

ISOLATION AND DETERMINATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LACTIC ACID BACTERIA FROM PICKLED SAUERKRAUT IN DA LAT

Le Thi Loan¹, Nguyen Thi Tam¹, Nguyen Thi Anh Thu¹
 Nguyen Huynh Kim Thoa¹, Tran Kim Diep², Vo Hoai Hieu^{1*}

¹Yersin University, ²Tay Nguyen Institute for Scientific Research - VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 27/4/2022</p> <p>Revised: 20/7/2022</p> <p>Published: 20/7/2022</p>	<p>Lactic acid bacteria strains (LAB) were isolated from sauerkraut without causing hemolysis; they were screened and identified for their tolerance to acids, bile salts, phenols, pathogenic bacteria and antioxidants. The results obtained contained seven strains of bacilli, Gram-positive, CaCO₃-degrading, negative for catalase, indole, oxidase and not hemolytic which were used to continue with the research. The LDL19 strain was found to have superior properties compared to other strains when resisting <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonase aeruginosa</i> and <i>Salmonella</i> sp. In addition, LAB also has resistance to bile salts and acid at pH levels of 2.5 and pH 3.0, reaching 9.01±0.02% and 9.17±0.06, respectively after 3 hours; as well as phenol tolerance at 0.3% and 0.5% respectively after 24 hours, as well as DPPH free radical scavenging over 40%. The bacteria LDL19 has been identified as <i>Lactobacillus fermentum</i> LDL19, which is sensitive to ampicillin, penicillin, chloramphenicol antibiotics, and moderately sensitive to amikacin antibiotic, as well as a resistance to gentamycin, streptomycin, vancomycin antibiotics. This indicates that <i>L. fermentum</i> LDL19 is considered as one of the bright candidates to be used in the application of dietary supplements.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Pickled sauerkraut</p> <p>Da Lat</p> <p><i>Limosilactobacillus fermentum</i></p> <p>Probiotic</p> <p>Lactic acid bacteria</p>	

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN LACTIC TỪ DƯA CẢI MUỐI CHUA TẠI ĐÀ LẠT

Lê Thị Loan¹, Nguyễn Thị Tâm¹, Nguyễn Thị Anh Thu¹
 Nguyễn Huỳnh Kim Thoa¹, Trần Kim Diệp², Võ Hoài Hiếu^{1*}

¹Trường Đại học Yersin Đà Lạt

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 27/4/2022</p> <p>Ngày hoàn thiện: 20/7/2022</p> <p>Ngày đăng: 20/7/2022</p>	<p>Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ dưa cải muối chua không gây tan huyết được sàng lọc và định danh có khả năng chịu acid, muối mật, phenol, kháng các chủng vi khuẩn gây bệnh và chống oxy hóa tốt nhất. Kết quả thu được 7 chủng trực khuẩn, Gram dương, phân giải CaCO₃, âm tính với catalase, indole, oxydase và không tan máu được sử dụng để tiếp tục khảo sát. Chủng vi khuẩn LDL19 có những đặc tính vượt trội hơn những chủng còn lại khi kháng <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonase aeruginosa</i>, <i>Salmonella</i> sp. Bên cạnh đó, chủng LDL 19 còn có khả năng chịu acid ở pH 2,5 và pH 3,0 đạt lần lượt 9,01±0,02% và 9,17±0,06% sau 3 giờ; chịu phenol ở 0,3% và 0,5% trong 24 giờ, khử gốc DPPH trên 40%. Vi khuẩn LDL19 được định danh là chủng <i>Lactobacillus fermentum</i> LDL19; chủng này nhạy cảm với các kháng sinh ampicillin, penicillin, chloramphenicol, nhạy cảm trung bình với kháng sinh amikacin và kháng lại các kháng sinh gentamycin, streptomycin, vancomycin. Điều này cho thấy chủng <i>L. fermentum</i> LDL19 được xem như một trong những ứng cử viên sáng giá trong việc ứng dụng làm thực phẩm chức năng.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Dưa cải muối chua</p> <p>Đà Lạt</p> <p><i>Limosilactobacillus fermentum</i></p> <p>Probiotic</p> <p>Vi khuẩn lactic</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5905>

* Corresponding author. Email: hieuvh@yersin.edu.vn

1. Giới thiệu

Từ lâu đời, phương pháp lên men rau củ tự nhiên đã được sử dụng phổ biến trên thế giới nhằm gia tăng hương vị cũng như kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm [1], [2]. Đồng thời, nhóm thực phẩm này cũng cho thấy vai trò dinh dưỡng mạnh mẽ của chúng đến sức khỏe con người: cung cấp hàm lượng calo thấp; bổ sung nguồn amino acid, protein, carbohydrate có giá trị cao và nguồn vitamin, khoáng, chất xơ quan trọng; cải thiện tiêu hóa và tăng cường cân bằng hệ vi sinh đường ruột; ngăn ngừa nguy cơ ung thư, tim mạch; chống lão hóa, lo âu và trầm cảm,... [2]-[6]. Quá trình lên men thực phẩm được diễn ra phần lớn nhờ vào hoạt động của các vi khuẩn lactic (LAB), chúng có khả năng chuyển hóa nguồn carbohydrate có trong thực phẩm thành acid lactic với nồng độ lớn, sinh trưởng và phát triển trong điều kiện pH thấp của dạ dày, nồng độ muối mật và nồng độ NaCl cao,... [4], [6]. Một số LAB còn có khả năng tiếp tục chuyển hóa acid lactic thành acid acetic hay sinh tổng hợp bacteriocin giúp kéo dài thời gian bảo quản [2], [3]. Ngoài ra, nhiều tác động tích cực của chúng đến sức khỏe đã được phát hiện và nghiên cứu như khả năng phân giải độc tố, chống lại sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh; sản sinh các hợp chất sinh học quan trọng (inositol, flavonoid, phenol, sterol,...) [1], [3]; tương tác với các tế bào miễn dịch, điều chỉnh nhu động hệ tiêu hóa, điều chỉnh khả năng miễn dịch,... [2], [7].

Sàng lọc và nghiên cứu các đặc tính probiotic của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ quá trình lên men thực phẩm có nguồn gốc phi động vật đang là một xu hướng được các nhà nghiên cứu tích cực quan tâm nhằm thu nhận và đa dạng hóa các chủng probiotic tiềm năng, mang lại lợi ích cao về dinh dưỡng và sức khỏe [2], [3], [7]. Với đặc thù về khí hậu và thổ nhưỡng thích hợp cho phát triển nông nghiệp, Đà Lạt cung cấp đa dạng các loại nông sản có chất lượng cao với sản lượng rất lớn. Việc phân lập, sàng lọc và xác định các chủng vi khuẩn probiotic bản địa từ thực phẩm rau củ lên men theo phương pháp truyền thống tại đây không những đóng vai trò quan trọng trong quá trình bảo quản, chế biến, đa dạng hóa các nguồn thực phẩm có chất lượng cao mà còn mang ý nghĩa lớn, góp phần nâng cao sức khỏe cộng đồng thông qua dinh dưỡng được cung cấp từ nguồn thực phẩm địa phương.

Các chủng vi khuẩn lactic trong dưa cải muối chua truyền thống bản địa tại Đà Lạt đã được phân lập và các đặc tính probiotic quan trọng của chúng như khả năng ly giải hồng cầu, khả năng sinh tổng hợp acid lactic, chống chịu với pH dạ dày và muối mật, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính chống oxy hóa và tính nhạy cảm với kháng sinh đã được tiến hành nghiên cứu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Phân lập chủng vi khuẩn lactic

Các mẫu dịch lên men dưa cải muối được pha loãng đến nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} bằng dung dịch đệm peptone (1% peptone, 0,85% natri clorua). Tiến hành cấy trải 0,1 ml dịch pha loãng ở các nồng độ lên môi trường thạch MRS (1% proteose peptone, 1% cao thịt, 0,5% cao nấm men, 2% đường glucose, 0,1% tween 80, 0,2% amoni citrat, 0,5% natri acetat, 0,01% magie sunfat, 0,005% mangan(II) sunfat, 0,02% dikali phosphat, 1,2% agar) bổ sung 0,1% CaCO_3 . Các đĩa thạch được ủ trong bình nuôi cấy kỵ khí có sử dụng túi Anaerogen Oxoid (Thermo Scientific) từ 48 - 72 giờ ở 37°C . Các khuẩn lạc có khả năng phân giải CaCO_3 được lựa chọn làm thuần và xác định hình thái tế bào, tính chất bắt màu khi nhuộm Gram; thử nghiệm catalase, oxidase, indol [8]. Các chủng LAB được giữ trong môi trường sữa gầy ở -20°C và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo sau khi nuôi tăng sinh trên môi trường MRS ở 37°C sau 24 - 48 giờ.

2.2. Hoạt tính tan máu

Được thực hiện dựa theo mô tả của Leite và cộng sự [9], các chủng vi khuẩn sau khi sàng lọc được cấy trên môi trường Columbia (2,3% special peptone, 0,1% tinh bột, 0,5% natri clorua, 1% agar) bổ sung 5% máu cừu. Ủ mẫu ở 37°C trong 48 giờ. Hoạt tính tan máu của các chủng LAB được đánh giá và phân loại dựa trên sự ly giải hồng cầu trên bề mặt thạch xung quanh khuẩn lạc.

Các vùng màu xanh lá cây xung quanh khuẩn lạc (tan máu α), vùng tan máu rõ ràng xung quanh khuẩn lạc (tan máu β) và không có vùng tan máu xung quanh khuẩn lạc (tan máu γ) trên đĩa thạch máu Columbia.

2.3. Khả năng chịu acid và dung nạp muối mật

Khả năng chịu acid và dung nạp muối mật được thực hiện theo nghiên cứu trước đây với một số thay đổi nhỏ [10], [11]. Khả năng chịu acid được thực hiện bằng cách bổ sung 1 ml chứa 10^9 CFU/ml LAB vào môi trường canh thang MRS đã được điều chỉnh đến pH 2,5 và pH 3,0 bằng HCl 1N. Phương pháp đếm khuẩn lạc được sử dụng để đánh giá mật độ LAB trên thạch MRS, sau 0 và 3 giờ ủ ở 37°C.

Khả năng dung nạp muối mật tiến hành bằng cách bổ sung 1ml LAB chứa 10^9 CFU/ml vào nuôi trong môi trường canh thang MRS bổ sung muối mật (Sigma Aldrich) ở nồng độ 0,2% và 0,3%. Sau 3 giờ nuôi cấy ở 37°C, dịch huyền phù được cấy lên môi trường thạch MRS và tiếp tục ủ ở 37°C. Sau 48 giờ, vi khuẩn mọc trên đường cấy được xác định là dương tính. Đối chứng là các chủng nuôi trong môi trường MRS. Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

2.4. Khả năng chịu phenol

Khả năng chịu phenol được xác định dựa theo mô tả của Jawan và cộng sự (2019) có sửa đổi [12]. 10^9 CFU/ml LAB được nuôi cấy trên môi trường canh thang MRS bổ sung phenol (Sigma Aldrich) ở nồng độ 0,2% và 0,3% (w/v). Phương pháp đếm khuẩn lạc được sử dụng để đánh giá mật độ LAB trên thạch MRS, sau 0 và 3 giờ ủ ở 37°C.

2.5. Khả năng loại bỏ gốc oxy hóa

Khả năng loại bỏ gốc oxy hóa của các chủng LAB được xác định bằng khả năng loại bỏ gốc 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich) tự do được thực hiện theo mô tả của Cao và cộng sự (2019) [13]. Các chủng LAB được nuôi cấy qua đêm trước khi ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút và được lọc qua màng có kích thước 0,22 μ m để loại bỏ sinh khối. 2 ml dịch lọc được trộn với 2 ml dung dịch DPPH (0,04 mM). Hỗn hợp sau đó được ủ tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hỗn hợp của nước cất và dung dịch DPPH được sử dụng làm mẫu trắng. Độ hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm được ghi nhận và xác định khả năng loại bỏ gốc DPPH theo công thức:

$$\text{Khả năng loại bỏ DPPH(\%)} = [(1 - A_{\text{mẫu}}) / A_{\text{trắng}}] * 100\%$$

Trong đó, $A_{\text{mẫu}}$, $A_{\text{trắng}}$ độ hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm của dịch lọc sau nuôi cấy và nước cất với dung dịch DPPH.

2.6. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên bề mặt thạch [14]. Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonase aeruginosa*, *Salmonella* sp., sau khi nuôi cấy qua đêm ở 37°C trên canh thanh LB (10% peptone, 0,5% natri clorua, 0,5% cao nấm men) được trải lên bề mặt thạch LB và tạo các giếng thạch trên đĩa sau khi trải. Dịch nuôi cấy qua đêm LAB được ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút. Phần nổi được bơm vào các giếng thạch và để ở 4°C trong 2 giờ. Sau đó nuôi ở 37°C trong 24 giờ, vùng ức chế xung quanh giếng thạch được ghi nhận bằng thước đo mm.

2.7. Định danh chủng vi khuẩn LDL 19 bằng sinh học phân tử

Vi khuẩn được định danh dựa trên trình tự gen 16S rARN. DNA tổng số của vi khuẩn được tách bằng E.N.Z.A Bacterial ADN kit (Omega, Mỹ). Mẫu DNA tổng số của vi khuẩn được sử dụng làm khuôn cho phản chuỗi khuếch đại (Polymerase chain reaction – PCR) sử dụng cặp mồi 27F, 5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3'; và 1492R, 5'-TACGG(C/T)TACCTTG -

TTACGACT-3'. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR như sau: 95°C: 3 phút, (94°C: 30 giây, 55°C: 30 giây, 72°C: 1 phút) x 35 chu kỳ, 72°C: 5 phút và giữ mẫu ở 4°C.

Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự 16S rARN được sử dụng để dựng cây phân loại dựa trên phương pháp thống kê Neighbor-Joining (NJ) thông qua chương trình MEGA7 với mô hình thay thế nucleotide Maximum Composite Likelihood. Giá trị bootstrap xuất hiện ở mỗi nhánh được thiết lập từ sau 1000 lần lặp lại.

2.8. Tính nhạy cảm với kháng sinh

Được thực hiện theo mô tả của Das và cộng sự (2015), các khoan giấy tẩm kháng sinh ampicillin, penicillin, chloramphenicol, amikacin, gentamicin, streptomycin, vancomycin được đặt lên đĩa thạch MRS chứa vi khuẩn LAB được cấy trải trước đó [15]. Sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C, kích thước đường kính vòng vô khuẩn ≤ 15 mm (kháng - R), từ 16 – 20 mm (nhạy cảm trung bình - MS) và ≥ 21 mm (nhạy cảm - S) [16].

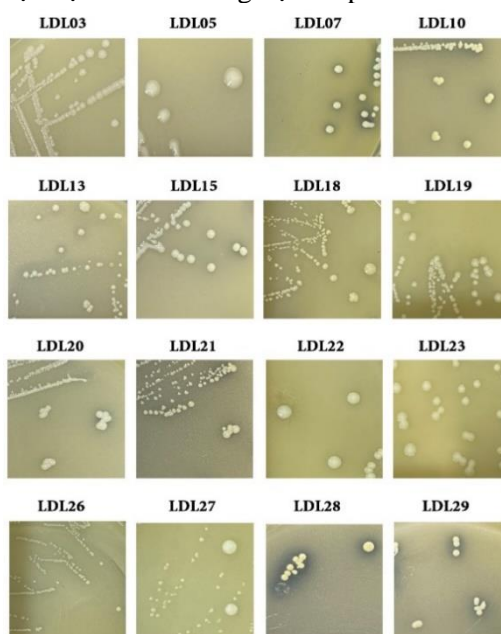
2.9. Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được thu nhận và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2018 và phần mềm Ngrap-gtk phiên bản 6.09.01. Kết quả giải trình tự gen được xử lý bằng phần mềm Mega7.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập một số chủng LAB

Từ mẫu dịch dưa chua thu được 16 chủng vi khuẩn thuần khiết có khả năng phân giải CaCO_3 được thể hiện ở bảng 1. Các chủng vi khuẩn được kiểm tra hình thái khuẩn lạc được thể hiện qua hình 1 và một số đặc điểm sinh hóa thu được 16 chủng trực khuẩn Gram dương, có các kết quả âm tính với catalase, indol và oxydase theo mô tả ở bảng 1. Các chủng vi khuẩn được lưu trữ trong sữa gầy ở -20°C để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc các chủng vi khuẩn được phân lập từ dưa muối chua

Qua khảo sát 7 chủng vi khuẩn LDL03, LDL05, LDL13, LDL19, LDL23, LDL26, LDL27 không xuất hiện vùng trong xung quanh khuẩn lạc trên môi trường thạch columbia bổ sung máu cừu (tan máu γ). Những chủng vi khuẩn lactic được lựa chọn làm Probiotic được Cơ quan An

toàn Thực phẩm Châu Âu (EFSA) khuyến nghị đánh giá hoạt tính tan máu. Những chủng vi khuẩn lactic làm tan máu γ thường được lựa chọn để nghiên cứu Probiotic vì những chủng này không có độc lực và thiếu hemolysin. Những chủng LAB được phân lập từ sản phẩm lên men tự nhiên không phải sữa cũng cho thấy hoạt tính không tan máu [6], [7].

Bảng 1. Kết quả phân lập và đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn LAB

Mã chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Catalase	Indole	Oxydase
LDL03	Trắng sữa, nhẵn, bìa răng, dẹp bằng	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL05	Trắng trong, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL07	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL10	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL13	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL15	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL18	Trắng đục, nhẵn, bìa nhẵn, dẹp bằng	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL19	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL20	Trắng đục, nhẵn, bìa nhẵn, dẹp bằng	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL21	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL22	Trắng sữa, nhẵn, bìa răng, dẹp bằng	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL23	Trắng sữa, nhẵn, bìa răng, dẹp bằng	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL26	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL27	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL28	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-
LDL29	Trắng đục, nhẵn, bìa nguyên, lồi	Trực, Gram (+)	-	-	-

3.2. Khả năng chịu acid, muối mật

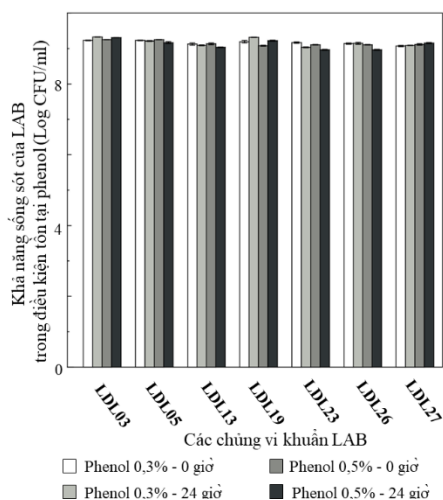
Khả năng tồn tại của vi sinh vật trong đường tiêu hóa như khả năng chịu acid và muối mật được lựa chọn để sàng lọc các chủng probiotic [17]. Qua khảo sát, hầu hết độ sống của các chủng LAB được duy trì sau 3 giờ theo dõi ở pH 2,5, pH 3,0 và muối mật ở nồng độ 0,3% và 0,5% và kết quả nghiên cứu này phù hợp với công bố của Shokryazdan và cộng sự (2014) [18]. Khả năng chịu acid và dung nạp muối mật của các LAB được thể hiện qua bảng 2. Trong đó, LDL19 dường như không có sự thay đổi đáng kể, tỷ lệ sống sót lên đến 97,62% ở pH 2,5 và 99,24% ở pH 3 và có thể tồn tại trong điều kiện chứa muối mật 0,3% và 0,5% sau 3 giờ theo dõi.

Bảng 2. Khả năng tồn tại của các chủng LAB trong môi trường acid và muối mật sau 3 giờ (Log CFU/ml)

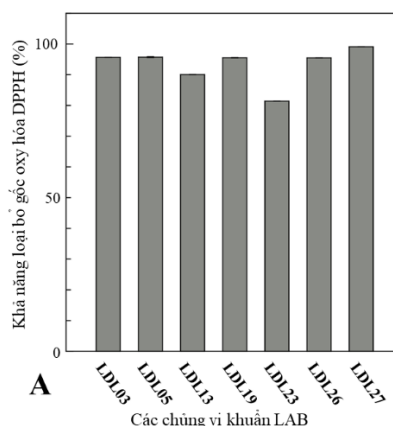
Chủng	Acid				Muối mật	
	pH 2,5		pH 3,0		0,3%	0,5%
	0 giờ	3 giờ	0 giờ	3 giờ		
LDL03	9,21±0,02	7,77±0,03	9,18±0,01	8,09±0,01	+	+
LDL05	9,22±0,01	7,66±0,01	9,18±0,01	8,16±0,03	+	+
LDL13	9,21±0,02	6,98±0,02	9,17±0,01	7,16±0,02	+	+
LDL19	9,23±0,01	9,01±0,02	9,24±0,01	9,17±0,06	+	+
LDL23	9,22±0,01	6,98±0,02	9,22±0,01	8,26±0,01	+	+
LDL26	9,18±0,01	8,72±0,03	9,20±0,02	9,17±0,02	+	+
LDL27	9,19±0,03	5,81±0,01	9,20±0,01	8,03±0,03	+	+

3.3. Khả năng chịu phenol

Hầu hết các chủng LAB được khảo sát đều có khả năng chịu phenol ở 0,3 và 0,5% (hình 2). Kết quả này cho thấy phenol không có khả năng ức chế sự tồn tại của các chủng LAB. Công bố của Jawan và cộng sự (2019) cũng cho thấy sự tương đồng khi các chủng LAB vẫn có thể phát triển trong điều kiện có mặt phenol ở nồng độ 0,1%, 0,3%, 0,5% [12].



Hình 2. Khả năng sống sót của các LAB trong điều kiện tồn tại phenol ở các nồng độ khác nhau

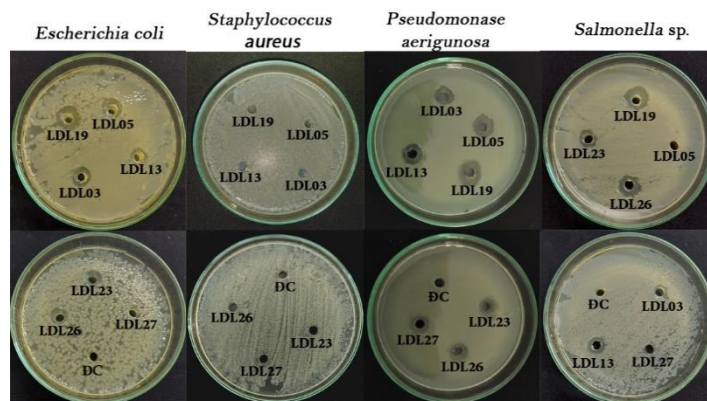


Hình 3. Khả năng loại bỏ gốc 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) của các chủng LAB

3.4. Khả năng loại bỏ gốc DPPH

Khả năng loại bỏ gốc DPPH là thử nghiệm cần thiết để xác định khả năng chống oxy hóa của các chủng được sử dụng làm probiotic. Hầu hết các chủng LAB thử nghiệm đều có khả năng loại bỏ gốc DPPH theo kết quả được thể hiện trong hình 3. Các chủng LDL03, LDL05, LDL19, LDL26 và LDL27 có thể loại bỏ gốc DPPH tương đương nhau, đều trên 45%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Liu và cộng sự (2022) khi hiệu quả loại bỏ gốc DPPH của một số loài thuộc chi *Lactobacillus* đạt từ 24,51% đến 82,66% [19].

3.5. Hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh



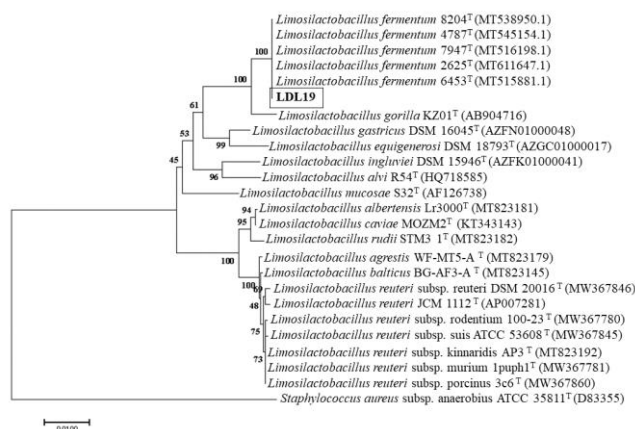
Hình 4. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng LAB

Kích thước đường kính vòng vô khuẩn được tạo ra quanh giếng thạch của các chủng LAB được khảo sát cho thấy khả năng ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh (hình 4). Toàn bộ các chủng LAB đều có khả năng ức chế vi khuẩn *P. aeruginosa* và không có khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus* (bảng 3). Duy nhất chủng LDL27 chỉ có khả năng ức chế một chủng nấm bệnh. Trong khi đó, LDL19 có kết quả vượt trội hơn khi tạo ra vòng vô khuẩn có kích thước đường kính lớn hơn các chủng LAB còn lại.

Bảng 3. Đường kính vòng vô khuẩn được tạo ra bởi các chủng LAB kháng vi khuẩn gây bệnh (mm)

Vi khuẩn gây bệnh	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonase aeriginosa</i>	<i>Salmonella sp.</i>
LDL03	3,43±0,15	0,00±0,00	6,33±0,15	2,5±0,26
LDL05	5,77±0,21	0,00±0,00	7,30±0,36	0,00±0,00
LDL13	3,13±0,15	0,00±0,00	6,73±0,40	4,83±0,15
LDL19	6,77±0,35	0,00±0,00	8,00±0,61	8,50±0,36
LDL23	4,40±0,20	0,00±0,00	5,43±0,31	3,50±0,30
LDL26	4,67±0,15	0,00±0,00	6,70±0,30	7,17±0,31
LDL27	0,00±0,00	0,00±0,00	6,40±0,36	0,00±0,00

3.6. Kết quả định danh LDL19



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại dựa trên so sánh vùng trình tự 16S rARN. Giá trị bootstrap xuất hiện ở mỗi nhánh được thiết lập từ sau 1000 lần lặp lại

Trình tự chủng LDL19 có kích thước 1451 bp được đăng ký trên GenBank với mã số OM570297. Kết quả phân tích cây phả hệ (hình 5), mẫu LDL19 nằm cùng nhánh với các loài *Limosilactobacillus fermentum* 8204 (MT538950.1), *Limosilactobacillus fermentum* 4787 (MT545154.1), *Limosilactobacillus fermentum* 7947 (MT516198.1), *Limosilactobacillus fermentum* 2526 (MT611647.1), *Limosilactobacillus fermentum* 6453 (MT515881.1) và có độ tương đồng 100% khi blast lên hệ thống NCBI. Từ kết quả blast trên NCBI và cây phả hệ, chủng LDL19 là chủng *L. fermentum* LDL19. Vi khuẩn *L. fermentum* trước đây là *Lactobacillus fermentum* được sửa đổi năm 2020 [20].

3.7. Tính nhạy cảm với kháng sinh

Bảng 4. Tính nhạy cảm với một số loại kháng sinh của vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* LDL19

Loại kháng sinh	Kích thước vòng vô khuẩn (mm)	Tính nhạy cảm với kháng sinh
Ampicillin	22,6±0,3	S
Penicillin	23,2±0,2	S
Chloramphenicol	20,4±0,6	S
Amikacin	16,3±0,3	MS
Gentamicin	14,4±0,3	R
Streptomycin	0	R
Vancomycin	0	R

Vi khuẩn *L. fermentum* LDL19 nhạy cảm với các loại kháng sinh ampicillin, penicillin, chloramphenicol; nhạy cảm trung bình với amikacin và kháng lại các loại kháng sinh gentamycin, kanamycin và vancomycin (bảng 4). Nghiên cứu của Blajman và cộng sự (2015) cũng cho thấy tính nhạy cảm của các chủng vi khuẩn lactic với kháng sinh ampicillin, penicillin và chloramphenicol [21]. Bên cạnh đó, các chủng LAB có thể kháng lại các kháng sinh gentamycin, streptomycin, vancomycin cũng được đề cập đến trong nghiên cứu của Jose và cộng sự (2015) [22].

4. Kết luận

Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ dưa cải muối chua có khả năng ức chế một số chủng vi khuẩn gây bệnh, chịu được acid, muối mật, phenol và có khả năng chống oxy hóa khi loại bỏ gốc 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl. Trong đó, chủng *L. fermentum* LDL19 có những đặc tính vượt trội hơn so với các chủng được khảo sát đồng thời. Chủng *L. fermentum* LDL19 nhạy cảm với kháng sinh ampicillin, penicillin, chloramphenicol. Vì vậy, *L. fermentum* LDL19 được xem như một trong những ứng cử viên sáng giá trong việc ứng dụng làm thực phẩm chức năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Suwannaphan, "Isolation, identification and potential probiotic characterization of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented food," *AIMS microbiology*, vol. 7, no. 4, p. 431, 2021.
- [2] S. S. Behera, A. F. El Sheikha, R. Hammami, and A. Kumar, "Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits?," *Journal of Functional Foods*, vol. 70, p. 103971, 2020.
- [3] B. Fu, X. Huang, J. Ma, Q. Chen, Q. Zhang, and P. Yu, "Characterization of an inositol-producing *Lactobacillus plantarum* strain and the assessment of its probiotic potential and antibacterial activity," *LWT*, vol. 153, p. 112553, 2022.
- [4] S. M. Abudoleh, S. O. Hamdan, A. M. Mahasneh, Z. M. Al-Khani, and A. A. Talhouni, "Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from Jordanian traditional pickled and fermented foods," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, vol. 78, no. 4, pp. 515-520, 2021.
- [5] M. S. Dallal, S. Zamaniahari, A. Davoodabadi, M. Hosseini, and Z. Rajabi, "Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Persian pickled vegetables," *GMS hygiene and infection control*, vol. 12, pp. 1 - 7, 2017.
- [6] J. Wang, K. Yang, M. Liu, J. Zhang, X. Wei, and M. Fan, "Screening for potential probiotic from spontaneously fermented non-dairy foods based on in vitro probiotic and safety properties," *Annals of Microbiology*, vol. 68, no. 12, pp. 803-813, 2018.
- [7] F. Alameri, M. Tarique, T. Osaili, R. Obaid, A. Abdalla, R. Masad, A. Al-Sbiei, M. Fernandez-Cabezudo, S. Q. Liu, B. Al-Ramadi, and M. Ayyash, "Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Vegetable Products: Potential Probiotic and Postbiotic Characteristics Including Immunomodulatory Effects," *Microorganisms*, vol. 10, no. 2, pp. 389, 2022.
- [8] Y. Taye, T. Degu, H. Fesseha, and M. Mathewos, "Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products," *The Scientific World Journal*, vol. 2021, p. 4697445, 2021, doi: 10.1155/2021/4697445.
- [9] A. M. Leite, M. A. Miguel, R. S. Peixoto, P. Ruas-Madiedo, V. M. Paschoalin, B. Mayo, and S. Delgado, "Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains," *J. Dairy Sci*, vol. 98, no. 6, pp. 3622-32, Jun 2015, doi: 10.3168/jds.2014-9265.
- [10] Q. Han, B. Kong, Q. Chen, F. Sun, and H. Zhang, "In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics," *Journal of Functional Foods*, vol. 32, pp. 391-400, 2017, doi: [10.1016/j.jff.2017.03.020](https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.020).
- [11] S.-M. Won, S. Chen, K. W. Park, and J.-H. Yoon, "Isolation of lactic acid bacteria from kimchi and screening of *Lactobacillus sakei* ADM14 with anti-adipogenic effect and potential probiotic properties," *LWT*, vol. 126, pp. 109296, 2020, doi: [10.1016/j.lwt.2020.109296](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109296).
- [12] R. Jawan, M. Kasimin, S. O. Jalal, A. M. Faik, S. Abbasiliasi, and A. B. Ariff, "Isolation, characterisation and in vitro evaluation of bacteriocins-producing lactic acid bacteria from fermented

- products of Northern Borneo for their beneficial roles in food industry," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 1358, p. 12, 2019.
- [13] Z. Cao, H. Pan, S. Li, C. Shi, S. Wang, F. Wang, P. Ye, J. Jia, C. Ge, Q. Lin, and Z. Zhao, "In Vitro Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Yunnan De'ang Pickled Tea," *Probiotics Antimicrob Proteins*, vol. 11, no. 1, pp. 103-112, Mar 2019, doi: 10.1007/s12602-018-9395-x.
- [14] H. Bazireh, P. Shariati, S. A. Jamalkandi, A. Ahmadi, and M. A. Boroumand, "Isolation of Novel Probiotic Lactobacillus and Enterococcus Strains From Human Salivary and Fecal Sources," *Frontiers in Microbiology*, Original Research, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.597946.
- [15] P. Das, S. Khowala, and S. Biswas, "In vitro probiotic characterization of Lactobacillus casei isolated from marine samples," *LWT*, vol. 73, pp. 383-390, 2016, doi: [10.1016/j.lwt.2016.06.029](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.029).
- [16] S. M. B. Hashemi, F. Shahidi, S. A. Mortazavi, E. Milani, and Z. Eshaghi, "Potentially Probiotic Lactobacillus Strains from Traditional Kurdish Cheese," *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 6, no. 1, pp. 22-31, 2014, doi: 10.1007/s12602-014-9155-5.
- [17] C. Caggia, M. De Angelis, I. Pitino, A. Pino, and C. L. Randazzo, "Probiotic features of Lactobacillus strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses," *Food Microbiol*, vol. 50, pp. 109-17, Sep 2015, doi: 10.1016/j.fm.2015.03.010.
- [18] P. Shokryazdan *et al.*, "Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains," *Biomed Res Int*, vol. 2014, p. 927268, 2014, doi: 10.1155/2014/927268.
- [19] C. Liu, W.-j. Xue, H. Ding, C. An, S.-j. Ma, and Y. Liu, "Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated From Fermented Vegetables in Shaanxi, China," *Frontiers in Microbiology*, Original Research, vol. 12, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2021.774903.
- [20] J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti, C. Franz, H. Harris, P. Mattarelli, P. W. O'Toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G. E. Felis, M. G. Gänzle, and S. Lebeer, "A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae," *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 70, no. 4, pp. 2782-2858, Apr 2020, doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- [21] J. Blajman, C. Gaziano, M. V. Zbrun, L. Soto, D. Astesana, A. Berisvil, A. R. Scharpen, M. Signorini, and L. Frizzo, "In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens," *Research in Veterinary Science*, vol. 101, pp. 50-56, 2015, doi: [10.1016/j.rvsc.2015.05.017](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.017).
- [22] N. M. Jose, C. R. Bunt, and M. A. Hussain, "Comparison of Microbiological and Probiotic Characteristics of Lactobacilli Isolates from Dairy Food Products and Animal Rumen Contents," *Microorganisms*, vol. 3, no. 2, pp. 198-212, 2015.