

Chương 1. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU

1.1. VI SINH VẬT

1.1.1. Định nghĩa probiotic

Ngày càng có nhiều người có lo ngại về mối liên hệ giữa probiotic và lợi ích của nó mang lại cho đường tiêu hóa. Thống kê của Grand View Research. (2021) năm 2023 cho thấy tổng doanh số bán men vi sinh dự đoán đạt 69,3 tỷ đô la và chiếm 82% doanh số bán hàng trên thị trường. Theo “Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên hợp quốc và Tổ chức Y tế Thế giới (FAO/WHO), Probiotic có định nghĩa là các vi sinh vật sống mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ như là làm tăng tốc độ trưởng thành của sinh vật có trong đường tiêu hóa, phòng ngừa sự phát triển mầm bệnh và tăng khả năng miễn dịch của cơ thể”. Thực phẩm có chứa probiotic được cho là giúp tăng cường sức khỏe nhiều hơn so với những sản phẩm thông thường. Vi khuẩn sinh học giúp vật chủ bằng cách thúc đẩy hoặc hỗ trợ tạo ra các loại acid khác nhau (Nezamdoost-Sani et al., 2023). Ngoài ra, theo Gu et al. (2022) probiotic còn giúp tăng cường miễn dịch của vật chủ nhờ vào việc điều chỉnh giảm thiểu các cytokine gây viêm và chuyển hóa cholesterol, lipid, glucose nhằm ngăn ngừa béo phì và hơn thế nữa chúng còn giúp loại trừ các loại oxy phản ứng (ROS), điều chỉnh các hoạt động oxy hóa của enzyme và phi enzyme đồng thời giảm quá trình peroxy hóa lipid. Sự thay đổi pH trong dạ dày, sự phân hủy enzyme và sự tồn tại của muối mật là các yếu tố đem đến ảnh hưởng trực tiếp đối với khả năng sống sót của men tiêu hóa (Altamirano-Ríos et al., 2022). Môi trường có tính acid cao (pH 2,0) và dung dịch muối mật 0,3% ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng tồn tại của probiotic (Nezamdoost-Sani et al., 2023).

Mọi người dường như ngày càng quan tâm hơn đến sức khỏe và lối sống, đó là những yếu tố góp phần quan trọng đến thị trường men vi sinh. Thị trường tiêu thụ men vi sinh ở Châu Á có tốc độ tăng trưởng cao nhất, các thực phẩm có chứa men vi sinh chẳng hạn như nước ép trái cây, các sản phẩm socola (Mordor Intelligence, 2019). Tuy nhiên các sản phẩm sữa vẫn là sản phẩm có chứa men vi sinh được tiêu thụ một cách phổ biến nhất (Reque & Brandelli, 2021). Đã có nhiều cuộc thử nghiệm sử dụng probiotic để điều trị hoặc cải thiện một số bệnh khác nhau gồm có hội chứng kích thích

ruột Yoon et al. (2015), bệnh ruột kích thích Shadnoush et al. (2015), đau bụng ở trẻ sơ sinh Chau et al. (2016), viêm khớp dạng thấp Zamani et al. (2016), béo phì Song et al. (2020), tiểu đường Soleimani et al. (2017), bệnh Alzheimer bởi Akbari et al. (2016) và bệnh Parkinson Barichella et al. (2016)

1.1.2. Vi khuẩn lactic

Vi khuẩn acid lactic (LAB) là men vi sinh có lợi cho sức khỏe phù hợp với đường tiêu hóa của con người. LAB là vi khuẩn gram dương (Wu et al., 2022), chúng có thể sản xuất exopolysaccharide (EPS), một số EPS giúp chống oxy hóa, các khối u và các hoạt động về miễn dịch, ngoài ra còn giảm mức cholesterol (Zhu et al., 2018). Nhóm men vi sinh chính gồm có vi khuẩn acid lactic (LAB), *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* là những vi sinh vật probiotic được thường xuyên sử dụng và công nhận nhiều nhất (Reque & Brandelli, 2021). Một số vi khuẩn acid lactic thường được biết đến là *L. plantarum*, *Pediococcus*, , *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. fermentum*, *Lactococcus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella*, *Streptococcus* và *Bifidobacterium* (Wu et al., 2022). Sự sống sót của men vi sinh được thách thức qua một số điều kiện trong quá trình chế biến cũng như các môi trường tiêu hóa khắc nghiệt. Vi khuẩn sản xuất acid lactic thường xuyên được sử dụng trong vài sản phẩm lên men (sữa chua, phô mát, kefir, v.v.), cùng với đó chúng cũng thường xuyên được dùng để lên men sữa và sản xuất bia. Bên cạnh ngành thực phẩm, LAB đang được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác, chẳng hạn như được sử dụng để sản xuất acid lactic có giá trị cao (Wu et al., 2022). Công dụng của vi khuẩn acid lactic trong công nghệ thực phẩm rất đa dạng như tạo vị chua, tạo độ gel sữa, khử lactoza và tạo mùi thơm. Ngoài việc chuyển hóa prebiotic, acid lactic cũng được ứng dụng nhiều trong một số các chế phẩm sinh học mang lại nhiều lợi ích về mặt sức khỏe cho con người. Chế phẩm sinh học có chứa LAB có nhiều công dụng như giảm pH trong ruột, sản xuất hợp chất kháng khuẩn, giảm cholesterol trong máu, cải thiện hấp thụ canxi và điều chỉnh lại hệ vi sinh có trong đường tiêu hóa sau khi bị rối loạn tiêu chảy (Altamirano-Ríos et al., 2022).

Việc sử dụng men vi sinh trong lĩnh vực dược phẩm và thực phẩm khá phổ biến, bởi vì chúng thường được ứng dụng dưới dạng thuốc, thực phẩm bổ sung, sữa công thức cho trẻ nhỏ hoặc thức ăn cho chăn nuôi. Mặc khác, nhu cầu đối với các sản phẩm men

vi sinh không từ sữa đang tăng lên đáng kể, vì chúng có hàm lượng đường sữa và cholesterol thấp và không cần bảo quản lạnh. Tuy rằng nhu cầu sử dụng các loại sản phẩm chứa men vi sinh khá cao, nhưng việc đóng gói sẽ không đảm bảo có thể bảo vệ hoàn toàn men vi sinh khỏi bị bất hoạt khi đi qua môi trường tiêu hóa, nhưng nó có thể đảm bảo rằng một lượng men vi sinh sống đủ lớn sẽ đến được ruột (Gu et al., 2022). Do đó, tiềm năng bảo quản lợi khuẩn và sinh học của LAB là một chủ đề phổ biến ở thời điểm gần đây (Echegaray et al., 2023).

1.1.3. Định nghĩa prebiotic

“Hiệp hội Khoa học Quốc tế về Probiotic và Prebiotic đã định nghĩa prebiotic là chất nền có lợi đối với cơ thể khi sử dụng có chọn lọc bởi hệ vi sinh chủ”. Prebiotic còn được biết đến là các oligosaccharide như fructooligosaccharide, galactooligosaccharide, glucooligosaccharide và xylooligosaccharide; disaccharide như lactulose và isomaltulose; và các polysaccharide như inulin và polydextrose đến từ các nguồn khác nhau như thực vật, động vật, rong biển và vi khuẩn (Yoha et al., 2023). Prebiotic được dùng nhằm cải thiện sự cân bằng hệ vi sinh, cải thiện phát triển của vi khuẩn probiotic có trong hệ tiêu hóa (Reque & Brandelli, (2021); Yoha et al. (2023)).

Thông qua cơ chế lên men prebiotic, vi sinh vật có trong đường ruột tạo ra một số acid béo chuỗi ngắn bao gồm acid lactic, propionic và butyric để giảm thiểu đáng kể nguy cơ mắc ung thư đường ruột. Ngoài ra việc sử dụng prebiotic cũng giúp giảm thiểu những vấn đề như hoại tử khối u, cải thiện mật độ xương, cải thiện độ nhạy cảm insulin và tăng cường hấp thu dưỡng chất như canxi và magie. Theo Reque & Brandelli, (2021) prebiotic đạt chuẩn phải duy trì hoạt động ổn định, chống lại quá trình tiêu hóa và tăng cường sự phát triển của vi khuẩn có trong hệ tiêu hóa mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ. Việc bổ sung prebiotic như một giải pháp nhằm cải thiện sự cân bằng của hệ vi sinh cũng như tăng khả năng phát triển của probiotic. Nói cách khác, “prebiotic đóng vai trò là thức ăn cho lợi khuẩn, chúng có khả năng cải thiện khả năng tồn tại của probiotic qua đường tiêu hóa, cũng như tăng khả năng bám dính trong hệ tiêu hóa” (Altamirano-Ríos et al., 2022).

Trong thực phẩm inulin, fructooligosaccharit và glucooligosaccharide là những prebiotic phổ biến nhất được sử dụng, bao gồm cả thức ăn trẻ em. Sản xuất prebiotic

bằng cách thủy phân polymer bằng enzyme, ví dụ, oligofructose từ inulin hoặc bằng cách tổng hợp oligosaccharide thông qua các phản ứng glycosyl hóa. Những prebiotic như là inulin, oligofructose hoặc fructooligosaccharit được nghiên cứu rộng rãi và kết quả của một số báo cáo cho thấy rằng việc sử dụng fructan trong chế độ ăn giúp kích thích hệ vi khuẩn đường ruột phát triển hiệu quả hơn (Singh et al., 2017).

Việc sử dụng probiotic trong ngành dược phẩm và thực phẩm khá phổ biến, vì chúng thường được sử dụng dưới dạng thuốc, thực phẩm, thực phẩm y tế, thực phẩm bổ sung, sữa công thức cho trẻ sơ sinh hoặc thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, nhu cầu đối với các sản phẩm men vi sinh không từ sữa đang tăng lên đáng kể, vì chúng có hàm lượng đường sữa và cholesterol thấp và không cần bảo quản lạnh. Mặc dù nhu cầu sử dụng sản phẩm chứa men vi sinh khá cao, nhưng việc đóng gói sẽ không đảm bảo có thể bảo vệ hoàn toàn men vi sinh khỏi bị bất hoạt khi đi qua môi trường tiêu hóa, nhưng nó có thể đảm bảo rằng một lượng men vi sinh sống đủ lớn sẽ đến được ruột. Do đó khả năng tồn tại của probiotic có thể được cải thiện hơn nữa bằng cách đóng gói chúng với prebiotic, dược phẩm dinh dưỡng hoặc các chủng men vi sinh khác để có thể mang lại nhiều hơn những lợi ích về sức khỏe cho chủ thể (Gu et al., 2022)

1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU

Alameri et al. (2022) đã điều tra các đặc tính sinh học tiềm năng của một số vi khuẩn acid lactic phân lập từ các sản phẩm rau như cà chua, dưa chuột, dâu tây, đào, rau diếp, rau mùi tây và bắp cải. Kết quả của báo cáo này cho thấy rằng, tỷ lệ sống sót của các chủng phân lập sau G120 dao động từ 8,0 đến 8,6 Log₁₀ CFU/mL. Sau giai đoạn đường ruột (IN-120), số lượng vi khuẩn dao động từ 7,3 đến 8,5 Log₁₀ CFU/mL. Tỷ lệ dung nạp mật acid cholic (từ 17,8 đến 51,1%), oxgall (33,6 đến 63,9%) và acid taurocholic (55,9 đến 72,5%). Các chủng phân lập có thể gắn tương đương với tế bào HT-29, với mức trung bình là 8,03 Log₁₀ CFU/mL sau 2 giờ. Tất cả các chủng phân lập đều kháng lysozyme và vancomycin, trong đó có 8 chủng phân lập được chọn cho thấy khả năng tạo ra exopolysaccharide (EPS). Trình tự 16S rRNA đã giải thích, LAB phân lập được xác định là *E. durans*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici* và *E. Lactis*.

Edalati et al. (2019) đã phân lập và xác định LAB gồm *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides* và *Weissella* từ sữa lạc đà bằng phương pháp xác định kiểu hình, kiểu gen xác định bằng cách khuếch đại RNA ribosome 16S bằng PCR và giải trình tự. Ngoài ra, còn đánh giá khả năng bảo vệ tự nhiên của sữa lạc đà chống lại *S. aureus* và *E. coli* ATCC 25922. Kết quả thấy được 32 chủng LAB được phân lập đều là vi khuẩn Gram dương. Một số nấm men và vi khuẩn dương tính với Catalase. Chỉ có 8 chủng ổn định sau khi cấy truyền và thanh lọc; do đó chúng đã được nghiên cứu. Các chủng sau khi phân lập được chia thành ba nhóm chính *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*. *Leuconostoc* giả định thay đổi từ $4,7 \times 10^2$ đến $4,9 \times 10^7$ CFU/mL với mức trung bình là $6,2 \times 10^6$ CFU/mL. *Lactobacilli* giả định nằm trong khoảng từ $1,5 \times 10^2$ đến $5,1 \times 10^7$ CFU/mL với mức trung bình là $5,9 \times 10^6$ CFU/mL. Số lượng *Weissella* giả định nằm trong khoảng từ $4,9 \times 10^2$ đến $5,8 \times 10^7$ CFU/mL với mức trung bình là $7,3 \times 10^6$ CFU/mL.

Nath et al. (2020) đã thực hiện phân lập và xác định vi khuẩn từ các mẫu sữa tươi lên men có lợi cho sức khỏe khi tiêu thụ. Đánh giá hoạt tính sinh học của vi khuẩn được tiến hành bằng một số thử nghiệm *in vitro*. Kết quả thể hiện, chủng *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) được phân lập từ sữa tươi lên men bằng các xét nghiệm sinh hóa và nhận dạng 16S rRNA có khả năng chống chịu đáng kể với dịch dạ dày mô phỏng (ở pH 3), tỷ lệ sống sót là 93,48–96,97%. Cùng với đó, kết quả còn cho thấy chủng vi sinh vật nhạy cảm với gentamicin, tetracycline, kanamycin, meropenem và ceftriaxone và thể hiện khả năng chống lại các vi khuẩn gây bệnh.

dos Santos Leandro et al. (2021) đã tiến hành phân lập và mô tả đặc điểm của vi khuẩn acid lactic có tiềm năng sinh học trong thức ăn ủ chua của các loài cây thức ăn gia súc khác nhau, hạt ca cao và xúc xích Ý thủ công. Kết quả cho thấy trong tổng số 82 chủng phân lập đã thu được và được sàng lọc về khả năng chống chịu pH 2,0 và khả năng phát triển khi có muối mật (1,0 và 2,0%). Chỉ có 19 chủng đồng thời thể hiện khả năng chịu pH 2.0 và muối mật. Các chủng đã xác định được đánh giá về khả năng sống sót trong điều kiện dạ dày và tuyến tụy mô phỏng. Sự suy giảm khả năng tồn tại của các chủng *L. plantarum* SBR64.7, *L. buchneri* SS50.4 và *L. fermentum* SS50.10 sau khi tiếp xúc với dịch vị mô phỏng là giữa 1,07 và 1,24 chu kỳ logarit. tỷ lệ tương đồng của các chủng phân lập cao hơn 90% là C4848.7/C4820.2 (ca cao phân lập),

SBR64.12/SBR64.13 (ủ chua *Brachiaria*) và SBR64.5/ SBR64.6 (ủ chua *Brachiaria*).
Chủng *L. plantarum* SBR64.2 có tỷ lệ bám dính tế bào CaCO₂ cao nhất (88,41%).

Amin et al. (2020) đã khảo sát phân lập và xác định LAB nuôi cấy được liên kết với đường tiêu hóa của giống lai bào ngư ở ba giai đoạn vòng đời khác nhau, cũng như sàng lọc LAB bản địa về hoạt tính kháng khuẩn chống lại tám mầm bệnh vi khuẩn. Không có LAB nào được phân lập từ đường tiêu hóa của bào ngư ở giai đoạn ấu trùng. Dựa trên một phần trình tự của gen 16S rRNA, 44 LAB ở giai đoạn vị thành niên được xác định là 5 chi và thuộc 10 kiểu ribotype. Trong khi 49 LAB phân lập từ giai đoạn trưởng thành được xác định là 3 giống và thuộc 8 ribotype. Trong số 93 LAB, có 5 chủng là *Enterococcus faecium* MA002, *E. lactis* MA056, *Leuconostoc mesenteroides* MA064, *E. lactis* MA068 và *E. lactis* MA084 thể hiện các khả năng chống lại vi khuẩn gây bệnh (*Vibrio alginolyticus* và *Listeria monocytogenes*). Năm chủng LAB không thể hiện bất kỳ hoạt động tán huyết nào, có thể cho thấy rằng chúng không phải là mầm bệnh.

Zulkhairi Amin et al. (2019) đã thực nghiệm phân lập và xác định các đặc tính sinh học của các loài *Bacillus* từ mật của loài ong chích *Heterotrigona itama*. Trong số 58 chủng phân lập, chỉ có 23 chủng có thể chịu được nồng độ cao của 7% NaCl. Phân tích trình tự gen 16S rRNA của 23 chủng phân lập được chọn cho thấy loài *Bacillus* được chú ý nhất trong nghiên cứu này là *B. altitudinis* (33%) và *B. pumilus* (34%), tiếp theo là *B. amyloliquefaciens* (8%), *B. megaterium* (13%), *B. subtilis* (4%), *B. aryabhatai* (8%) (trùng đồng từ 98%–100%). Tỷ lệ sống sót của chúng trong điều kiện acid cũng tương đương với chủng lợi khuẩn thương mại, *Lactobacillus rhamnosus* GG. Kết quả thực nghiệm thể hiện *B. amyloliquefaciens* HTI-19 và *B. subtilis* HTI-23 có nguồn phân lập là mật ong rừng mang đặc tính sinh học tốt đáng kể.

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

2.1.1. Kim chi

Kim chi cải thảo cắt lát thương mại (Bibigo, CJ (Hàn Quốc)), được sử dụng làm nguồn phân lập. Nguyên liệu được đóng trong túi plastic 100g/túi và bảo quản ở 4 °C.

2.1.2. Kefir

Kefir thương mại được sử dụng và bảo quản trong tủ mát 4 °C tại phòng thực hành Vi sinh, trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

2.1.3. Yến mạch

Yến mạch thương mại (công ty APIS, Việt Nam) được sử dụng làm nguồn lập và được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2. DỤNG CỤ – THIẾT BỊ – HÓA CHẤT

2.2.1. Dụng cụ

Bảng 2.1. Dụng cụ được sử dụng trong thực nghiệm

STT	Tên dụng cụ	STT	Tên dụng cụ
1	Cốc	5	Giá ống nghiệm
2	pH kế	6	Đĩa thủy tinh
3	Erlen	7	Ống nghiệm
4	Bình định mức	8	Ống ly tâm
5	Micropipet	9	Phễu

2.2.2. Thiết bị



Hình 2.1. Cân kỹ thuật 2 số lẻ PA2102 (Ohaus Corporation, New Jersey, USA).



Hình 2.4. Bể điều nhiệt WB-22 (DaiHan Scientific, Hàn Quốc).



Hình 2.7. Máy đếm khuẩn lạc FTCC-10 (Sci Finetech, Hàn Quốc)



Hình 2.2. Máy đo pH để bàn MI 150 (Milwaukee Instruments, Romania).



Hình 2.5. Thiết bị nổi hấp tiệt trùng HAC080 (LK LAB, Hàn Quốc).



Hình 2.8. Tủ an toàn sinh học cấp II 11235BBC86 (Biobase - Trung Quốc)



Hình 2.3. Máy lắc vortex kỹ thuật số ZX4 (Velp Scientifica, Usmate, Italia)



Hình 2.6. Kính hiển vi quang học 3 mắt có cổng gắn CAMERA BS 1153-EPL (Euromex, Hà Lan).



Hình 2.9. Tủ sấy đối lưu cưỡng bức LO-FS100 (LK LAB - Hàn Quốc)

2.2.3. Hóa chất

Hóa chất được sử dụng trong quá trình nghiên cứu bao gồm glycerol (C₃H₈O₃) (Trung Quốc), NaNO₂, K₂HPO₄, NaCl, NaHCO₃, CaCl₂.2H₂O, NaHCO₃, acid clohydric, KCl, CaCl₂, MgCl₂.6H₂O, agar (Trung Quốc) và các loại hóa chất khác đều đạt chuẩn để sử dụng trong phân tích.

2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.3.1. Thời gian nghiên cứu

Từ ngày 15/2/2023 đến ngày 3/6/2023

2.3.2. Địa điểm nghiên cứu

Phòng thí nghiệm Vi Sinh, lầu 4, Khoa Kỹ thuật Thực phẩm và Môi trường, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, 331 Quốc lộ 1A, Phường An Phú Đông, Quận 12, Thành phố Hồ Chí Minh

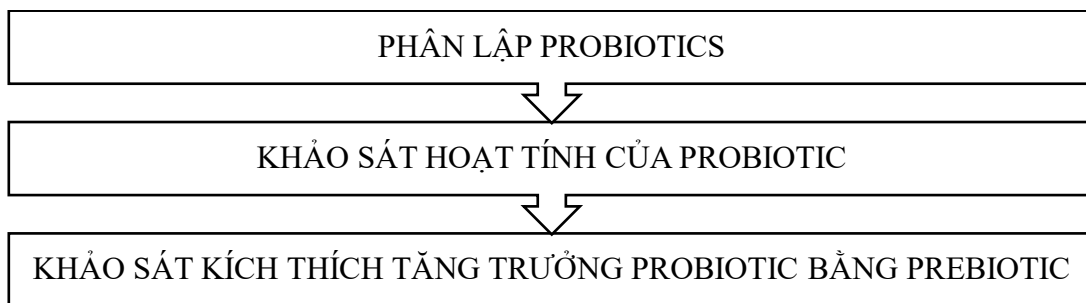
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Quy trình phân lập probiotic

Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn acid lactic được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau bao gồm yến mạch (O), kim chi (KC) và kefir (KF). Để phân lập, mẫu được tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở điều kiện 37 °C trong 48–72h trước khi được pha loãng thập phân với nước muối. Sau đó, 0,1 mL mẫu pha loãng được trang đều trên đĩa thạch MRS và được ủ ở điều kiện 37 °C trong 24h. Quy trình cấy chuyển được thực hiện nhiều lần đến khi thu được khuẩn lạc thuần cho quá trình định danh dựa trên hình thái, kiểm tra sinh hóa và giải trình tự gen 16S rRNA. Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc được kiểm tra và quan sát thông qua kính hiển vi ở độ phóng đại 100x bằng kỹ thuật nhuộm Gram. Ngoài ra, các kiểm tra sinh hóa như kiểm tra catalase và oxidase cũng được tiến hành. Định danh vi sinh vật từ đoạn gene được khuếch đại và giải trình tự gen 16S rRNA bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi gồm mồi xuôi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và mồi ngược 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Phần mềm BLAST được sử

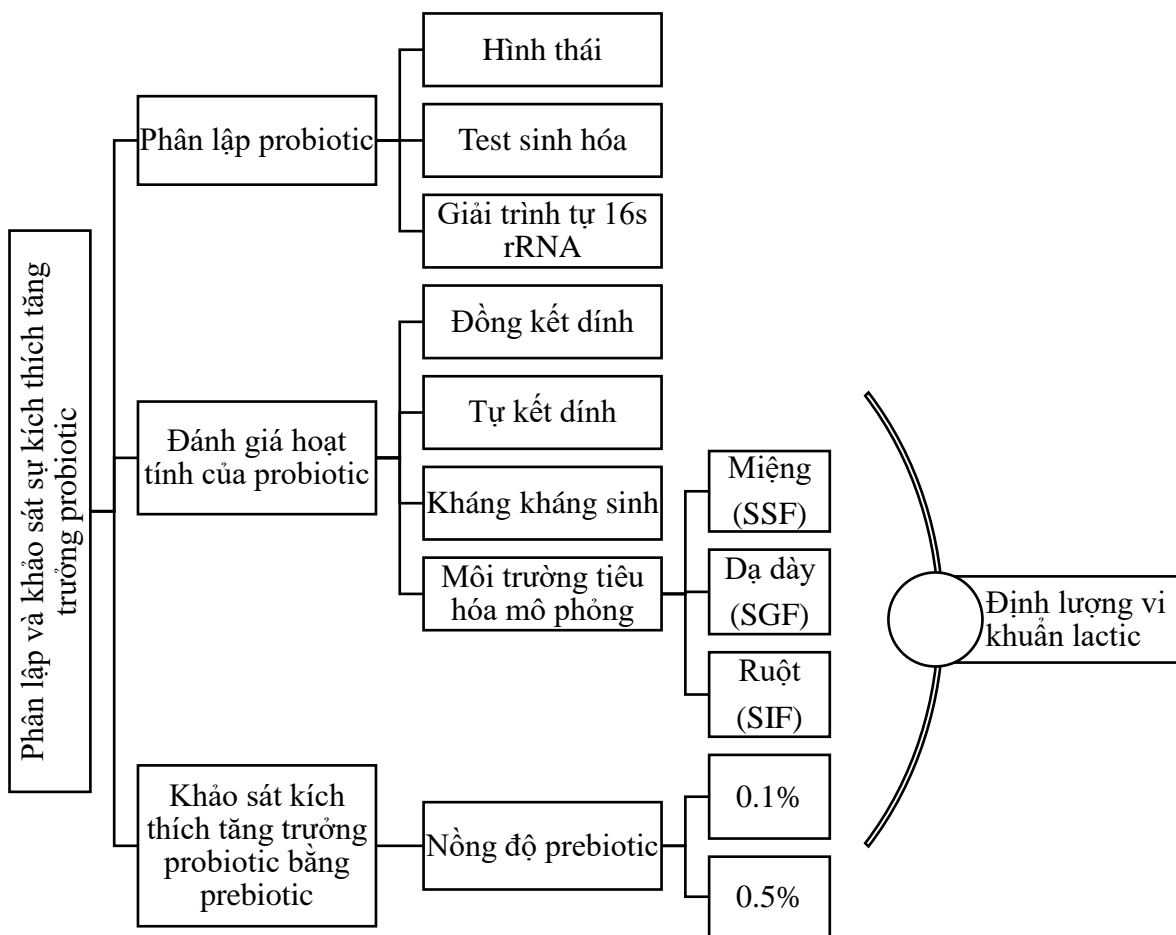
dụng nhằm đối chiếu tỷ lệ tương thích của chuỗi trình tự vùng 16S rRNA với các thông tin dữ liệu có trên ngân hàng gene của NCBI nhằm xác định được tên loài của các chủng.

2.4.2. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.10. Sơ đồ nghiên cứu

2.4.3. Bố trí thí nghiệm



Hình 2.11. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

2.5. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

2.5.1. Phương pháp phân lập probiotics

2.5.1.1. Nhuộm gram

Nhuộm Gram là một phương pháp nhuộm quan trọng được dùng để xác định hình thái của vi khuẩn, khả năng bắt màu cũng như cách sắp xếp của chúng. Vi khuẩn cần được dàn đều lên trên lam kính sạch. Cố định vi khuẩn không di chuyển bằng ngọn lửa của đèn cồn. Sau khi cố định, cần được làm nguội 5 phút mới tiến hành nhuộm Gram. Đầu tiên phủ dung dịch tím Gentian và để trong 30 giây, sau đó rửa lại với vòi nước có dòng chảy ở mức độ nhẹ. Dung dịch Lugol được phủ lên lam kính để giữ màu trong 30 giây, tiếp tục rửa qua với nước. Tẩy màu bằng cồn 95% để yên lam kính trong 30 giây, rửa qua với nước. Cuối cùng, dung dịch đỏ Fuchsin được phủ lên lam kính 30 giây và rửa sạch thuốc nhuộm. Lam kính chứa khuẩn đã nhuộm được để khô tự nhiên và soi dưới thấu kính 100X. Vi khuẩn chuyển sang màu hồng là Gram âm, màu tím là Gram dương (Tripathi and Sapra, 2020).

2.5.1.2. Thử catalase

Thử nghiệm catalase được sử dụng nhằm khảo sát khả năng sản xuất enzyme catalase của vi khuẩn (Zai et al., 2021). Nhỏ một giọt H_2O_2 3% vào bề mặt của một lam kính hiển vi bằng phương pháp vô trùng. Trải đều vi khuẩn vào dung dịch H_2O_2 3% và quan sát phản ứng sủi bọt hoặc không sủi bọt. Phản ứng cho kết quả dương tính khi sự hình thành bọt khí O_2 và kết quả catalase âm tính khi không có sự xuất hiện của bọt khí (Ismail et al., 2018)

2.5.1.3. Thử oxidase

Phương pháp thử nghiệm oxidase được dùng nhằm xác định khả năng sinh ra enzyme oxidase của vi khuẩn. Sau khi nhúng giấy lọc với chất nền dihydrochloride tetramethyl-pphenylenediamine 1%, khuẩn lạc được trải đều trên bề mặt giấy lọc bởi que cấy gỗ và sau 60 giây xuất hiện hiện tượng thay đổi màu Yousef et al. (2018), dương tính khi có màu tím xuất hiện trong 10 giây và khi không có sự thay đổi màu thì kết quả là âm tính (Prince, 2009).

2.5.1.4. Thử nghiệm lên men carbohydrate

Thử nghiệm lên men carbohydrate được dùng nhằm khảo sát khả năng lên men đường của vi khuẩn. Một số loại đường sử dụng như là glucose, sucrose, lactose, maltose, gelatin, casein, tinh bột, maltose, maltodextrin và glycerol. Vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường bổ sung các loại carbohydrate tương ứng cùng với chỉ thị màu phenol red và một ống Durham được giữ chìm. Kiểm tra sự thay đổi màu sắc của môi trường nuôi cấy vi khuẩn sau khi các ống canh trường được cấy và ủ ở 37 °C trong 48 h (Watson et al., 2013).

2.5.1.5. Phương pháp giải trình tự gen

Các chủng vi sinh vật sau khi được nuôi cấy ở môi trường đã được chọn lọc và làm thuần và định danh thông qua phương pháp sinh học phân tử. Đoạn gene 16S rRNA của vi khuẩn lactic được khuếch đại và giải trình tự gen bằng phương pháp PCR sử dụng cặp môi gồm môi xuôi 27F: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và môi ngược 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'). Sau đó, trình tự gene của chủng vi khuẩn được so sánh với những chuỗi gene khác bằng phần mềm BLAST lên hệ thống thông tin trên NCBI để xác định chính xác tên loài của từng chủng (Pichler et al., 2018).

2.5.2. Xác định hoạt tính probiotics

2.5.2.1. Đánh giá đường cong sinh trưởng của các chủng probiotic

Vi khuẩn được tiến hành tăng sinh trong môi trường MRS lỏng và được ủ 37 °C. Sau đó định lượng vi khuẩn lactic bằng cách sử dụng phương pháp cấy trang, canh trường của vi khuẩn trên môi trường MRS và được ủ 37 °C trong 48 giờ, thực hiện liên tục trong 10 ngày và ghi nhận mật độ vi khuẩn.

2.5.2.2. Khả năng đồng kết dính với vi khuẩn gây bệnh *Escherichia coli*

Đánh giá khả năng đồng kết dính của lợi khuẩn với vi khuẩn gây bệnh được thực hiện dựa trên phương pháp của (Gómez et al., 2016). Đầu tiên, vi khuẩn lactic và vi khuẩn gây bệnh *Escherichia coli* được nuôi ở 37 °C trong 48 giờ sử dụng môi trường tương ứng lần lượt là MRS lỏng và MHB. Sau đó, sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng phương pháp ly tâm 8000 vòng/phút (20 phút). Tiếp theo sinh khối được rửa lặp lại 5 lần với dung dịch đệm PBS (pH = 7) và tái huyền phù trong dung dịch đệm PBS đến OD₆₀₀ = 1. Cuối cùng,

huyền phù của vi khuẩn lactic và vi khuẩn gây bệnh được trộn lẫn vào nhau với tỉ lệ 1:1. Các mẫu thử nghiệm được ủ ở 37 °C trong 5 giờ. Sau mỗi giờ dịch nổi được thu nhận và tiến hành đo OD₆₀₀.

2.5.2.3. Khả năng tự kết dính

Khả năng tự kết dính của vi khuẩn lactic được xác định dựa trên phương pháp của Gómez et al. (2016). Ban đầu, vi khuẩn lactic được tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở 37 °C trong 48 giờ. Sinh khối tế bào của vi khuẩn lactic được thu nhận bằng phương pháp ly tâm dịch nuôi cấy 8000 vòng/phút trong 20 phút. Tiếp theo sinh khối được rửa bằng dung dịch đệm PBS (pH = 7) và tái huyền phù trong đệm PBS đến OD₆₀₀ = 1. Huyền phù được để yên liên tục trong 5 giờ ở 37 °C, sau mỗi giờ ủ tiến hành thu nhận dịch nổi và đo mật độ quang OD₆₀₀.

2.5.2.4. Khả năng kháng kháng sinh

Dựa theo phương pháp của SUKMARINI et al. (2014) xác định khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn. Ban đầu, các chủng vi khuẩn lactic được tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở 37 °C trong 48 giờ. Sau đó, dịch tăng sinh vi khuẩn được tiến hành pha loãng thành dãy nồng độ (độ pha loãng 10 lần). Tiếp theo, 0,1 mL dịch vi khuẩn tăng sinh được trang đều trên môi trường thạch MRS có chứa nồng độ kháng sinh tương ứng theo quy định của Viện Tiêu chuẩn xét nghiệm lâm sàng – Mỹ (CLSI) về thử nghiệm độ nhạy kháng sinh, sử dụng đĩa thạch MRS không bổ sung kháng sinh làm đối chứng. Ghi nhận kết quả số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch sau khi ủ 48 giờ ở 37 °C.

2.5.2.5. Khả năng sống sót trong môi trường mô phỏng dịch tiêu hóa

Phương pháp của Chávarri et al. (2010) được sử dụng để xác định khả năng sống sót của LAB trong đường tiêu hoá dựa trên cơ sở định lượng số tế bào vi khuẩn còn sống sót sau thời gian ủ ở từng môi trường mô phỏng nước bọt, dịch dạ dày và ruột. Trong đó, dịch mô phỏng nước bọt (simulated salivary fluid – SSF) (g/L) bao gồm: 0,03g/L NaNO₂, 0,2g/L K₂HPO₄, 0,5g/L NaCl, 4,2g/L NaHCO₃, 0,6g/L a-amilase. Dịch dạ dày mô phỏng (simulated gastric fluid – SGF) bao gồm: K₂HPO₄ 2,2g/L, NaCl 6,2g/L, CaCl₂.2H₂O 6,3g/L, NaHCO₃ 1,2g/L và được điều chỉnh về pH 2,0 bằng acid clohydric 0,1 M. Dịch ruột mô

phông (simulated intestinal fluid – SIF) được tạo ra bằng cách hòa tan 0,3% muối mật trong dung dịch ruột mô phông bao gồm: 0,5616g/L (NaCl), 0,5066 g/L (KCl), 0,22 g/L (CaCl₂) và 3,57g/L (NaHCO₃), 0,1088g/L (K₂HPO₄), MgCl₂.6H₂O 0,2233g/L pH cuối đạt 7,0. 1 mL các chủng vi khuẩn lactic sau khi tăng sinh với nồng độ vi khuẩn xác định ban đầu được ủ trong 9 mL dịch mô phông nước bọt, dịch mô phông dạ dày và ruột non được ủ liên tục trong 5 giờ. Cuối cùng, sau thời gian ủ các ống dịch mô phông được pha loãng thành dãy nồng độ (độ pha loãng 10 lần) và 0,1 mL dịch từ các ống pha loãng được trang đều trên bề mặt thạch MRS, vi khuẩn không ủ trong dịch mô phông được sử dụng làm đối chứng. Ghi nhận khuẩn lạc có trên đĩa thạch sau 48 giờ ủ ở 37 °C.

2.5.3. Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng bằng prebiotic

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng lần lượt 0,01g và 0,05g prebiotic cho vào các ống nghiệm được bổ sung thêm 0,1g đường sucrose hòa tan cùng với 10 mL nước cất, hấp tiệt trùng 121 °C , 15 phút. Sau khi làm nguội, 0,1mL vi khuẩn đã được tăng sinh và pha loãng ở nồng độ 10⁻³ trước khi được thêm vào hỗn hợp, ủ 48 giờ ở 37 °C . Sau khi ủ, các ống khuẩn được tiến hành cấy trang với nồng độ pha loãng từ 10⁻² đến 10⁻⁴, đọc kết quả các đĩa sau khi được ủ 48 giờ ở 37 °C.

2.6. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Tất cả xử lý thống kê được thực hiện trên R version 4.1.2 R Core Team (2013) sử dụng gói lệnh FactoMineR (Husson et al., 2016; Lê et al., 2008). Phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Tukey được thực hiện để xác định sự khác biệt có nghĩa giữa các mẫu ở mức ý nghĩa 5%.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI SINH VẬT

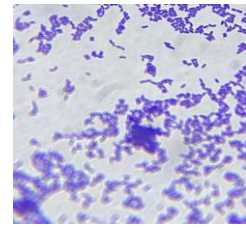
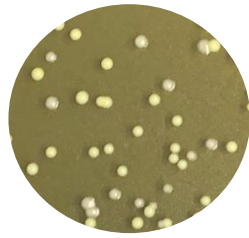
3.1.1. Phân lập và quan sát đặc điểm hình thái của các chủng

Trên môi trường MRS, các chủng vi khuẩn được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như kim chi, kefir và yến mạch. Quá trình phân lập và làm thuần các chủng tạo probiotic có lợi cho sức khỏe của người được viết tắt theo nguồn phân lập như là kim chi là KC, kefir là KF và yến mạch là O, các chủng có ký hiệu lần lượt là KC1, KC2, KF1, KF2, O. đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng sau khi được phân lập và làm thuần được trình bày ở **Bảng 3.1**.

Từ mẫu kim chi, kefir và yến mạch sau 48 giờ nuôi cấy đã phân lập và làm thuần được 5 chủng vi khuẩn (KC1, KC2, KF1, KF2, O). Nhìn chung, đa số khuẩn lạc đều có màu trắng ngà hoặc vàng, tuy nhiên hai chủng KF1 và O có khuẩn tròn, bề mặt dày sinh nhầy. Từ kết quả nhuộm Gram thấy rằng KF2, O thuộc vi khuẩn có Gram biến đổi, trong khi đó KC1, KC2 và KF1 có dạng que ngắn, có nổi đôi và là vi khuẩn Gram dương. Tương tự như nghiên cứu của Bajpai et al. (2016) *Pediococcus pentosaceus* 4I1 phân lập từ cá nước ngọt *Zacco koreaus* được xác nhận là có hình cầu khuẩn thuộc chủng phân lập gram dương và có hình que. Ngoài ra kết quả của Ismail et al. (2018) cho thấy phân lập được *Lactobacillus* tế bào hình que và *Enterococcus* tế bào hình cầu khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương và âm tính với catalase

Bảng 3.1. Mô tả đặc điểm và hình thái khuẩn lạc được phân lập từ các nguồn thực phẩm khác nhau

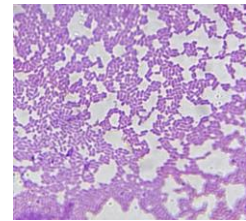
STT	Ký hiệu	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
1	KC1	Khuẩn lạc tròn, viền đều, bề mặt láng bóng, màu vàng.	Gram (+), hình que ngắn, có nổi đôi



Khuẩn lạc trắng, bóng, tròn đều, nhỏ.

Gram (+), hình que ngắn, có nối đôi

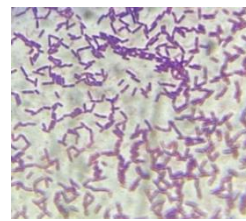
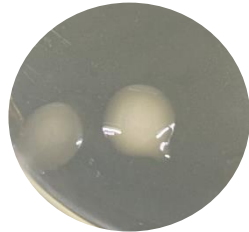
2 KC2



Khuẩn lạc tròn, bề mặt nhầy, bóng, viền đều, trắng đục

Gram (+), hình que ngắn xếp thành đôi

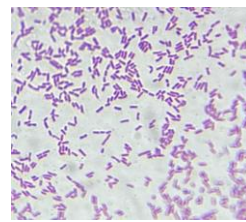
3 KF1



Khuẩn lạc trắng, tròn nhỏ, bờ đều.

Gram biến đổi, que ngắn, xếp thành đôi kế nhau.

4 KF2

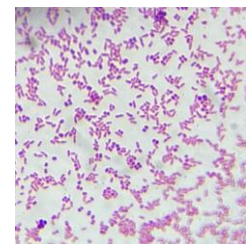


Khuẩn lạc tròn, bề mặt nhầy, bóng, viền đều, trắng trong.

Gram biến đổi, hình que ngắn.

5





















O







































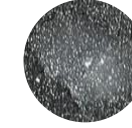




3.1.2. Kết quả kiểm tra sinh hóa

Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi sinh vật được trình bày ở **Bảng 3.2**, các chủng vi khuẩn probiotic đều có khả năng lên men carbohydrate, tuy nhiên ba chủng KC1, KC2 và KF1 đều cho kết quả dương tính với cả oxidase và catalase, và hai chủng còn lại âm tính với cả 2 thử nghiệm trên. Tương tự với nghiên cứu của Ibrahim et al. (2015) phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ xoài và nghiên cứu của Amelia et al. (2021) phân lập các chủng vi khuẩn lactic có lợi từ dadiah, các chủng vi khuẩn lactic thuộc Gram dương, hình que, có khả năng sử dụng đường glucose, không sinh enzyme catalase. Trong nghiên cứu này cũng đã chỉ ra rằng các đặc điểm sinh hóa riêng biệt của từng dòng nhờ vào khả năng riêng biệt của từng chủng cho thấy rằng vi khuẩn lactic sử dụng đa số các loại đường nhưng chủ yếu là đường lactose và glucose.

Bảng 3.2. Mô tả đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn

	Đối chứng	KC1	KC2	KF1	KF2	O
Lên men carbohydrate	Maltose					
		+	+	+	+	+
	Malto dextrin					
		+	+	+	+	+
	Glycerol					
	+	+	+	+	+	
	Tinh bột					
		+	+	+	+	+

Sucrose						
	+	+	+	+	+	+
D-glucose						
	+	+	+	+	+	+
Lactose						
	+	+	+	+	+	+
Casein						
	+	+	+	+	+	+
Gelatin						
	+	+	+	+	-	+
Oxidase						
	+	+	+	-	-	
Catalase						
	+	+	+	-	-	

3.1.3. Định danh bằng giải trình tự gen 16S

3.1.3.1. Kết quả định danh chủng KC1

Phương pháp sinh học phân tử cho thấy kết quả định danh đoạn gen khuếch đại từ dòng vi khuẩn KC1 có mức độ tương đồng với đoạn gen được mã hóa 16S rRNA của loài *Lactiplantibacillus plantarum* mã số (Accession number CP0528691.1) khi so sánh trên cơ

sở dữ liệu NCBI (**Hình 3.1**). Vì vậy dòng vi khuẩn KC1 được xác định thuộc loài *Lactiplantibacillus plantarum* và được đổi ký hiệu thành Lac_KC.

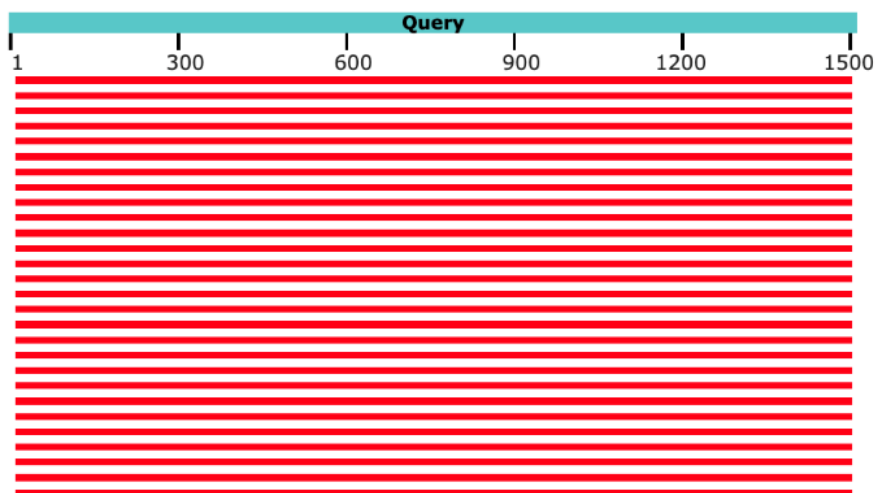
>KC1

TCTGTCCCACCGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACG
AACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCG
AACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTG
GAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGA
AAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATG
GTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAA
TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG
AGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCT
CAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACA
GTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAG
TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGG
GTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGC
TAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATT
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTT
ACCATCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGAC
ATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
CACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTAC
AACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT
CGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC

ACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAAC
CAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGTACCAGAGTT

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Lactiplantibacillus plantarum strain AMT74419 chromosome, complete genome	Lactiplantibacillus plantarum	2750	13715	98%	0.0	100.00%	3227194	CP052869.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactiplantibacillus plantarum strain SPC-SNU 72-2 chromosome, complete genome	Lactiplantibacillus plantarum	2750	13709	98%	0.0	100.00%	3037092	CP050805.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus pentosus strain HBUJAS58244 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus pentosus	2750	2750	98%	0.0	100.00%	1493	MT229656.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactiplantibacillus plantarum strain SRM102737 chromosome, complete genome	Lactiplantibacillus plantarum	2750	13720	98%	0.0	100.00%	3249738	CP028261.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactiplantibacillus plantarum strain SRM101518 chromosome, complete genome	Lactiplantibacillus plantarum	2750	13742	98%	0.0	100.00%	3213319	CP028241.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactiplantibacillus plantarum strain SRM101222 chromosome, complete genome	Lactiplantibacillus plantarum	2750	13742	98%	0.0	100.00%	3170950	CP028229.1

Distribution of the top 328 Blast Hits on 100 subject sequences



Hình 3.1. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn gen của dòng vi sinh vật loài *Lactiplantibacillus plantarum* với Lac_KC sử dụng dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI

3.1.3.2. Kết quả định danh chủng KC2

Kết quả định danh vi khuẩn KC2 có độ tương thích 99.62% so với dòng vi khuẩn *Pediococcus acidilactici* (Accession number KJ580428.1) khi được so sánh với mã gen trên hệ thống dữ liệu NCBI. Vì vậy từ kết quả trên **Hình 3.2** có thể xác định dòng vi khuẩn KC2 là thuộc loài *Pediococcus acidilactici* và tên được gọi trong nghiên cứu này là Ped_KC.

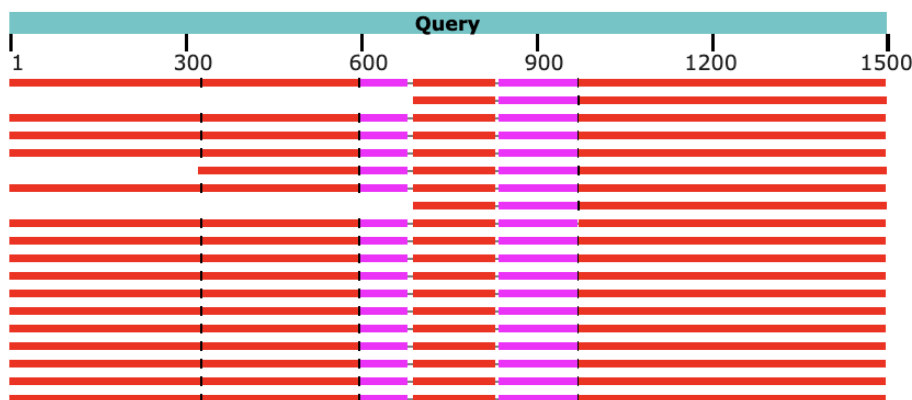
>KC2

CCCTAATCATCTGTCCACCTTAAGCGAGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCAC
CGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC

CGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
TCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGA
TTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGT
GTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC
GGTTTGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTA TCCCCAGGCGGAA
TGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTA
GCATTCATCGTTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACC
CATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACT
GGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTC
CTCTTCTGCACTCATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGA
AAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG
AAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAGAACGTGGGGTGAGAGTA
ACTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCAGTCCCACCGACGAAC
GCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGT
GCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTG
GGAAACCTGCCCAGAAGCGGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAACGCTGGCG
GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTG
CTTGC ACTGAATGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGCAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
TACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCAT
CACTTCTGGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT
GGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTC
GTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAGAACGTGGGGTGAGAGTAACTGTTACCCAGT
GACGGTATTTAACCAGAAAGCCA

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pediococcus lolii strain C-J66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus acidilactici	966	2447	98%	0.0	99.62%	1525	KJ580428.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pediococcus acidilactici partial 16S rRNA gene, strain PAC 1.0	Pediococcus acidilactici	966	1347	53%	0.0	99.62%	530	AJ249893.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pediococcus acidilactici strain lolii FS10 chromosome	Pediococcus acidilactici	963	12057	98%	0.0	99.44%	1961433	CP109913.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pediococcus acidilactici strain GC25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus acidilactici	961	2431	98%	0.0	99.43%	1538	MF289522.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pediococcus acidilactici strain CITKHZ7 chromosome	Pediococcus acidilactici	961	12155	98%	0.0	99.25%	2044183	CP096031.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone PI-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	961	1933	77%	0.0	99.43%	955	JN858928.1

Distribution of the top 1345 Blast Hits on 100 subject sequences



Hình 3.2. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn gen của dòng vi sinh vật loài *Pediococcus acidilactici* với Ped_KC sử dụng dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI

3.1.3.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn KF1

Vi khuẩn KF1 được đối chứng với các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI từ trình tự gen 16S rRNA. Kết quả so sánh chủng KF1 có mức độ tương thích hoàn toàn so với dòng vi khuẩn *Leuconostoc lactis* (Accession number MT229654.1). Điều đó xác định chính xác được chủng KF1 là *Leuconostoc lactis* (Hình 3.3) và được đổi tên thành Leu_KF.

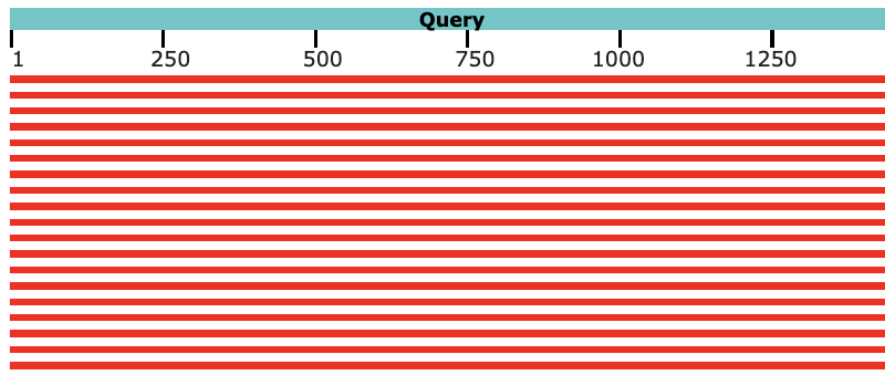
>KF1

```
GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGCAGCGAAAGGTGCTTGCAC
CTTCAAGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTGCCTCAAG
GCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTATC
GCATGATACAAAGTTGAAAGGCGCTACGGCGTCACCTAGAGATGGGTCCGCG
GTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGACAATGATGCATAGC
CGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCC
```

TACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAG
CAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGG
GAAGAAATGCTAGAATAGGGAATGATTCTAGTTCGACGGTACCATAACCAGAA
AGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCG
TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGA
GTGTTGTAGAGGTAAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATAT
ATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAACAAGTACGTTGA
GGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACC
GTAAACGATGAATACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCGAAGCT
AACGCATTAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGC
AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTCTAGAGATAGA
AGTGTCTTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTG
CCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGCGTATAACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTC
TTAAAGTACGTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGTCG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGG
CCTAACCTTATGGAGGGAGCCGTCTAAGGCAGGACAGA

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
		Download	Select columns	Show 100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results				
		MSA Viewer						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc lactis strain HBUAS56242 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leuconostoc lactis	2680	2680	100%	0.0	100.00%	1476	MT229654.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc lactis strain CBA3626 chromosome, complete genome	Leuconostoc lactis	2680	10711	100%	0.0	100.00%	1790249	CP042390.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc lactis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 1142	Leuconostoc lactis	2680	2680	100%	0.0	100.00%	1480	LC311733.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc garlicum strain KFRI01, complete genome	Leuconostoc garlicum	2680	10716	100%	0.0	100.00%	1663492	CP016329.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc lactis strain WIKim40, complete sequence	Leuconostoc lactis	2680	10722	100%	0.0	100.00%	1737502	CP016598.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc garlicum strain NU01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leuconostoc garlicum	2680	2680	100%	0.0	100.00%	1514	KX139188.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc lactis strain BBH 018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leuconostoc lactis	2680	2680	100%	0.0	100.00%	1491	QR267409.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leuconostoc lactis strain DS-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leuconostoc lactis	2680	2680	100%	0.0	100.00%	1467	KU665298.1

Distribution of the top 115 Blast Hits on 100 subject sequences



Hình 3.3. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn gen của dòng vi sinh vật loài *Leuconostoc lactis* với Leu_KF sử dụng dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI

3.1.3.4. Kết quả định danh chủng KF2

Từ đoạn gen 16S rRNA của dòng KF2 được thể hiện trên **Hình 3.4** có độ tương đồng cao so 99,93% với dòng vi khuẩn *Weissella cibaria* trên cơ sở dữ liệu NCBI. Do đó xác định được chủng KF2 là dòng vi khuẩn *Weissella cibaria* với tên được đổi thành Wei_KF.

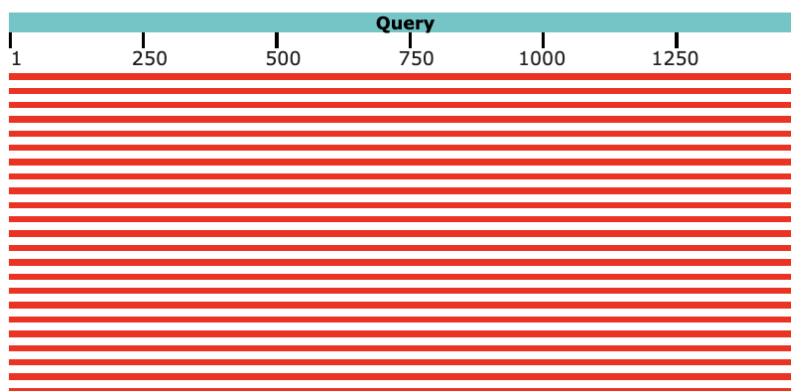
>KF2

```
ACTTCACCCTAATCATCTGTCCCACCTTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGTTACC
CCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA
GACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCC
GACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGACGTACTTTAAG
AGATTAGCTCACCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAAC
TAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
AGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAACGCTC
CATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC
TTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCT
GCGGCACTTAAGGGCGGAAACCCTCAAACACCTAGCACTCATCGTGTACGGT
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTCGAGCCTCAA
```

CGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCATATATC
TACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCCTCTACTGCACTCAAGTC
ATCCAGTTTCCAAAGCAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACTTCAGACT
TAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGA
ACATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTTCTTTCTGGTAA
GATACCGTCACACATTGAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTTACAACA
GTGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGC
TTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCC
GTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATC
GTCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAATAATGCACCGCGGGACCATCTC
TTAGTGATAGCAGAACCATCTTTTAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTA
TACGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTC
CCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGA
GCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACAAAGCGTTCGACTTGCA

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
		Download	Select columns	Show 100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results				
		MSA Viewer						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain DHR015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella cibaria	2715	2715	100%	0.0	99.93%	1514	MT012260.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain UPMC1238 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella cibaria	2715	2715	100%	0.0	99.93%	1565	MN700179.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain CBA3612 chromosome, complete genome	Weissella cibaria	2715	24363	100%	0.0	99.93%	2382774	CP041193.1

Distribution of the top 222 Blast Hits on 100 subject sequences



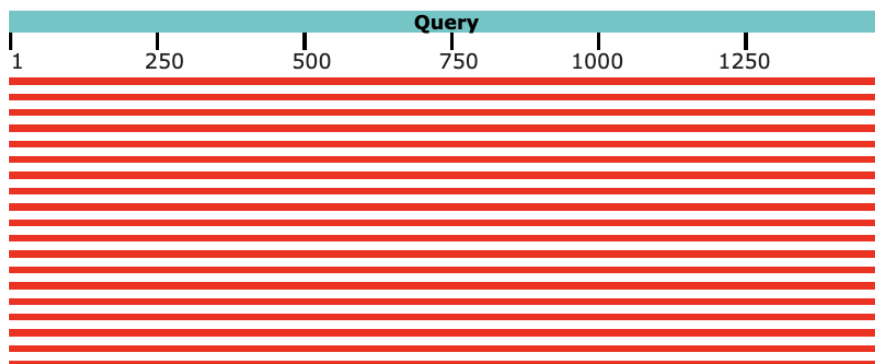
Hình 3.4. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn gen của dòng vi sinh vật *Weissella cibaria* với Wei_KF sử dụng dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI

3.1.3.5. Kết quả định danh O

Dựa vào việc so sánh độ tương đồng từ bộ gen 16S rRNA của chủng O trên cơ sở dữ liệu NCBI kết quả ở **Hình 3.5** cho thấy độ tương đồng với chủng *Weissella cibaria* (Accession number MT012260.1) là 99.53%. Vì vậy xác định được chủng O thuộc dòng vi khuẩn *Weissella cibaria* và tên được sử dụng để nhận dạng là Wei_O.

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain DHR015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella cibaria	2682	2682	100%	0.0	99.53%	1514	MT012260.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain UPMC1238 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella cibaria	2682	2682	100%	0.0	99.53%	1565	MN700179.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain CBA3612 chromosome, complete genome	Weissella cibaria	2682	24064	100%	0.0	99.53%	2382774	CP041193.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain OUCM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Weissella cibaria	2682	2682	100%	0.0	99.53%	1539	MK726127.1
<input checked="" type="checkbox"/> Weissella cibaria strain SRCM103448 chromosome, complete genome	Weissella cibaria	2682	24092	100%	0.0	99.53%	2397876	CP035267.1

Distribution of the top 222 Blast Hits on 100 subject sequences

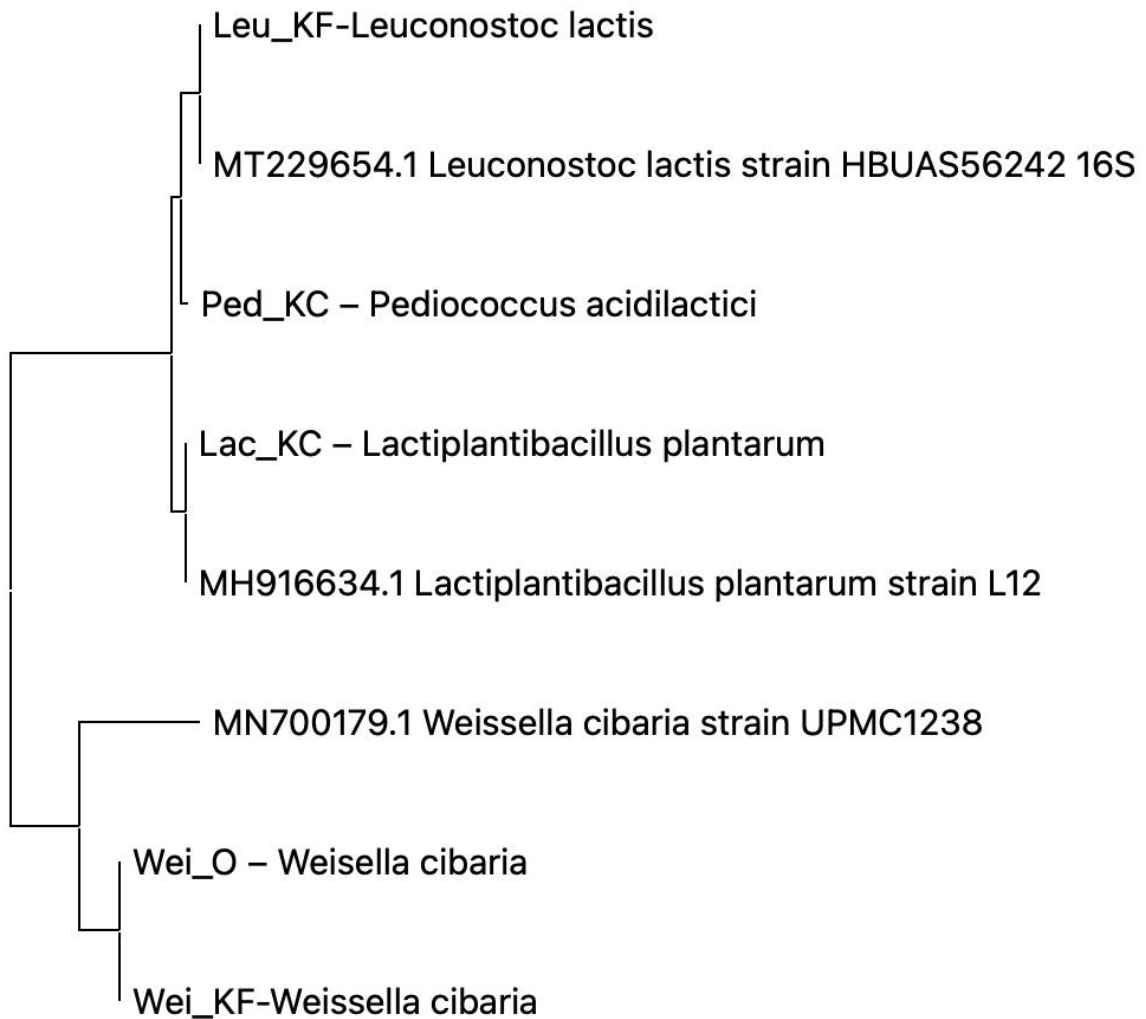


Hình 3.5. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn gen của dòng vi sinh vật *Weissella cibaria* với Wei_KF sử dụng dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI

>O

```
ACTTCACCCTAATCATCTGTCCCACCTTAGACGAGCTAGGCTCCCGAAGAGTT
ACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA
CAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGA
TTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGACGTA
TTAAGAGATTAGCTCACCTCGCGGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGTA
GCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCAC
CTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGG
```

CAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAAC
GCTCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG
TTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTC
CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTT
AGCTGCGGCACTTAAGGGCGGAAACCCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTTA
CGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTCGAGCC
TCAACGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATA
TATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCCTCTACTGCACTCA
AGTCATCCAGTTTCCAAAGCAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACTTCA
GACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCT
TGGAACATAACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACTTTAGCCGTTCTTTCTGGTAA
GATACCGTCACACATTGAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTTACAACA
GTGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGC
TTTCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCC
GTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATC
GTCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTC
TTAGTGATAGCAGAACCATCTTTTAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTA
TACGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTC
CCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTCTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGA
GCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACAAAGCGTTCGACTTGC

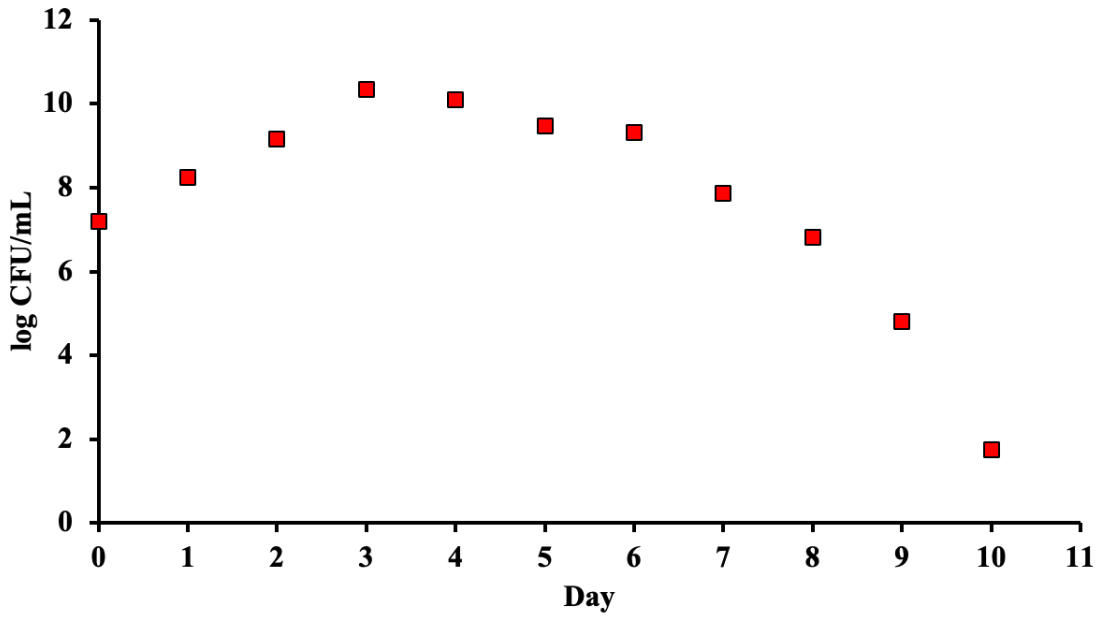


Hình 3.6. Sơ đồ cây phân nhánh

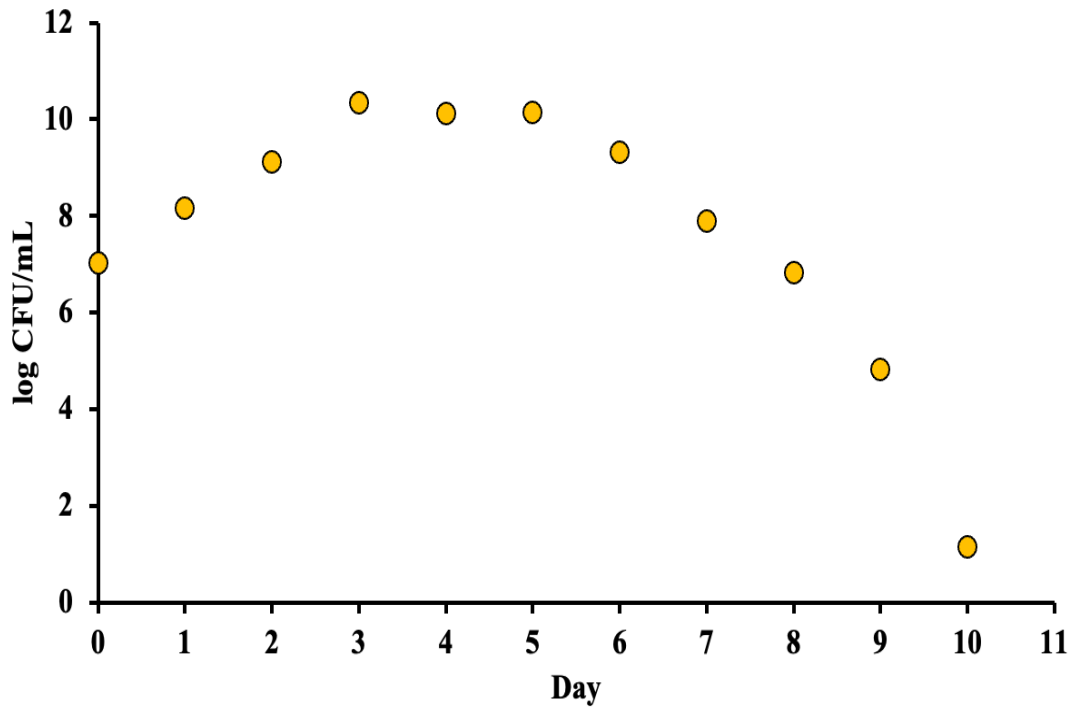
3.2. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH PROBIOTIC

3.2.1. Đường cong sinh trưởng của các chủng probiotic

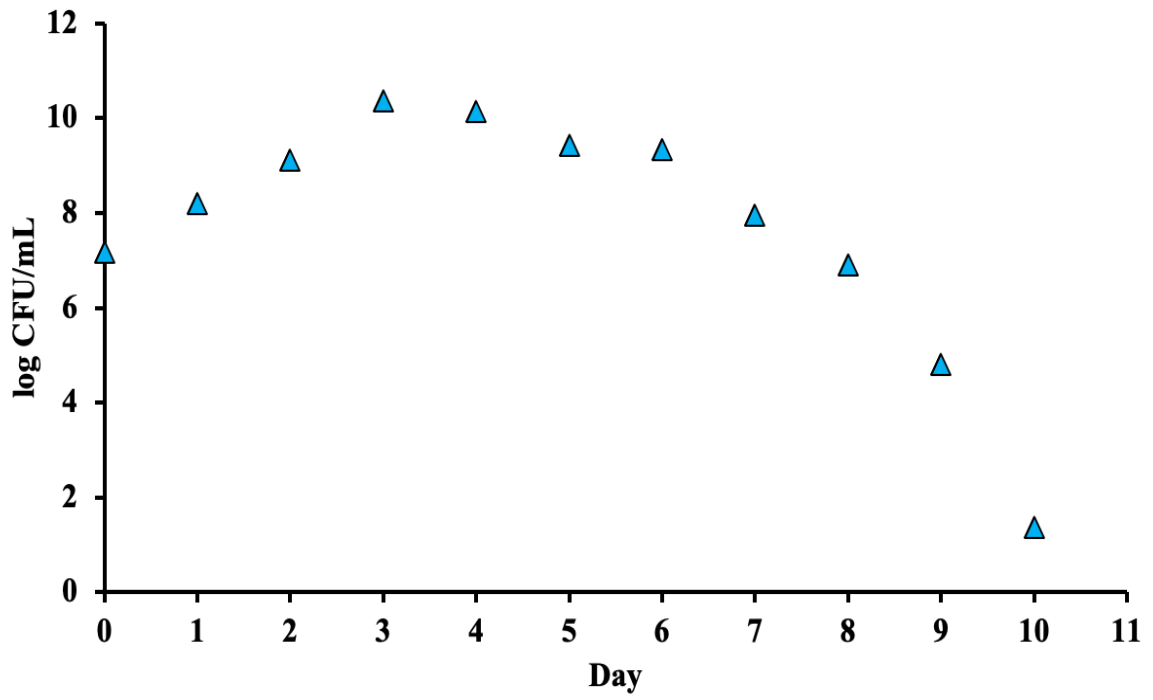
Mật độ sống sót của các chủng vi sinh vật probiotic bị chi phối bởi thời gian khảo sát được trình bày trong **Hình 3.7**.



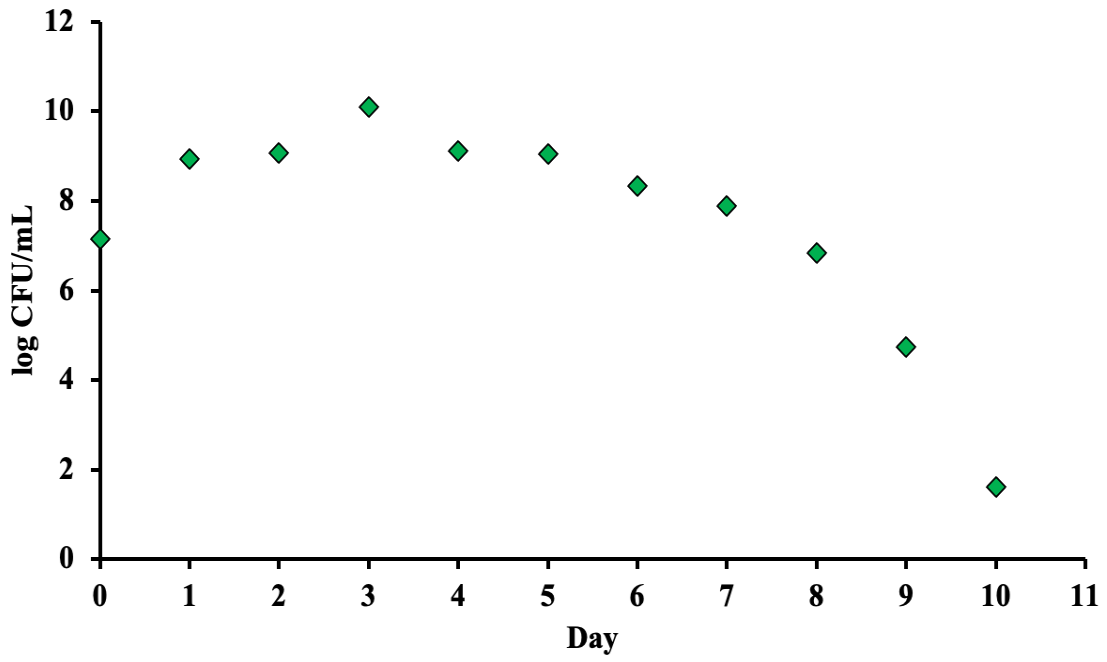
(A)



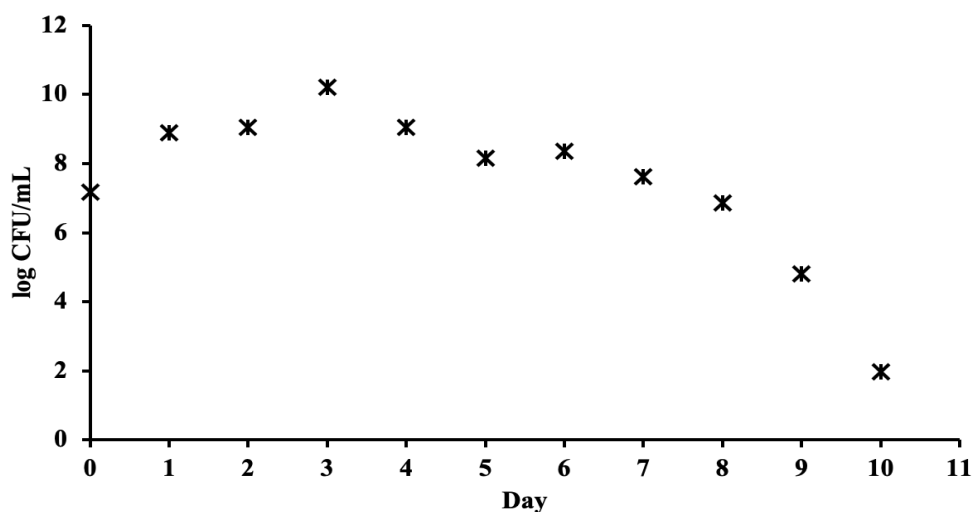
(B)



(C)



(D)



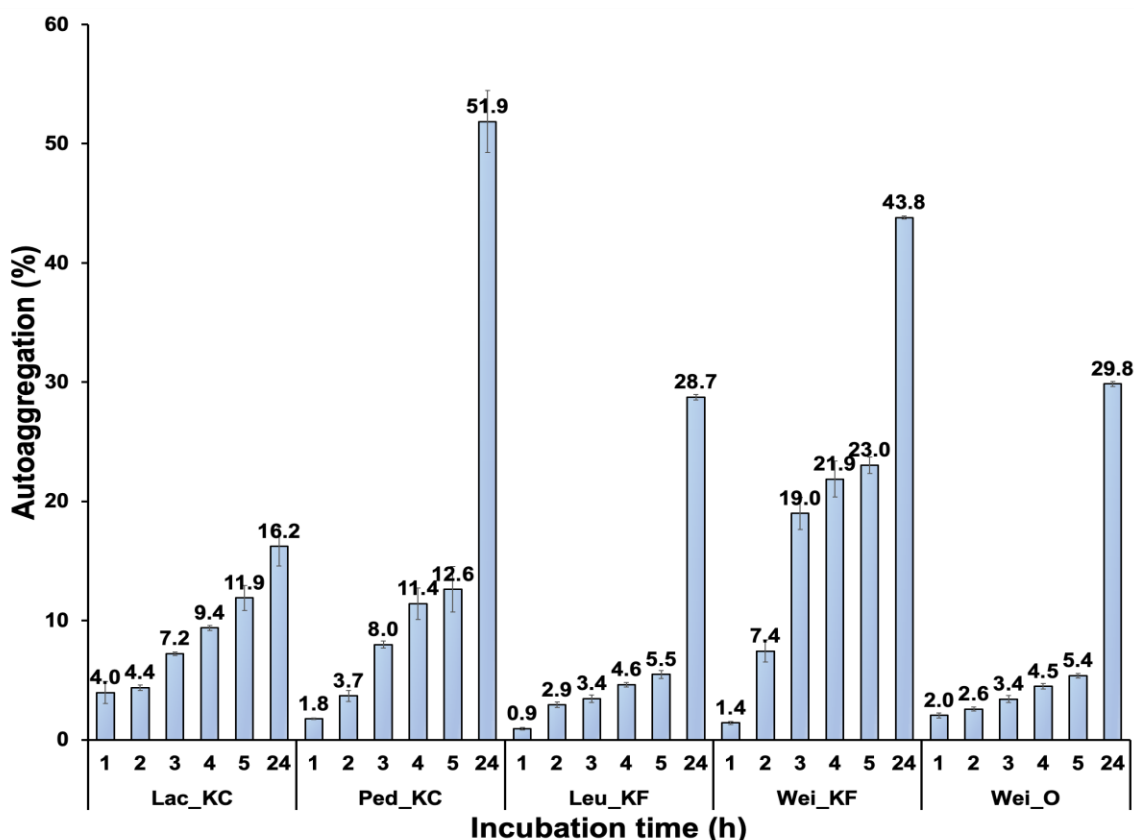
(E)

Hình 3.7. Đường cong sinh trưởng của các chủng vi khuẩn acid lactic phân lập từ các nguồn khác nhau: (A) Lac_KC – *Lactiplantibacillus plantarum* phân lập từ kim chi, (B) Ped_KC – *Pediococcus acidilactici* phân lập từ kim chi, (C) Leu_KF – *Leuconostoc lactis* phân lập, (D) Wei_KF – *Weissella cibaria* phân lập từ kefir và (E) Wei_O – *Weissella cibaria* phân lập từ yến mạch

Kết quả trên **Hình 3.7** cho thấy rõ mức độ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn probiotic. Mật độ sống sót tất cả các chủng probiotics đạt cực đại tại ngày thứ 3 khảo sát, ngoài ra cả ba chủng Lac_KC, Ped_KC và Leu_KF đều đạt giá trị cao với mật độ khoảng 10.34 - 10.36 log CFU/ml so với hai chủng còn chỉ đạt khoảng 10.09-10.22 log CFU/ml. Tuy đạt cực đại tại ngày thứ 3 khảo sát nhưng mật độ lại có xu hướng giảm nhẹ ngay ngày thứ 4 và sau ngày thứ 8 mật độ tế bào có xu hướng giảm mạnh. Cụ thể, ngày thứ 9 mật độ tế bào còn sống của các chủng giảm chỉ còn khoảng 4 log CFU/ml, hai chủng Leu_KF và Wei_KF có sự sụt giảm nhiều hơn so với ba chủng còn lại. Và đến ngày thứ 10, mật độ tế bào của các chủng chỉ còn loại khoảng 1.16-1.98 log CFU/ml. Từ kết quả thực nghiệm của S. B. Lee et al. (2017) thấy được chủng *Lactobacillus sakei* sinh trưởng ở thời điểm 6 giờ là giai đoạn giữa pha hàm mũ; 12 và 24 giờ lần lượt là đầu vào và giữa pha tĩnh. Tương tự với với đường cong tăng trưởng của các loài *Lactobacillus* theo báo cáo của (Zwietering et al., 1990).

3.2.2. Khả năng tự kết dính

Khả năng tự kết dính (Auto-aggregation) của vi sinh vật là một quá trình trong đó vi khuẩn tương tác vật lý với nhau và lắng xuống đáy trong huyền phù lỏng tĩnh (Krausova et al., 2019). Sự biến đổi tính tự kết dính của những loài vi khuẩn probiotic bị ảnh hưởng bởi thời gian ủ được thể hiện qua **Hình 3.8**.



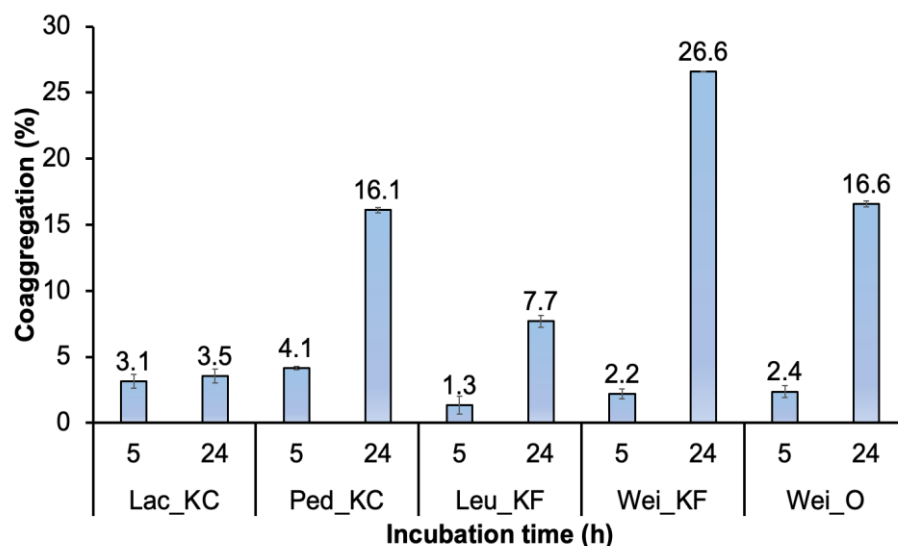
Hình 3.8. Khả năng tự kết dính của các chủng vi khuẩn acid lactic phân lập từ các nguồn khác nhau. Ghi chú: Lac_KC – *Lactiplantibacillus plantarum* phân lập từ kim chi, Ped_KC – *Pediococcus acidilactici* phân lập từ kim chi, Leu_KF – *Leuconostoc lactis* phân lập từ kefir, Wei_KF – *Weissella cibaria* phân lập từ kefir và Wei_O – *Weissella cibaria* phân lập từ yến mạch

Như được thể hiện trên **Hình 3.8**, khi tăng thời gian ủ thì khả năng tự kết dính của các chủng cũng tăng dần theo thời gian và đạt mức cao nhất sau 24 giờ ủ. Điều đó cho thấy, chủng Ped_KC có khả năng kết dính cao nhất đạt 51,9%, gấp 1.18 lần so với chủng Wei_KF và gấp 3.2 lần so với chủng Lac_KC. Tuy nhiên, cả hai chủng còn lại có khả năng tự kết dính thấp dưới 30%. Điều này có thể là do chủng vi khuẩn LAB khi bám vào các tế bào

biểu mô ruột thì tăng khả năng sống sót trong môi trường ruột mô phỏng Won et al. (2021). Dựa theo thực nghiệm của Thao et al. (2021) khả năng tự kết dính giúp ngăn cản sự kết dính của vi sinh vật gây bệnh, giúp tăng cường khả năng sống sót của vi sinh vật trong hệ tiêu hóa. Grigoryan và cộng sự (2018) đã kiểm tra giá trị tự kết dính của một số *Lactobacilli* và báo cáo *L. paracasei* CCMA 0,505 (52,66%) và *L. paracasei* CCMA 0,504 (45,36%) cho thấy mức độ tự động tổng hợp cao nhất.

3.2.3. Khả năng đồng kết dính

Đồng kết dính (co-aggregation) có ảnh hưởng đến sự liên kết sinh học của *Lactobacillus* với mầm bệnh, việc đó giúp vi khuẩn sinh học tạo ra rào cản nhằm bảo vệ và ngăn cản sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh (Jena et al., 2013). Ngoài ra việc gắn kết của nhóm vi khuẩn probiotic với vi sinh vật gây bệnh như *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Coliform*... làm tăng cường việc kiềm hãm sự tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh đồng thời duy trì cân bằng hệ vi sinh vật chứa carbohydrate có trong đường tiêu hoá (Ciandrini et al., 2017). Kết quả khảo sát đồng kết dính của các chủng probiotic với *E.coli* theo thời gian ủ được trình bày ở **Hình 3.9**.



Hình 3.9. Khả năng đồng kết dính với *E. coli* của các chủng vi khuẩn acid lactic phân lập từ các nguồn khác nhau. Ghi chú: Lac_KC – *Lactiplantibacillus plantarum* phân lập từ kim chi, Ped_KC – *Pediococcus acidilactici* phân lập từ kim chi, Leu_KF – *Leuconostoc lactis* phân lập từ kefir, Wei_KF – *Weissella cibaria* phân lập từ kefir và Wei_O – *Weissella cibaria* phân lập từ yến mạch.

Có thể thấy rằng, khi thời gian ủ tăng đến 24 giờ thì khả năng đồng kết dính các chủng hầu như đều đạt giá trị cao hơn so với 5 giờ, ngoại trừ chủng Lac_KC. Đặc biệt nhất là chủng Wei_KF ở thời điểm 24 giờ đạt giá trị kết dính cao nhất lên tới 26.6%. Ngoài ra, ở cùng một thời gian cả hai chủng Ped_KC và Wei_O lại có khả năng kết dính kém hơn giá trị lần lượt là 16.1% và 16.6%. Hiện tượng này có thể là do trong quá trình kết hợp, chủng *Lactobacillus* kiểm soát môi trường vi mô xung quanh mầm bệnh, tăng nồng độ các chất ức chế bài tiết nhằm cản trở khả năng lây nhiễm của các loài gây bệnh cho vật chủ thông qua thực phẩm. Báo cáo của Ferrando et al. (2016) đã đánh giá được khả năng đồng kết dính của *Lp* 813 và *Lp* 998 với *E. coli* và *S. enteritidis* nằm trong khoảng từ 5 đến 14% sau 5 giờ ủ.

3.2.4. Khả năng kháng kháng sinh

LAB kháng kháng sinh sẽ mang lại nhiều ích lợi cho việc chữa bệnh tiêu chảy nhưng đối với thực phẩm thì LAB trong thực phẩm lên men không được kháng kháng sinh, bởi chúng sẽ gây ra mối nguy hiểm khi những gen kháng kháng sinh còn có khả năng chuyển thành vi khuẩn cộng sinh hoặc vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa thông qua quá trình chuyển gene ngang Wang et al. (2019). **Bảng 3.3** cho thấy kết quả của ảnh hưởng các loại hoạt chất kháng sinh lên các chủng probiotic.

Bảng 3.3 cho thấy rằng Lac_KC và Wei_KF có khả năng đối kháng với hầu hết các nhóm kháng sinh, nhưng không thể chống lại nhóm Cephalosporins. Tuy nhiên, Lac_KC và Wei_KF vẫn có thể chống lại 2 trên 3 hoạt chất trong nhóm đó. Kết quả cũng thể hiện chủng Lac_KC có khả năng kháng lại nhiều nhóm kháng sinh nhất so với các chủng còn lại. Các báo cáo khảo sát *Latilactobacillus* khi được ứng dụng làm chế phẩm sinh học thì chúng luôn nhạy cảm với một số loại kháng sinh khác nhau Xu et al. (2023). Khả năng kháng của các chủng probiotic đối với một số loại kháng sinh có thể được sử dụng cho mục đích điều trị miễn là các gen chịu trách nhiệm về tính kháng này không thể chuyển sang các vi khuẩn khác (Gueimonde et al., 2013). Các chủng probiotic kháng một số hoạt chất kháng sinh hỗ trợ phòng ngừa và điều trị nhiễm trùng đường ruột (Moustafa Y.M. El-Nag, 2004). Một số nghiên cứu cho rằng các sinh vật sử dụng kháng sinh nhằm loại bỏ hoặc hạn chế sự tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh Pinchas et al. (2015); Timbermont et al. (2014). Ngoài

ra, việc sử dụng probiotic còn giúp ngăn ngừa sự gia tăng của vi khuẩn khi sử dụng kháng sinh trên lan Muñoz-Atienza et al. (2013); Vankerckhoven et al. (2008).

Bảng 3.3. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn acid lactic phân lập từ các nguồn khác nhau.

Nhóm kháng sinh	Hoạt chất	Khả năng kháng kháng sinh (mm)				
		Lac_KC	Ped_KC	Leu_KF	Wei_KF	Wei_O
Cephalosporins	Cefixim	19.1 (0.4)	n.d.	n.d.	9.8 (1.2)	n.d.
	Cefuroxim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Cefalexin	19.5 (0.4)	n.d.	n.d.	13.1 (2.3)	n.d.
Penicillins	Penicillin	29.8 (0.2)	22.6 (0.3)	17.5 (1.8)	21.8 (0.9)	30.3 (<0.1)
	Ampicillin	37.6 (0.2)	26.3 (0.4)	25.5 (0.5)	22.3 (0.2)	27.4 (0.2)
	Amoxicillin	43.4 (0.1)	29.0 (0.4)	29.1 (0.1)	23.3 (0.1)	27.7 (0.1)
Macrolides	Erythromycin	36.0 (0.1)	34.4 (0.5)	38.4 (0.3)	20.3 (0.1)	30.1 (0.1)
Quinolones	Levofloxacin	30.1 (0.1)	23.7 (0.2)	20.6 (0.1)	20.4 (0.3)	12.4 (0.1)
Tetracyclines	Tetracycline	25.7 (0.2)	24.3 (0.1)	24.1 (<0.1)	21.1 (1.1)	14.7 (0.5)

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình (độ lệch chuẩn) và giá trị trong cùng một chỉ tiêu đo có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% ($p > 0.05$).

n.d. – không phát hiện.

Lac_KC – *Lactiplantibacillus plantarum* phân lập từ kim chi.

Ped_KC – *Pediococcus acidilactici* phân lập từ kim chi.

Leu_KF – *Leuconostoc lactis* phân lập từ kefir.

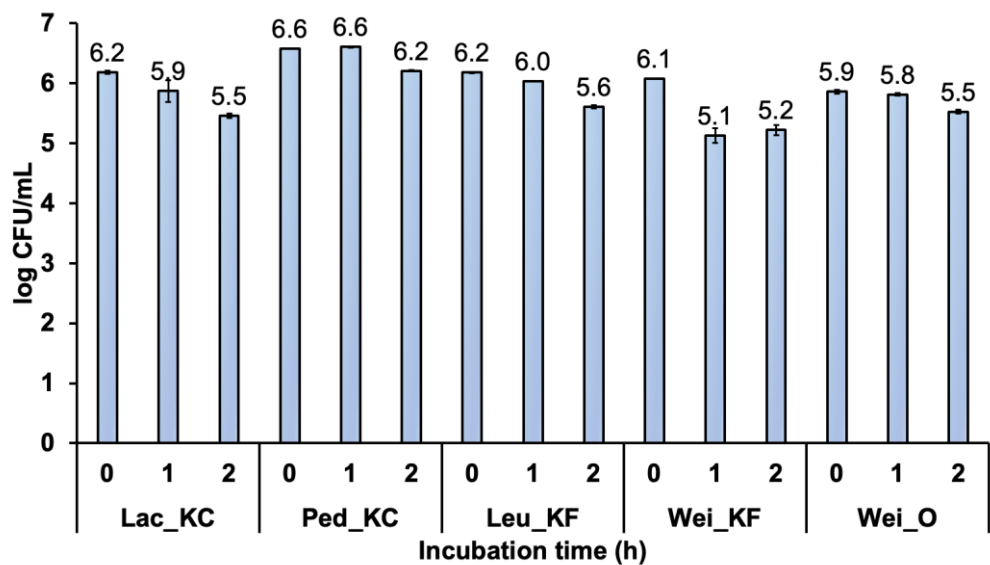
Wei_KF – *Weissella cibaria* phân lập từ kefir.

Wei_O – *Weissella cibaria* phân lập từ yến mạch.

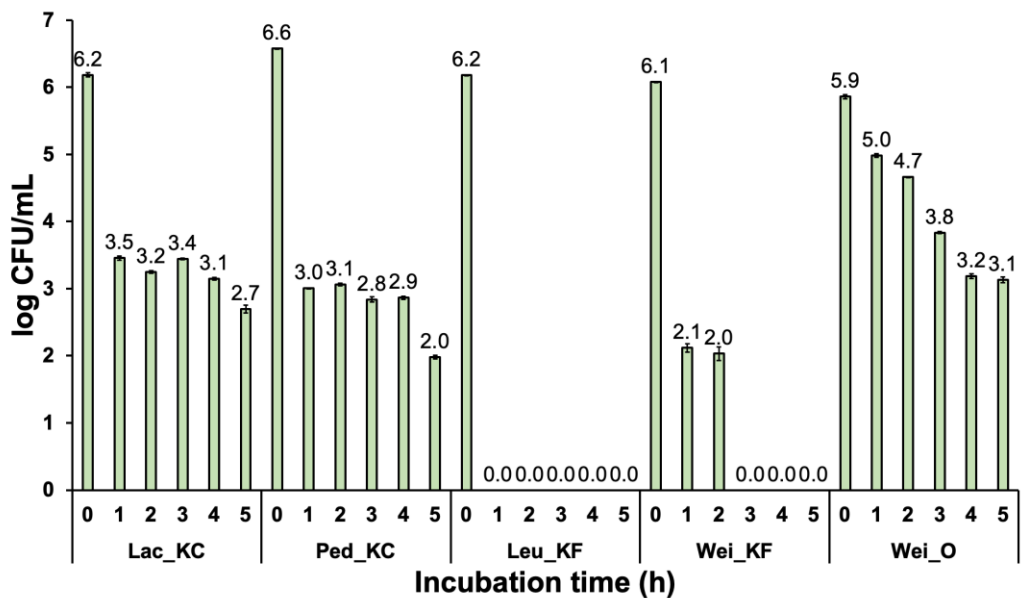
3.2.5. Khả năng tồn tại trong môi trường mô phỏng dịch tiêu hóa

Để đảm bảo rằng các lợi khuẩn tiềm năng có thể sống sót sau khi qua đường tiêu hóa, mỗi chủng LAB sau khi phân lập được tiếp xúc với các điều kiện trong đường tiêu hóa tuần tự mô phỏng Pinto et al. (2020). Kết quả đánh giá khả năng tồn tại của những chủng

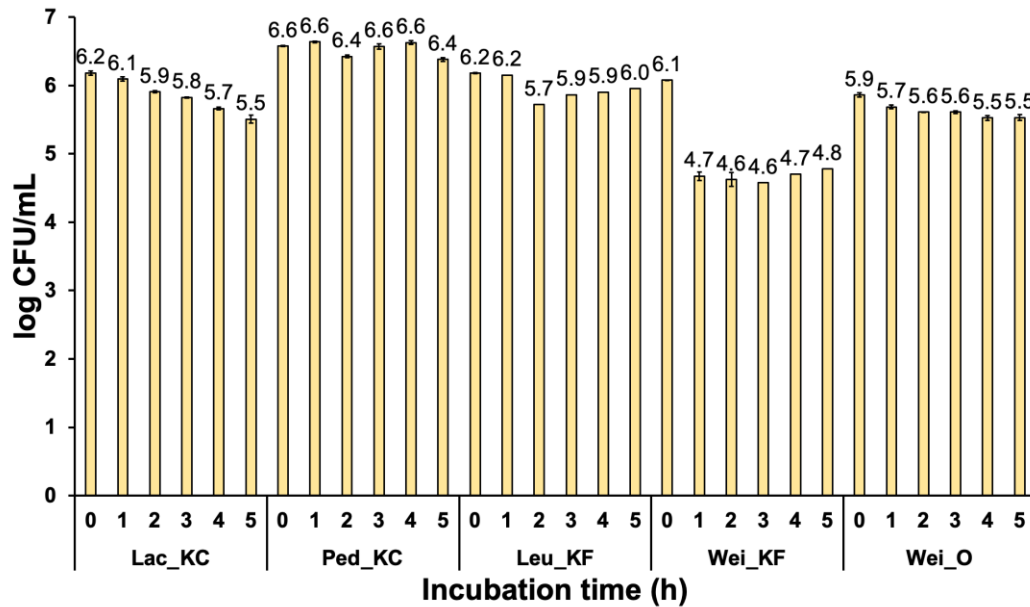
probiotic được thực hiện ở các mốc thời gian ủ khác nhau trong môi trường mô phỏng dịch tiêu hóa được thể hiện ở **Hình 3.10**.



(A)



(B)



(C)

Hình 3.10. Sự sống sót trong điều kiện tiêu hóa mô phỏng ở (A) miệng (SSF), (B) dạ dày (SGF) ở pH 2.0 và (C) ruột (SIF) của các chủng vi khuẩn acid lactic phân lập từ các nguồn khác nhau. Ghi chú: Lac_KC – *Lactiplantibacillus plantarum* phân lập từ kim chi, Ped_KC – *Pediococcus acidilactici* phân lập từ kim chi, Leu_KF – *Leuconostoc lactis* phân lập từ kefir, Wei_KF – *Weissella cibaria* phân lập từ kefir và Wei_O – *Weissella cibaria* phân lập từ yến mạch

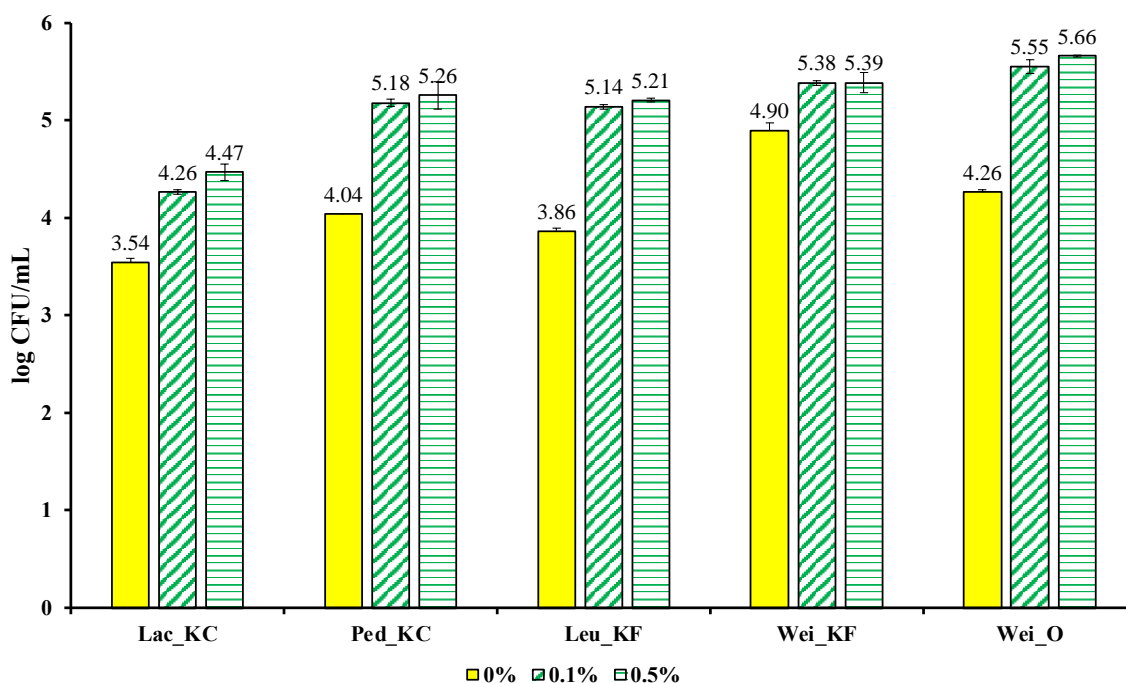
Có thể thấy rằng trong dịch miệng mô phỏng, các chủng hầu như không có thay đổi nhiều về số lượng tế bào, thường giảm từ 0.4 – 0.9 log CFU/mL sau 2 giờ ủ. Tuy nhiên sau khi tiếp xúc với môi trường dịch dạ dày mô phỏng pH 2.0, tất cả các chủng đều giảm mạnh ngay giờ đầu tiên tiếp xúc. Đặc biệt là hai chủng Leu_KF và Wei_KF chết hoàn toàn sau 1 giờ ủ, điều đó thể hiện mức độ chống chịu kém khi gặp điều kiện pH thấp. Ngoài ra, chủng Wei_O có khả năng chịu được acid tốt nhất đạt 3.1 log CFU/mL. Tuy nhiên khi đến dịch ruột mô phỏng hầu hết các chủng đều chịu được pH tốt. Khả năng sống sót và chống chịu ở các điều kiện pH của từng loài là điều thiết yếu để thể hiện các chức năng của probiotic khi vào trong ruột Han et al. (2017). Khảo sát của HORÁCKOVÁ et al. (2011) cho thấy rằng chủng *L. rhamnosus* CCDM 150 không thể sống sót trong điều kiện mô phỏng trong dạ dày.

3.3. KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG PROBIOTIC BẰNG PREBIOTIC

Việc bổ sung prebiotic như một phương pháp để cải thiện tính ổn định của men vi sinh cũng như tăng sự phát triển của probiotic, nó đóng vai trò là thức ăn cho lợi khuẩn giúp cải thiện khả năng tồn tại của probiotic qua đường tiêu hóa, cũng như tăng đặc tính kết dính trong ruột (Altamirano-Ríos et al., 2022). Không những vậy, prebiotic có thể mang lại một số lợi ích về sức khỏe như giảm thiểu nhiễm trùng đường ruột, giảm mức cholesterol và tăng hấp thu khoáng chất (Al-Sheraji et al. (2013); Bergillos-Meca et al. (2015); Gibson et al. (2004); Roberfroid et al. (2010). Thực nghiệm này đánh giá sự tương tác của polysaccharide ngoại bào (EPS) như một loại prebiotic với chính vi sinh vật tổng hợp.

Lee et al. (2022) đã chứng minh EPS đóng vai trò quan trọng trong đường tiêu hóa và đối với sức khỏe của vật chủ, nó hoạt động như một prebiotic nhằm tăng cường sự phát triển của vi sinh vật có lợi và sản xuất các chất chuyển hóa như axit béo chuỗi ngắn (SCFA). Nhiều loại polysaccharide ngoại bào đã được chứng minh rộng rãi là có tiềm năng “prebiotic” (Hongpattarakere et al., 2012). EPS là các chuỗi polysaccharide nhánh dài, được cấu tạo bằng cách lặp lại các đơn vị carbohydrate, có thể được tiết vào môi trường dưới dạng chất nhờn hoặc có thể liên kết chặt chẽ với bề mặt tế bào dưới dạng polysaccharide dạng nang (Abarquero et al., 2022). EPS vi khuẩn thể hiện đặc tính kháng cao đối với quá trình tiêu hóa của con người và tăng cường lựa chọn các vi khuẩn có lợi, nhiều loại polysaccharide được công nhận là có tiềm năng “prebiotic” (Hongpattarakere et al., 2012). Thông qua các thuộc tính tiền sinh học của chúng, EPS dựa trên LAB mang lại lợi ích đối với tim mạch và kiểm soát những bất thường xảy ra trong hội chứng chuyển hóa. EPS từ LAB đã được báo cáo là đóng vai trò quan trọng như các chất chống viêm và chống ung thư (Korcz et al., 2018).

Theo báo cáo của Saulnier et al. (2008) một số nghiên cứu in vitro đã chứng minh rằng sự kết hợp giữa probiotic và prebiotic có hiệu quả hơn trong việc điều chỉnh hệ vi sinh đường ruột so với khi chỉ dùng một trong hai loại. Kết quả trên **Hình 3.11** thể hiện khả năng thúc đẩy sự sinh trưởng bằng prebiotic ở những điều kiện khác nhau của các chủng.



Hình 3.11. Khả năng kích thích sinh trưởng của prebiotic của từng chủng vi sinh vật phân lập từ nhiều nguồn khác nhau. Ghi chú: Lac_KC – *Lactiplantibacillus plantarum* phân lập từ kim chi, Ped_KC – *Pediococcus acidilactici* phân lập từ kim chi, Leu_KF – *Leuconostoc lactis* phân lập từ kefir, Wei_KF – *Weissella cibaria* phân lập từ kefir và Wei_O – *Weissella cibaria* phân lập từ yến mạch

Kết quả cho thấy, khi thêm prebiotic ở các nồng độ khác nhau các chủng đều có sự kích thích tăng trưởng, tuy nhiên hai chủng Wei_KF và Wei_O có khả năng ảnh hưởng đến sự tăng trưởng bằng prebiotic ở cả 3 nồng độ đạt giá trị cao nhất khoảng 4.26-5.66 log CFU/mL so với các chủng. Tuy vậy, chủng Lac_KC lại cho giá trị thấp nhất trong các chủng chỉ đạt mức 3.45-4.47 log CFU/mL. Tương tự như nghiên cứu của Chaiongkarn et al. (2019) cho thấy EPS có tiềm năng đặc tính prebiotic, có thể kích thích sự phát triển của men vi sinh (*L. rhamnosus* DSM 20021 và *L. casei* DSM 20011). Trong nghiên cứu của Lee et al. (2022), EPS do *L. paracasei* sản xuất đã tăng cường sự phát triển của probiotic nhưng không làm tăng trưởng của một số mầm bệnh như *E. coli*, *Bacteroides fragilis* và *C. difficile*. Heperkan et al. (2020) đã khảo sát và cho ra kết quả EPS từ vi khuẩn lactic như *L. plantarum* và *Bifidobacterium bifidum* có tiềm năng giống như một prebiotic, vì vậy nó có thể sẽ trở thành giải pháp thay thế việc sử dụng kháng sinh trong nuôi tôm nhằm ngăn chặn sự tăng trưởng của mầm bệnh.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Trong bài nghiên cứu này, 5 chủng vi sinh vật được phân lập từ các nguồn như kim chi, sữa chua kefir và yến mạch thu được kết quả là hai chủng *Lactiplantibacillus plantarum* và *Pediococcus acidilactici* được phân lập từ kim chi, hai chủng *Leuconostoc lactis* và *Weissella cibaria* phân lập từ kefir và *Weissella cibaria* phân lập từ yến mạch. Mức độ sống sót trong môi trường MRS lỏng và được ủ 37 °C của cả ba chủng Lac_KC, Ped_KC và Leu_KF đạt pha cân bằng từ ngày thứ 3 – ngày 5. Chủng Ped_KC đạt giá trị tự kết dính cao nhất 51,9% so với các chủng. Khác với tự kết dính thì kết quả khảo sát đồng kết dính của Wei_KF ở thời điểm 24 giờ đạt giá trị kết dính cao nhất (26.6%). Ngoài ra, Lac_KC là chủng có thể kháng lại nhiều loại kháng sinh nhất, tuy nhiên không thể kháng Cephalosporins. Chủng Wei_O có tỷ lệ sống sót trong môi trường tiêu hóa mô phỏng đạt 3.1 log CFU/mL, đồng nghĩa với việc Wei_O là chủng có khả năng chống chịu được acid tốt nhất. Nhìn chung ba chủng Ped_KC, Leu_KF và Wei_O ở các mức nồng độ (0%, 0.1%, 0.5%) đạt mức kích thích sinh trưởng vượt trội hơn khi so sánh với hai chủng còn lại.

Kiến nghị

Prebiotic cần được khảo sát kích thích sinh trưởng trong thời gian dài hơn và so sánh với các nhóm prebiotic khác. Ngoài ra, khảo sát thêm sự tồn tại của những vi khuẩn trong môi trường muối mật.