỏ nâu trên đá vôi (Fn); đất nâu vàng trên đá vôi (Fv); đất đỏ vàng trên đá biến chất (Fj); đất đỏ vàng trên đá sét (Fs); đất vàng nhạt trên đá cát (Fq). Nhìn chung, trên bề mặt của các loại đất này có khá nhiều đá lộ đầu bị phong hóa mạnh; trong phẫu diện đất xuất hiện nhiều đá mảnh, sỏi sạn. Tính chất vật lý và hóa học đặc trưng của các loại đất này phù hợp với yêu cầu và đặc tính sinh thái của cây bạc hà dại. Hầu hết đất tầng mặt có hàm lượng mùn khá; đất khá ẩm (độ ẩm từ 15 - 30%). Dung trọng đất trung bình (từ 1,21 - 1,39 g/cm³), độ xốp trung bình (từ 47,58 - 51,98%), kết cấu viên hạt,ơi xốp, thành phần cơ giới biến động từ nhẹ đến trung bình và nặng. Đất có phản ứng chua đến gần trung tính (pH KCl từ 4,0 - 6,0). Độ ẩm tổng số tầng mặt khá (từ 0,11 - 0,17%N). Lân tổng số đạt trung bình đến khá (từ 0,4 - 0,19% P₂O₅), đất nghèo lân dễ tiêu (thường < 5 mg/100 g đất), ngoại trừ tầng mặt trên đất Fk, Fn, Fv có lân dễ tiêu ở mức trung bình. Kali tổng số và kali dễ tiêu ở mức nghèo đến trung bình (tầng mặt đạt mức trung bình). Tổng cation hòa tan thấp, ngoại trừ trong đất Fv, Fn ở mức cao và có lượng Ca²⁺ cao. Dung tích hấp thu của các loại đất ở mức trung bình (trên 10 meq/100g đất), ngoại trừ trong đất Fq ở mức thấp.

Từ khóa: Cao nguyên đá Đồng Văn, đặc điểm đất, đất trồng bạc hà dại

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây bạc hà dại chỉ phân bố tại vùng biên giới Việt - Trung (Phạm Hồng Thái, 2008), nằm trong 146 cây nguồn mật của Việt Nam (Phùng Hữu Chính và Vũ Văn Luyện, 1999). Bản thân cây bạc hà với tinh dầu (Aetheroleum Menthae) chứng cất được xếp vào Dược điển Việt Nam (Đỗ Tất Lợi, 2006).

Cây bạc hà tại cao nguyên đá Đồng Văn là cây cỏ dại, thân thảo, chi kinh giới *Elsholtziae*, họ hoa môi *Lamiaceae* và tên loài *Elsholtzia cypriani* (Pavol, Wu et Chow, 1974), tên tiếng Anh *Elsholtzia grass*, tên tiếng Việt là *Bạc hà dại*. Bạc hà dại mọc hoàn toàn tự nhiên trên đất nương rẫy, ở những nơi có độ cao từ 1.000 - 1.500 m so với mặt nước biển; cây tự nảy

¹ Viện Thổ nhưỡng Nông hóa