

The strain LĐ15 produced IAA, siderophore and solubilized phosphate. The strain LĐ18 produced IAA, siderophore and exhibited antifungal *Phytophthora capsici* activity. Based on the analysis of 16S rRNA nucleotide sequence of strain LĐ18 by BLAST programme, strain LĐ18 had closely relationship with *Bacillus sonorensis* SRCM 101395, therefore named *Bacillus sonorensis* LĐ18.

**Keywords:** Black pepper (*Piper nigrum* L.), endophytic bacteria, *Phytophthora capsici*, IAA, siderophore, *Bacillus* sp.

Ngày nhận bài: 16/7/2018

Người phản biện: TS. Trần Thị Huệ

Ngày phản biện: 24/7/2018

Ngày duyệt đăng: 18/9/2018

## KHẢO SÁT VÀ ĐỊNH TÊN VI KHUẨN *Lactobacillus* sp. CÓ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC TỪ MỘT SỐ THỰC PHẨM LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

Nguyễn Thị Lâm Đoàn<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Bước đầu nghiên cứu xác định một số đặc tính sinh lý, sinh hóa của 40 chủng vi khuẩn lactic có hình dạng tế bào trực khuẩn được phân lập từ thực phẩm lên men và sơ bộ phân loại 7 chủng thuộc chi *Carnobacterium* và 33 chủng thuộc chi *Lactobacillus*. Các vi khuẩn *Lactobacillus* sp. hay được sử dụng trong nhiều sản phẩm probiotic, nghiên cứu này đã tuyển chọn vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có một số đặc tính probiotic. Kết quả nghiên cứu đã chọn được chủng *Lactobacillus* sp. D5.5 có triển vọng probiotic như có khả năng kháng được môi trường acid trong dạ dày người pH2, pH3; Khả năng chịu được muối mật cao sau 4 h; Đối kháng vi khuẩn gây bệnh *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium và *Escherichia coli*; Kháng 04 chất kháng sinh Ampicillin, Penicillin, Chloramphenicol và Gentamycin, sinh cả 02 enzyme ngoại bào amylase và protease với kích thước vòng phân giải cơ chất 11 - 16 mm. Bằng phương pháp phân tích trình tự gene *pheS* đã xác định chủng D5.5 là loài *Lactobacillus fermentum*. Chủng này có thể ứng dụng tạo giống khởi động cho thực phẩm lên men có đặc tính probiotic hoặc tiếp tục được nghiên cứu sâu hơn để tạo chế phẩm probiotic cho người.

**Từ khóa:** *Lactobacillus*, probiotic, thực phẩm lên men, PCR, gene *pheS*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic (LAB) đóng vai trò quan trọng trong cuộc sống của chúng ta, chúng tạo ra các thực phẩm lên men, bảo quản thực phẩm khỏi bị hư hỏng và có những đặc tính probiotic tốt cho sức khỏe của vật chủ (Ramos *et al.*, 2013). Nhiều nghiên cứu đã tuyển chọn các chủng có đặc tính probiotic từ LAB được công bố trên các tạp chí khoa học trong và ngoài nước (Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh, 2011; Ramos *et al.*, 2013); trong đó, *Lactobacillus* là một chi của LAB được sử dụng phổ biến tạo chế phẩm probiotic vì tính an toàn của chúng. Chúng phát huy tác dụng có lợi bởi tăng cường khả năng miễn dịch của vật chủ, khả năng bám dính tốt, ngăn ngừa ung thư, giảm cholesterol, hoạt tính kháng khuẩn cao chống lại tác nhân gây bệnh và cân bằng thành phần vi sinh vật ruột (Zhang *et al.*, 2015). Giraffa và cộng tác viên (2010) đã chỉ ra nhiều chủng thuộc chi *Lactobacillus* có đặc tính probiotic như *Lb. acidophilus* LA1, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. plantarum*

Lp01, *Lb. fermentum* RC14 đã được sử dụng rộng rãi và sản xuất ở quy mô công nghiệp.

*Lactobacillus* được tìm thấy nhiều và chúng chiếm ưu thế trong các thực phẩm lên men truyền thống (Nguyen *et al.*, 2013, Ramos *et al.*, 2013). Tuy nhiên, chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic có mặt trong các loại thực phẩm lên men truyền thống vẫn chưa được biết đến nhiều. Các nghiên cứu chủ yếu mới nghiên cứu đặc tính probiotic của nhóm vi khuẩn lactic từ ruột gà và ứng dụng cho gà (Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015; Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2018). Do vậy, thực phẩm lên men truyền thống đặc biệt ở Việt Nam như Tôm chua, dưa muối, thịt chua... sẽ là các nguồn để tìm kiếm các chủng mới với các đặc tính probiotic mong muốn. Mục đích của nghiên cứu này kiểm tra một số đặc tính probiotic thông qua các thí nghiệm *in vitro* như khả năng chịu được acid và muối mật giống trong đường tiêu hóa của người, đối kháng các vi khuẩn gây bệnh,

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

kháng chất kháng sinh, và sinh một số enzyme ngoại bào từ các chủng thuộc chi *Lactobacillus* được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống Việt Nam. Chủng tuyển chọn sẽ được định tên dựa vào trình tự gene *pheS* một trong những gen tiềm năng trong xác định mối quan hệ phát sinh loài của vi khuẩn lactic (Nguyen *et al.*, 2013). Chúng là cơ sở để tạo giống khởi động cho sản xuất thực phẩm lên men có đặc tính probiotic hoặc tạo chế phẩm probiotic cho người.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và môi trường nuôi cấy

#### 2.1.1. Vật liệu

40 chủng vi khuẩn lactic (Gram +, tế bào có dạng trực khuẩn, catalase âm tính, hô hấp tùy tiện) phân lập từ một số thực phẩm lên men truyền thống như tôm chua (15 chủng ký hiệu là T1. và T2.), dưa muối (15 chủng ký hiệu D4. và D5.), thịt chua (10 chủng ký hiệu M8. và M9.) được cung cấp từ phòng thí nghiệm trung tâm - Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các vi khuẩn kiểm định gồm *Listeria monocytogenes*, *E. coli* ATCC 25922 và *S. Typhimurium* ATCC 13311 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### 2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường MRS dùng để nuôi cấy và hoạt hóa các chủng vi khuẩn lactic, môi trường LB nuôi cấy các vi khuẩn kiểm định, và môi trường chứa tinh bột hoặc gelatin dùng để xác định khả năng sinh amylase và protease (Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2018).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Định danh sơ bộ vi khuẩn lactic có hình dạng tế bào trực khuẩn bằng một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Định danh sơ bộ vi khuẩn lactic trực khuẩn dựa vào đặc điểm sinh lý, sinh hóa trên môi trường MRS gồm: pH ở 4,4; 9,0; 9,6; nhiệt độ 10°C và 45°C; nồng độ muối NaCl 6,5% và 18%, khả năng sinh CO<sub>2</sub> trong môi trường có glucose, theo khóa phân loại của Bergey's (John *et al.*, 1994) kết hợp với phân loại vi khuẩn lactic của Axelsson (2004). Khảo sát khả năng sinh trưởng trong các điều kiện môi trường khác nhau và xác định khả năng sinh khí từ đường glucose sau 48 h nuôi cấy (Nguyễn Lâm Dũng và *ctv.*, 1976).

#### 2.2.2. Khảo sát khả năng thích ứng môi trường acid dạ dày của các chủng thuộc chi *Lactobacillus*

Khả năng thích ứng môi trường acid dạ dày của các chủng thuộc chi *Lactobacillus* được đánh giá qua lượng tế bào sống sót ở môi trường có độ pH khác nhau theo phương pháp của Ramos và cộng tác viên (2013) kết hợp với phương pháp của Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh (2011) có điều chỉnh giá trị OD (đo ở bước sóng 620 nm). Các chủng *Lactobacillus* sau 24 h nuôi cấy được rửa sạch và đặt trong các dung dịch PBS (phosphate buffer saline) pH2, pH3. Sau các thời điểm 0 h và 3 h chuyển tế bào vi khuẩn trong dung dịch PBS vào môi trường MRS, nuôi cấy các chủng đó ở 37°C trong 24 h. Quan sát độ đục của môi trường sau thời gian nuôi cấy, đo OD ở bước sóng 620 nm, so sánh giá trị OD của các chủng ở các pH khác nhau ở thời điểm 3 h so với lúc 0 h.

#### 2.2.3. Khảo sát các chủng thuộc chi *Lactobacillus* chịu muối mật

Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường MRS lỏng có bổ sung 0,3% muối mật ở 37°C trong 4 h dựa trên phương pháp của Gilliland và Walker (1990). Mức độ chịu muối mật được xác định dựa vào giá trị OD<sub>620nm</sub> sau khi nuôi 4 h so với ban đầu nếu tăng lên 0,3 đơn vị thì chủng đó có khả năng kháng mật.

#### 2.2.4. Kiểm tra hoạt tính đối kháng vi khuẩn kiểm định

Sử dụng phương pháp khuếch tán thạch của Nguyễn Lâm Dũng và cộng tác viên (1976) với các vi khuẩn kiểm định là *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium* ATCC 13311 và *E. coli* ATCC 25922. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng hiệu số D - d (mm), D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính lỗ thạch (5 mm).

#### 2.2.5. Khả năng kháng kháng sinh

Khả năng kháng với các loại kháng sinh thông thường nhất của các chủng *Lactobacillus* được đánh giá bằng phương pháp cấy trải dịch vi khuẩn trên các ô đĩa chứa môi trường MRS agar có bổ sung kháng sinh, kiểm tra khả năng sống sót của các chủng (Nguyễn Thị Huyền và *ctv.*, 2014). Các kháng sinh được dùng thuộc hai nhóm: (i). nhóm ức chế quá trình tổng hợp thành tế bào vi khuẩn: ampicillin (50 µg/ml), penicillin (45 µg/ml); (ii). nhóm ức chế quá trình dịch mã: chloramphenicol (35 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), gentamycin (10 µg/ml) và tetracycline (50 µg/ml). Các đĩa thạch sau đó được ủ 48 h ở 37°C.

### 2.2.6. Kiểm tra khả năng sinh một số enzyme ngoại bào

Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và protease được sử dụng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường có bổ sung cơ chất tương ứng tinh bột 1% và gelatin 1% theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng và cộng tác viên (1976). Hoạt tính của enzyme được đo bằng đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh lỗ thạch, tức D - d. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (5 mm).

### 2.2.7. Định tên loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Định tên loài bằng phương pháp phân tích trình tự gene *pheS*. Đoạn gene *pheS* ngắn (382 - 455bp) mã hoá cho protein phenylalanyl - tRNA synthase có tác dụng xúc tác cho việc chuyển phenylalanine đến tRNA tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein (Nguyen *et al.*, 2013). Mẫu DNA được tách từ tế bào chủng có hoạt tính probiotic theo phương pháp của Gevers và cộng tác viên (2001). Phản ứng khuếch đại đoạn gen *pheS* được thực hiện với mỗi xuôi PheS-21-F (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') và mỗi ngược PheS-22-R(5'-CCWARVCCRAA'RGCAARCC-3'). Thiết lập chương trình phản ứng PCR bao gồm (1) 5,0 phút ở 95°C, (2) 3 chu trình 1,0 phút ở 95°C + 2,0 phút 15 giây ở 46°C + 1,0 phút 15 giây ở 72°C, (3) 30 chu trình 35 giây ở 95°C + 1,0 phút 15 giây ở 46°C + 1,0 phút 15 giây ở 72°C, (4) cuối cùng 7,0 phút 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,0% ở 75V trong 45 phút, nếu chúng có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch. Để giải trình tự gene *pheS* sản phẩm PCR vừa tinh sạch ở trên sẽ được chạy PCR lần thứ hai. Chương trình nhiệt gồm 30 chu trình 15 giây ở 96°C + 1,0 giây ở 35°C + 4,0 phút ở 60°C. Sau đó 10 µl sản phẩm PCR cho mỗi xuôi và 10 µl sản phẩm PCR cho mỗi ngược được sử dụng để giải trình tự. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gene của National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng cách sử dụng công cụ BLAST, xác định loài.

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1 đến tháng 6 năm 2016 tại Khoa Công nghệ thực phẩm - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Xác định các đặc điểm cơ bản các chủng vi khuẩn lactic có hình dạng tế bào trực khuẩn thuộc chi *Lactobacillus*

Các chủng được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng ở các điều kiện khác nhau về pH, nhiệt độ, nồng độ muối; đồng thời khảo sát khả năng sinh CO<sub>2</sub>. Theo phân loại của Axelsson (2004) nhóm vi khuẩn lactic trực khuẩn có hai chi phổ biến *Lactobacillus* và *Carnobacteria*. Hai chi này có hai đặc điểm thể hiện sự khác nhau rõ rệt là khả năng sinh trưởng và phát triển ở nhiệt độ 45°C và điều kiện pH = 9,0. *Carnobacteria* không sinh trưởng ở điều kiện nhiệt độ 45°C nhưng sinh trưởng ở điều kiện pH = 9,0 (Axelsson, 2004; John *et al.*, 1994). Trong 40 chủng vi khuẩn lactic hình dạng tế bào trực khuẩn nghiên cứu có 7 chủng (T1.1, D4.4, D4.8, D5.3, M8.5, M9.7, M9.10) không sinh trưởng được ở điều kiện 45°C nhưng sinh trưởng ở điều kiện pH = 9,0 kết hợp với các đặc điểm khác trong bảng 1 so sánh với bảng phân loại của Axelsson (2004) 7 chủng này bước đầu có thể xếp thuộc chi *Carnobacteria* còn 33 chủng còn lại có đặc điểm cần thiết của chi *Lactobacillus*. 33 chủng sơ bộ định danh thuộc chi *Lactobacillus* này được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 1.** Đặc điểm của 40 chủng vi khuẩn lactic có hình dạng tế bào trực khuẩn

Đặc điểm	7 chủng	33 chủng
CO <sub>2</sub> từ glucose	-	±
Nhiệt độ sinh trưởng (°C)		
10	+	±
45	-	±
pH sinh trưởng		
4,4	+	+
9,0	+	-
9,6	-	-
Khả năng chịu NaCl (%)		
6,5	±	±
18	-	-

Ghi chú: + Khả năng sinh trưởng; ± có chủng sinh trưởng có chủng không sinh trưởng; - Không sinh trưởng hoặc không có khả năng. 7 chủng ký hiệu (T1.1, D4.4, D4.8, D5.3, M8.5, M9.7, M9.10). 33 chủng là những chủng còn lại.

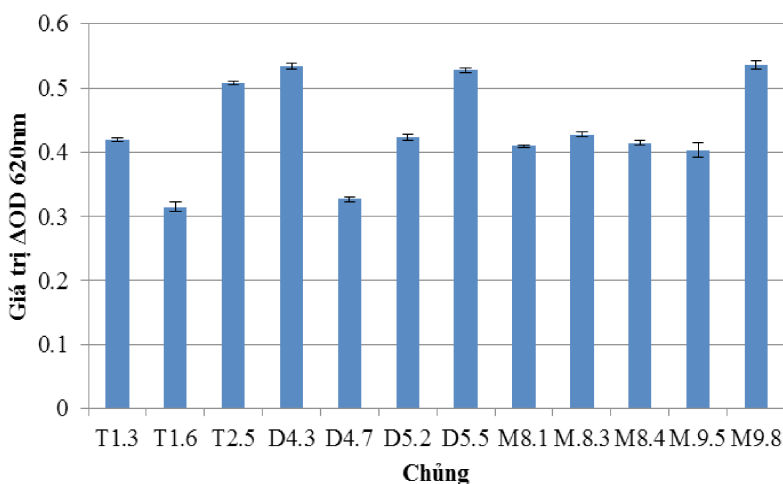
### 3.2. Khảo sát khả năng chịu môi trường acid trong dạ dày của các chủng thuộc chi *Lactobacillus*

Môi trường acid dịch dạ dày của người có thể đạt pH3 khi chứa thực phẩm và các sản phẩm từ sữa (Matijasic and Rogelj, 2000). Do đó, chủng probiotic sử dụng đưa vào cơ thể người qua đường tiêu hóa phải vượt qua được môi trường acid trong dạ dày pH2 và pH3 trong thời gian 3 h là giới hạn quyết định sàng lọc của các chủng (Ramos *et al.*, 2013; Mishra and Prasad, 2005). Kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả 33 chủng *Lactobacillus* đều có khả năng chịu được pH3 sau 3 h. Tuy nhiên tại pH2 chỉ có 14 chủng có thể chống chịu trong 3 h. Theo Ramos và cộng tác viên (2013), từ 234 LAB được phân lập từ một số thực phẩm lên men truyền thống có 51 chủng có khả năng sinh trưởng ở pH2 sau 3 h. Kết quả này gần tương tự với kết quả đạt được bởi Mishra và Prasad (2005), tất cả 7 chủng *Lb. casei* được nghiên cứu đều có khả năng chịu được pH3 sau 3 h, trong đó 3 chủng chịu được pH2. Phần lớn các vi sinh vật dễ bị tiêu diệt bởi pH thấp trong dạ dày, nhưng các vi khuẩn lactic nhìn chung có khả năng chịu được môi trường acid, đặc biệt là các loài *Lactobacillus* spp. Jacobsen và cộng tác viên (1999) đã nghiên cứu khả

năng chịu pH acid của 44 chủng *Lactobacillus*, trong đó 22 chủng có khả năng sống sót ở pH 2,5 trong 4 h.

### 3.3. Khảo sát khả năng kháng muối mật của các chủng thuộc chi *Lactobacillus*

Một thách thức khác đối với sự tồn tại của vi sinh vật trong đường dạ dày - ruột người là sự hiện diện của mật ở ruột non. Mật có tác dụng tiêu diệt vi sinh vật nhờ vào hoạt động phá hủy màng tế bào vi sinh vật (Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh, 2011). Nồng độ mật 0,3% thường được dùng để sàng lọc những chủng probiotic đây cũng là nồng độ mật trung bình trong ruột người và thời gian lưu trữ thức ăn trong ruột khoảng 4 h (Gillilan and Walker, 1990). Kết quả cho thấy có 12/14 *Lactobacillus* có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối mật 0,3% sau 4 h  $\Delta OD_{620nm} > 0,3$  (Hình 1). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Jacobsen và cộng tác viên (1999), 46 chủng trong số 47 chủng *Lactobacillus* đều có khả năng chịu được muối mật 0,3%. Ramos và cộng tác viên (2013), từ 234 LAB được phân lập từ một số thực phẩm lên men truyền thống có 51 chủng có khả năng kháng mật 0,3%.



Hình 1. Khả năng chịu muối mật của 12 chủng thuộc chi *Lactobacillus*

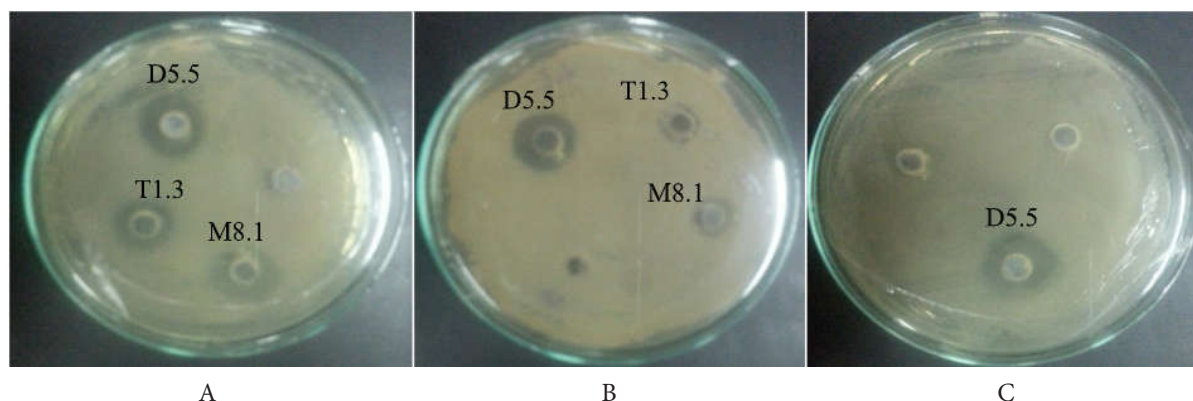
### 3.4. Kiểm tra đặc tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh

Một trong những đặc điểm có lợi của probiotic đối với sức khỏe con người là khả năng đối kháng các vi khuẩn gây bệnh. Từ 12 chủng có khả năng tồn tại tốt trong điều kiện muối mật được tiến hành thí nghiệm khả năng đối kháng khuẩn với 03 loại vi khuẩn gây bệnh *Listeria monocytogenes*, *S.*

*Typhimurium* và *E. coli*. Kết quả chỉ ra 06 chủng có khả năng đối kháng được các vi khuẩn gây bệnh trong đó có 04 chủng T1.3, D5.5, M8.1, M9.8 (Hình 2) có khả năng đối kháng cả 03 vi khuẩn gây bệnh và 04 chủng này được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo. Kết quả nghiên cứu này tương tự như kết quả nghiên cứu của Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh (2011), khi nghiên cứu khả năng kháng

khuẩn của 17 chủng *Lactobacillus* thì có 12 chủng có khả năng kháng 5 loại vi khuẩn gây bệnh trong đó có *S. Typhimurium*, *E. coli*. Kết quả thí nghiệm

của Mishra và Prasad (2005), cho thấy 07 chủng *Lb. brevis* mà nhóm tác giả nghiên cứu đều có khả năng kháng *S. Typhimurium*, *E. coli*.



**Hình 2.** Khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh của một số chủng *Lactobacillus*  
 Ghi chú: A. *Listeria monocytogenes*; B. *Salmonella Typhimurium*; C. *Escherichia coli*

**Bảng 2.** Khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng *Lactobacillus*

Chủng	Hoạt tính kháng khuẩn (D - d) mm		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
T1.3	+	+	+
D4.3	+	-	-
D5.5	++	++	++
M8.1	++	+	+
M9.5	+	-	-
M9.8	+	+	+

Ghi chú: - Không có hoạt tính kháng khuẩn, (+) Hoạt tính kháng khuẩn = 1 - 4 mm; (++) Hoạt tính kháng khuẩn = 5 - 9 mm

### 3.5. Khả năng kháng các loại kháng sinh

Quá trình điều trị bệnh bằng kháng sinh tiêu diệt nhiều quần thể vi sinh vật một cách không chọn lọc, dẫn đến sự mất cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và có thể gây ra bệnh tiêu chảy. Khi đó, các chủng vi khuẩn probiotic có khả năng kháng với kháng sinh được đưa vào đường tiêu hóa của người bệnh, chúng sẽ tồn tại mà không bị tiêu diệt bởi kháng sinh và có tác dụng phục hồi hệ vi sinh vật bình thường ở ruột (Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh, 2012). Kết quả kháng kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* thể hiện ở Bảng 3, cả 04 chủng

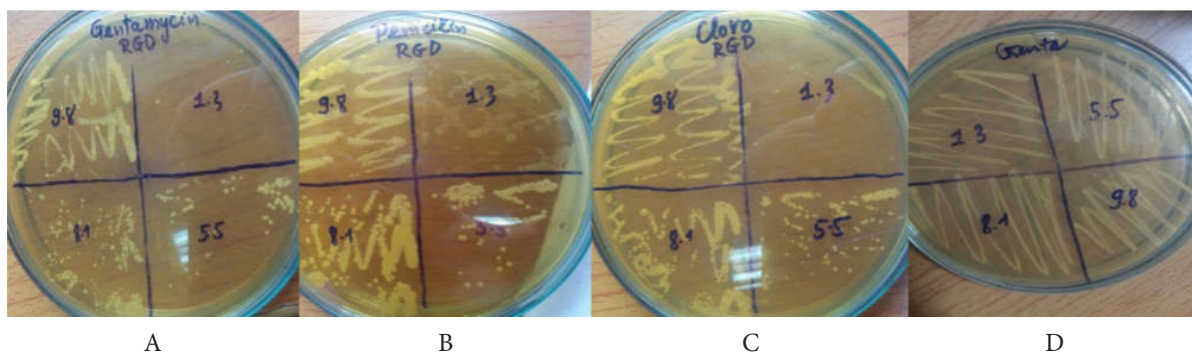
không kháng Kanamycine nhưng đều kháng 04 chất kháng sinh còn lại riêng chủng T1.3 nhạy cảm với Ampicillin (Hình 3).

**Bảng 3.** Khả năng kháng với kháng sinh của các chủng thuộc chi *Lactobacillus*

Kháng sinh	T1.3	D5.5	M8.1	M9.8
Ampicillin	-	+	+	+
Penicillin	+	+	+	+
Kanamycin	-	-	-	-
Chloramphenicol	+	+	+	+
Gentamycin	+	+	+	+

Ghi chú: (+): có khả năng kháng với kháng sinh; (-): không có khả năng kháng với kháng sinh

Số chủng thuộc chi *Lactobacillus* kháng chất kháng sinh ức chế quá trình sinh tổng hợp thành tế bào cao hơn với số chủng kháng chất kháng sinh ức chế quá trình sinh tổng hợp protein. Kết quả này đồng nhất với thí nghiệm của Nguyễn Thị Huyền và cộng tác viên (2014) cho thấy số chủng vi khuẩn kháng với kháng sinh ức chế quá trình sinh tổng hợp thành tế bào cao hơn gấp hai lần so với số chủng kháng chất kháng sinh ức chế quá trình sinh tổng hợp protein. Trong nghiên cứu tổng quan của Gueimonde và cộng tác viên (2013) đề cập đến khả năng và bản chất kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn probiotic là rất khác nhau, ngay cả trong cùng một loài.



Hình 3. Khả năng kháng các loại kháng sinh của các chủng thuộc chi *Lactobacillus*

Ghi chú: A. Ampicillin; B. Penicillin; C. Chloramphenicol; D. Gentamycin

### 3.6. Kiểm tra khả năng sinh một số enzyme ngoại bào

Đối với cơ thể người khi được bổ sung chủng probiotic có hoạt tính sinh enzyme ngoại bào tác dụng hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thu. Thí nghiệm tiến hành đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và protease của 04 chủng tuyển chọn. Kết quả chỉ có 01 chủng D5.5 sinh cả 2 enzyme amylase và protease và chủng này được định tên.

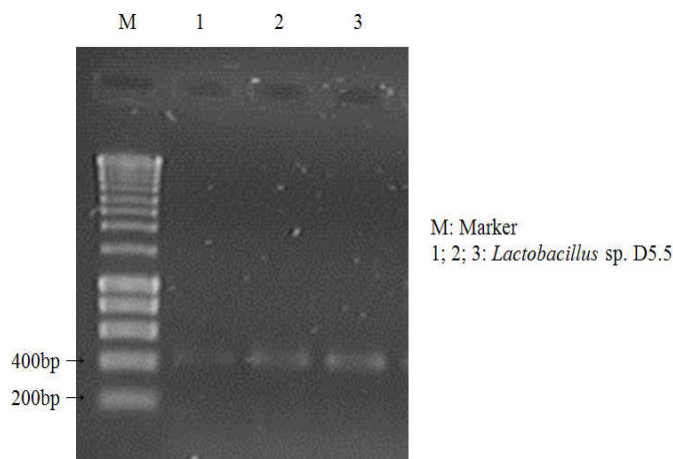
Bảng 4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của 04 chủng thuộc chi *Lactobacillus*

TT	Tên chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D - d) mm	
		Amylase	Protease
1	T1.3	-	-
2	D5.5	16	11
3	M8.1	10	-
4	M9.8	-	6

Ghi chú: D - d là đường kính vòng phân giải cơ chất, d = 5 mm

### 3.7. Định tên loài của chủng *Lactobacillus* sp. D5.5 bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Định danh chủng *Lactobacillus* sp. D5.5 với các đặc tính probiotic tốt bằng phương pháp giải trình tự nucleotide đoạn gene *pheS*. Sau khi chạy PCR với các cặp mồi PheS-21-F và PheS-22-R sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1,0% và thu một băng khoảng gần 450bp (Hình 4). Sản phẩm PCR này dùng để giải trình tự nucleotide và được so sánh với ngân hàng trình tự gen của (NCBI) thông qua chương trình BLAST và dựa vào sự tương đồng trong trình tự của đoạn gen để định danh đến loài. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tương đồng cao nhất với *Lb. fermentum* (Accession no. AM284190.1) ở mức 99%. Vì vậy, chủng D5.5 thuộc loài *Lb. fermentum*, được gọi là chủng *Lb. fermentum* D5.5. Đây là loài an toàn vì nghiên cứu trước đã công bố *Lb. fermentum* là loài hay được sử dụng làm probiotic (Ramos *et al.*, 2013).



Hình 4. Điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR của chủng *Lactobacillus* sp. D5.5

CGTGACCCCGTCTGTTTTGATGCGGACCCAAACGTCGCCAATGCAGGCCCGGATGCT  
 GGAACAACACGACTTCTCCAAGGGGCGGTTGAAGATGATCTCACCGGGGAAGTTTT  
 ACCGCCGTGACACCGATGACGCTACCCACAGCCACCAATTCACCAGGTTGAAGGA  
 ATCGTGGTCGGTGAACACGTCACGATGGCCGATTTAAAGGGGACCCTAGAGGTGGT  
 GGCCCAAACCTGTTTGGCGACCAGCTCAAGGTGCGTCTGCGCCGAGTTACTTCCC  
 GTTCACGGAACCGTCCGTCGAGGCCGACATCACTTGCTTTAATTGCCTGGGGGCCGG  
 TTGCTCAATCTGTAAGGGGACTGGTTGGATCGAGGTGTTGGGGGCTGGAATGGTGCAC  
 CAAAACGTCTTGAAGATGTCTGGCGTCGACCCGGAAGTTTACGGC

Hình 5. Trình tự đoạn gene *pheS* của chủng *Lb. fermentum* D5.5

#### IV. KẾT LUẬN

Từ 40 chủng vi khuẩn lactic có hình dạng tế bào trực khuẩn phân lập từ một số thực phẩm lên men và sơ bộ phân loại 7 chủng thuộc chi *Carnobacterium* và 33 chủng thuộc chi *Lactobacillus*. Các chủng thuộc chi *Lactobacillus* được sử dụng để sàng lọc chủng có hoạt tính probiotic. Kết quả tuyển chọn chủng *Lactobacillus* sp. D5.5 có triển vọng probiotic như khả năng kháng được môi trường acid trong dạ dày người pH2, pH3; khả năng chịu được muối mật cao sau 4 h; Đối kháng vi khuẩn gây bệnh *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* và *Escherichia coli*; Kháng được 04 chất kháng sinh Ampicillin, Penicillin, Chloramphenicol và Gentamycin, sinh cả 02 enzyme ngoại bào amylase và protease với kích thước vòng phân giải cơ chất 11 - 16 mm. Bằng phương pháp phân tích trình tự gene *pheS* đã xác định được chủng *Lactobacillus* sp. D5.5 là loài *Lactobacillus fermentum*. Chủng này có tiềm năng ứng dụng làm giống khởi động cho sản xuất thực phẩm lên men có đặc tính probiotic hoặc tạo chế phẩm probiotic cho người.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượng, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Thạnh và Phạm Văn Ty, 1976. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 2. NXB Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội.

Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2018. Đánh giá đặc tính probiotic và xác định một số đặc điểm của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ ruột gà ri. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 7(92), 104-111.

Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có đặc tính probiotic từ ruột gà. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, 12: 78-86.

Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Thu Hương, Trịnh Thị Thùy Linh, Nhữ Thị Hà, Trịnh Thị Hảo, Nguyễn Thành Linh và Đặng Xuân Nghiêm, 2014. Khảo sát thành phần vi sinh và các đặc tính probiotic của các

sản phẩm men tiêu hóa trên thị trường. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12 (1): 65-72.

Hoàng Quốc Khánh và Phạm Thị Lan Thanh, 2011. Phân lập, định danh và xác định chủng *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ con người. *Tạp chí Phát triển Khoa học và công nghệ*, 14 (6): 62-76.

Axelsson L., 2004. *Chapter 1. Lactic acid Bacteria: Classification and physiology. Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects*. Third Edition, Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved; 19-85.

Gevers D., Huys G., and Swings J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205 (1): 31-36.

Gilliland S.E. and Walker D.K., 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypercholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, 73 (4): 905-909.

Giraffa, G., Chanishvili, N., Widyastuti, Y., 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology* 161, 480-487.

Gueimonde, M., Sánchez, B., G de Los Reyes-Gavilán, C., Margolles, A., 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.* 18(4): 202 (1- 6).

Jacobsen C. N., Nielsen R, Hayford A. E., Moller P. L., Michaelsen K. F. Perregaard A, Sandström B., Tvede, M. and Jakobsen M., 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by In vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65(11): 4949-4956.

John G. H., Noel R. K., Peter H. A. S., James T. S. and Stanley T. W., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams and Wilkins.

Matijasic B. B. and Rogelj I., 2000. *Lactobacillus* K7 – A new candidate for a probiotic strain. *Food technol. biotechnol.* 38 (2): 113-119.

- Mishra V. and Prasad D.N., 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 103: 109-115.
- Nguyen T. L. D., Van H. K., Cnockaert M., De B. E., Maarten A., Le T. B., Vandamme P., 2013. A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. *Journal of Food Research International*, 50: 232-240.
- Ramos C. L., Thorsen L., Schwan R F. and Jespersen L., 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology* 36: 22-29.
- Zhang M., Fan X., Fang B., Ren V., Zhu C. and Zhu J., 2015. Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. *Journal of Microbiology*, 53: 398-405.

## Investigation and identification of *Lactobacillus* sp. bacteria with probiotic characteristics isolated from some fermented food

Nguyen Thi Lam Doan

### Abstract

In this study, biochemical and physiological characteristics of 40 lactobacilli strains isolated from fermented food were determined. The result showed that 7 strains belonged to *Carnobacterium*, 33 strains belonged to *Lactobacillus*. The *Lactobacillus* has presented in many probiotic products, this paper investigated probiotic properties of *Lactobacillus* sp. isolated from fermented food. The result indicated that *Lactobacillus* sp. D5.5 strain was selected with probiotic characteristics such as low pH tolerance (pH 2.0; 3.0), bile salt tolerance 0.3% after 4 h; antagonist to pathogens *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*; resistance to some antibiotic substances such as Ampicillin, Penicillin, Chloramphenicol and Gentamycin and the production of some extracellular enzymes with ring diameter of substrate resolution reached 11 - 16 mm. Moreover, *Lactobacillus* sp. D5.5 strain was analysed by *pheS* gene sequencing, compared to the known sequence database in National Center for Biotechnology Information (NCBI) and identified to be *Lactobacillus fermentum*. This strain can be used as starter culture for probiotic fermented food or for further study to make probiotic products for human.

**Keywords:** *Lactobacillus*, probiotic, fermented food, PCR, *pheS* gene

Ngày nhận bài: 12/9/2018  
Ngày phản biện: 19/9/2018

Người phản biện: PGS. TS. Lê Thanh Bình  
Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

## ẢNH HƯỞNG CỦA GIÁ THỂ VÀ PHÂN BÓN ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA LAN KIM TUYẾN HẬU CẤY MÔ TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Võ Thị Thanh Tuyền<sup>1</sup>, Phạm Thị Minh Tâm<sup>2</sup>, Hà Thị Loan<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Thí nghiệm đã được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến sinh trưởng của lan kim tuyến 0 - 3 tháng tuổi trong điều kiện nhà lưới tại Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả cho thấy trồng cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*) từ 0 - 3 tháng tuổi trên hỗn hợp giá thể dớn trắng và dớn tổ quạ (tỷ lệ 1 : 1) kết hợp với phun tổ hợp phân bón NPK 30 - 10 - 10 (0,5 g/L) luân phiên với phân bón Bio trùn quế 01 (0,5 mL/L) và Rootplex (0,5 mL/L) đã thúc đẩy quá trình sinh trưởng của cây và cho tỷ lệ cây sống đạt 96,0%, chiều cao cây đạt 9,3 cm, có 7,6 lá/cây với 3,9 rễ/cây.

**Từ khóa:** Lan kim tuyến (*A. setaceus*), giá thể, phân bón, sinh trưởng

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Họ lan (Orchidaceae) là họ thực vật đa dạng của Việt Nam với tổng số 22.000 loài thuộc 880 chi.

Theo Võ Văn Chi và Dương Đức Tiến (1978), họ Lan là một họ lớn đứng hàng thứ hai trong ngành Ngọc lan về số lượng loài. Tại Việt Nam, lan kim

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh