

**XÁC ĐỊNH VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ TÍNH CHẤT CÓ LỢI CỦA CHỦNG
Lactobacillus fermentum DC1 PHÂN LẬP TỪ SẢN PHẨM DƯA CẢI HUẾ**

Nguyễn Thị Diễm Hương, Đỗ Thị Bích Thủy
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Tóm tắt. Chủng DC1 phân lập từ dưa cải được khảo sát định danh sơ bộ thuộc chi *Lactobacillus*. Bằng phương pháp giải trình tự 16S DNA, chủng này được xác định thuộc loài *Lactobacillus fermentum*. Hàm lượng acid lactic trong dịch nuôi cấy thu được khi nuôi cấy chủng này trong môi trường MRS, 72 giờ ở 37°C được xác định bằng HPLC đạt được 20,93 g/l. Nghiên cứu về tiềm năng probiotic cho thấy *Lb. fermentum* DC1 là chủng có nhiều triển vọng. Phần trăm số tế bào sống sót so với ban đầu sau khi ủ ở pH2 trong một giờ, hai giờ và ba giờ lần lượt là 75,21% , 68,35% và 66,25% so với ban đầu. Khả năng chịu muối mật khá cao; Sau 4 giờ ủ trong dung dịch chứa 0,3% muối mật, ΔOD đo ở 600nm đạt 0,516. Chủng này cũng thể hiện khả năng tự kết dính và đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* là 24,49% và 14,19%, khả năng bám dính với các dung môi xylene, ethyl acetate và chloroform lần lượt là 61,66%, 52,31% và 83,76%.

Từ khóa: *Lactobacillus fermentum*, lên men lactic, phân lập, probiotic, xác định.

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, các nghiên cứu về vi khuẩn lactic đã và đang được triển khai rộng rãi trên thế giới. Một số nghiên cứu tập trung vào các tính chất sinh lý sinh hóa của nhóm vi khuẩn này; Klein và cộng sự (1998) đã nghiên cứu phân loại một số vi khuẩn lactic có tiềm năng probiotic dựa vào đặc tính sinh lý của chúng; Một nhóm vi khuẩn lactic phân lập từ cá và tôm đã được xác định các đặc tính sinh hóa bởi Nair và Surendran (2005). Một số công trình khác nghiên cứu về tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn lactic. Nhiều tác giả công bố về tiềm năng probiotic của vi khuẩn lactic (Liong, Shah, 2005 ; Jones et al., 2008; Moulay et al., 2006)... Một số công trình khác nghiên cứu chọn lọc dòng vi khuẩn và nghiên cứu xác định điều kiện lên men sinh tổng hợp acid lactic (Wee et al., 2004; Cock và Rodríguez de Stouvenel, 2006; Nancib et al., 2001; Tesllez-luis et al., 2003; Mel et al., 2008).

Ở Việt Nam, số lượng các nghiên cứu về vi khuẩn lactic còn quá khiêm tốn. Nguyễn Thế Trang và Trần Đình Mân (2008) nghiên cứu một số đặc điểm phân loại của hai chủng vi khuẩn lactic HN11 và HN34 sinh tổng hợp L(+)-Lactic. Mai Đàm Linh và cộng sự

(2008) phân lập và tuyển chọn được các dòng hình que mang nhiều đặc điểm của chi *Lactobacillus* và đã tiến hành sàng lọc khả năng sinh lactic acid của các chủng này .

Để làm góp phần hoàn thiện các sản phẩm thực phẩm, cung cấp giống khởi động cho các quá trình lên men thực phẩm, tạo ra các sản phẩm thực phẩm có chức năng probiotic, từ chủng vi khuẩn lactic DC1 phân lập được từ sản phẩm dưa cải, chúng tôi tiến hành định danh và nghiên cứu một số tính chất có lợi của chủng DC1 (khả năng lên men lactic, một số tiềm năng probiotic).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng DC1 được phân lập từ sản phẩm dưa cải chua trên địa bàn thành phố Huế

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng acid lactic trong dịch nuôi cấy bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Chủng vi khuẩn được cấy tăng sinh từ môi trường giữ giống trong thạch nghiêng sang môi trường MRS lỏng có pH 6,2, ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, cấy mẫu tăng sinh vào môi trường MRS lỏng có bổ sung glucose (20 g/l), pH ban đầu 6,2 với tỉ lệ cấy 5%, ủ ở 37°C trong 72 giờ. Dem dịch nuôi cấy li tâm với tốc độ 13000 vòng/phút thu dịch nổi, pha loãng 10 lần, lắc đều và lọc qua màng lọc 0,20µm được dung dịch thử. Pha dịch acid lactic chuẩn có nồng độ 3 g/l. Hàm lượng acid lactic trong dịch thử được xác định bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC) trên cột C18 – Thermo, bước sóng 220nm, tốc độ dòng 1ml/phút.

2.2.2. Phương pháp vi sinh

** Định danh sơ bộ vi khuẩn lactic đến cấp độ chi bằng cách xác định một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa và phương pháp giải trình tự 16S DNA*

Tiến hành các khảo sát sự phát triển của chủng vi khuẩn trên môi trường MRS với các điều kiện thay đổi gồm: pH ở 4,4 và 9,6; nhiệt độ 10°C và 45°C; nồng độ muối NaCl 6,5% và 18%, khả năng sinh CO₂ trong môi trường có glucose (Cho và Do, 2006; Axelsson, 2004).

- *Khảo sát khả năng phát triển trong các điều kiện môi trường khác nhau:* Cấy mẫu tăng sinh vào môi trường lỏng cần khảo sát tương ứng (pH ở 4,4 và 9,6; nhiệt độ 10°C và 45°C; nồng độ muối NaCl 6,5% và 18%) với tỉ lệ cấy 5%, mẫu được đo mật độ quang (OD) ở 0 giờ và sau 24 giờ ở bước sóng 600nm; riêng các khảo sát ở nhiệt độ 10°C được đo sau 96 giờ.

- *Khảo sát khả năng sinh CO₂ từ lên men glucose:* Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn trong ống nghiệm chứa môi trường MRS lỏng, pH 6,2. Cho ống Durham vô trùng úp ngược vào, ủ ở 37°C trong 48 giờ và quan sát. Sự nổi lên của ống Durham sẽ cho kết

quả dương tính.

** Phương pháp sinh học phân tử*

- Ly trích ADN

Cho dịch huyền phù vi khuẩn vào tube Eppendorf 1,5ml đã có sẵn 200 μ l dung dịch InstageneTM MaxTrix, vortex 10 giây và sau đó spin nhẹ. Hỗn hợp mẫu tiếp tục được ủ ở 56 $^{\circ}$ C trong 30 phút. Sau đó, tiến hành vortex mẫu trong 10 giây và đem đun sôi mẫu 100 $^{\circ}$ C trong 8 phút, rồi ủ trong nước đá trong 5 phút. Sau khi ly tâm 13.200 vòng/phút trong 5 phút, pha loãng 10 lần dịch nổi thu được để thực hiện PCR.

- PCR và giải trình tự ADN 16S

Cho 5 μ l dịch ADN của vi khuẩn sau khi ly trích vào 20 μ l hỗn hợp PCR (^{NK}16S-PCR) và thực hiện phản ứng trong máy PCR, theo chương trình luân nhiệt như sau: 1 chu kỳ 95 $^{\circ}$ C trong 10 phút; 40 chu kỳ gồm các giai đoạn: 94 $^{\circ}$ C trong 30 giây, 60 $^{\circ}$ C trong 30 giây, 72 $^{\circ}$ C trong 1 phút và 3 chu kỳ 72 $^{\circ}$ C trong 10 phút. Phát hiện sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2%. Sản phẩm PCR có độ dài khoảng 500 bp được tinh sạch và tiến hành giải trình tự trên hệ thống ABI 3130XL.

** Phương pháp khảo sát khả năng chịu acid*

Khả năng chịu acid của vi khuẩn được đánh giá qua lượng tế bào sống sót, xác định theo phương pháp Kock, sau khi ủ ở pH 2. Tiến hành rửa sinh khối tế bào bằng đệm phosphate 0,1M pH 7 và tái huyền phù trong đệm này; trộn 1ml dịch huyền phù với 24,5 ml dung dịch NaCl 0,2 % có pH 2 và phân phối vào các ống eppendoff (1ml /ống). Xác định số lượng tế bào sống trong các ống eppendoff ở các thời gian khác nhau (0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ) bằng phương pháp Kock.

** Phương pháp khảo sát khả năng chịu muối mật*

Khảo sát khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS lỏng có bổ sung 0,3% muối mật (No.3, Merck) dựa trên phương pháp của Gilliland và Walker (1990). Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường MRS lỏng có bổ sung muối mật 0,3% ở 37 $^{\circ}$ C trong 4 giờ. Mật độ tế bào trong mẫu được xác định bằng cách xác định mật độ quang ở bước sóng 600nm. Mức độ chịu muối mật được xác định bằng thời gian để tăng OD_{600nm} sau khi nuôi 4 giờ so với ban đầu lên 0,3 đơn vị.

** Phương pháp khảo sát khả năng kết dính của vi khuẩn lactic*

- Khảo sát khả năng tự kết dính

Sinh khối tế bào của vi khuẩn thu được sau khi nuôi cấy được rửa 2 lần bằng đệm PBS (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, nước cất đủ 1 lít) pH 7,2 vô trùng, sau đó, được tái huyền phù trong đệm PBS (OD_{600nm}=1) (OD ban đầu). Để yên huyền phù này ở 37 $^{\circ}$ C trong 5 giờ để tạo điều kiện cho các vi khuẩn lactic tự kết dính và lắng xuống và đo OD dịch trên bề mặt. Khả năng tự kết dính là phần trăm độ giảm

OD_{600nm} dịch bề mặt của mẫu đã để yên 5 giờ so với ban đầu.

- *Khảo sát khả năng đồng kết dính với Staphylococcus aureus*

Sau khi rửa 2 lần bằng đệm PBS, sinh khối tế bào của chủng DC1 và *Staphylococcus aureus* được tái huyền phù đến OD_{600nm}=1. Đồng thời trộn lẫn hai huyền phù này với nhau với thể tích bằng nhau. Tiến hành đo OD_{600nm} dung dịch trên bề mặt sau khi để yên huyền phù của mỗi chủng và hỗn hợp huyền phù của hai chủng ở 37⁰C trong 5 giờ. Khả năng đồng kết dính được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ đồng kết dính (\%)} = \left(\frac{(A_X + A_Y)/2 - A_{(X+Y)}}{(A_X + A_Y)/2} \right) * 100$$

Trong đó, A_X là OD_{600nm} sau 5 giờ của vi khuẩn lactic; A_Y là OD_{600nm} sau 5 giờ của *Staphylococcus aureus*; và A_{X+Y} là OD_{600nm} sau 5 giờ của vi khuẩn lactic và *Staphylococcus aureus*.

- *Khảo sát khả năng kết dính với dung môi*

Rửa sinh khối tế bào chủng DC1 bằng dung dịch KNO₃ 0,1M, pH 6,2 và tái huyền phù vào dung dịch này đến OD_{600nm} = 1. Cho 1ml mỗi loại dung môi (xylene, chloroform, ethyl acetate) lần lượt vào 3 ống nghiệm chứa 3ml huyền phù tế bào, vortex trong 2 phút, sau đó để yên 20 phút ở nhiệt độ phòng, tách pha nước và đo độ hấp thụ. Khả năng kết dính với dung môi được đánh giá là phần trăm độ giảm OD_{600nm} của pha nước thu được trong các ống nghiệm có dung môi sau 20 phút để yên so với ban đầu (OD_{600nm}=1).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả định danh sơ bộ

Bảng 1. Kết quả định danh sơ bộ các chủng vi khuẩn DC1

Khả năng sinh CO ₂	Phát triển ở 10°C	Phát triển ở 45°C	Phát triển ở pH 4,4	Phát triển ở pH 9,6	Phát triển ở NaCl 6,5%	Phát triển ở NaCl 18%
+	+	+	+	-	+	-

Chủng DC1 được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng ở các điều kiện khác nhau về pH, nhiệt độ, nồng độ muối; đồng thời khảo sát khả năng sinh CO₂. Đo và so sánh OD ở bước sóng 600nm ở thời điểm 0 giờ và 24 giờ nuôi cấy để xác định sự phát triển, quan sát sự nổi lên cả ống Durham để khảo sát sự sinh khí (Bảng 1).

So sánh kết quả trên bảng 1 với bảng phân loại đến cấp độ chi của Axelsson (2004), chúng tôi nhận thấy rằng có hai đặc điểm thể hiện sự khác nhau rõ rệt về đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng DC1 so với chi *Carnobacterium* là DC1 có thể phát

triển ở 45⁰C và không phát triển ở pH 9,6. Vì vậy, chủng DC1 thuộc chi *Lactobacillus*.

3.2. Kết quả định danh chủng sàng lọc ở cấp độ loài

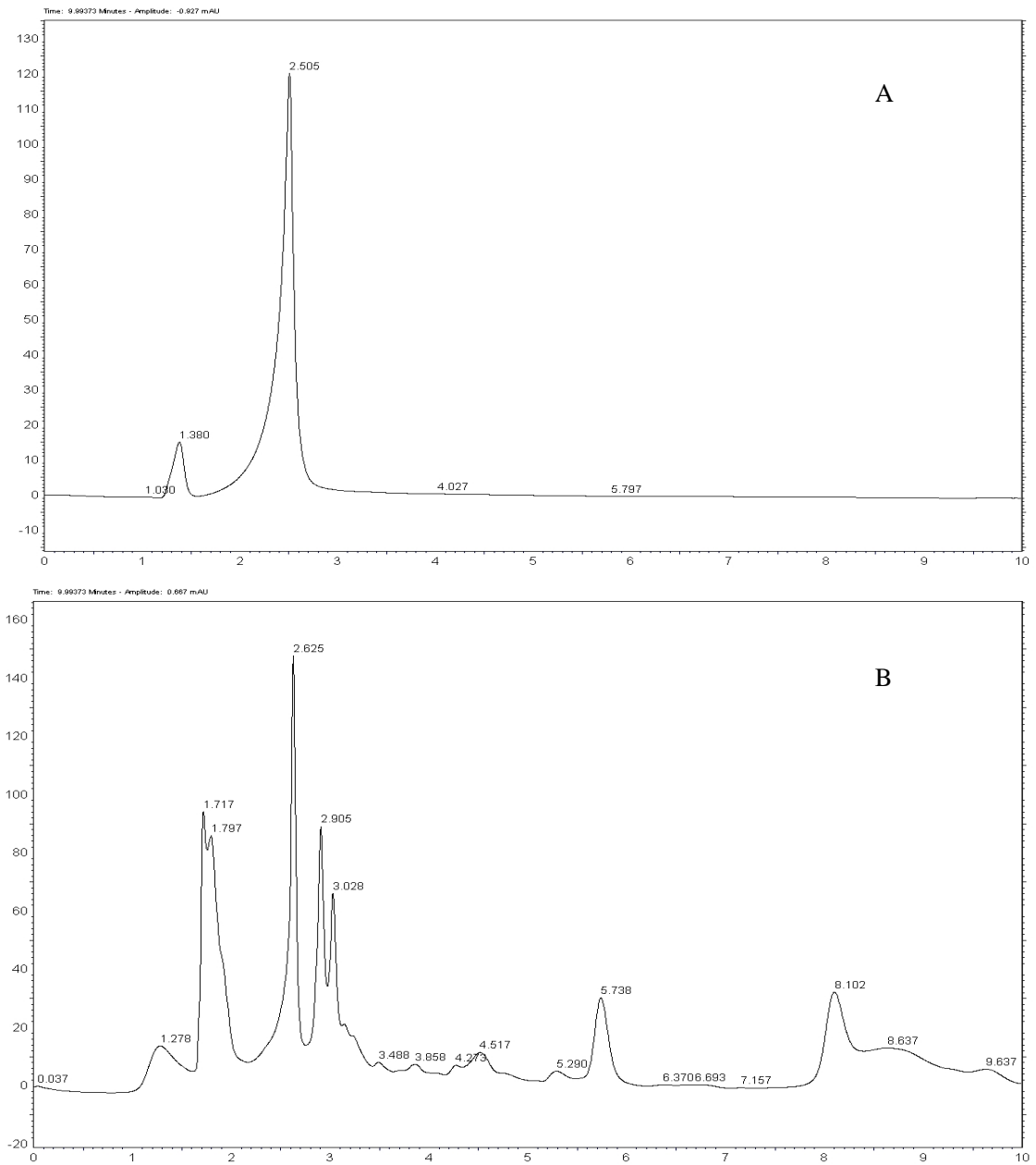
Chủng DC1 được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hóa cho tiểu phần ribosome 16S (Hình 1). Kết quả được tra cứu trên ngân hàng gen của NCBI thông qua chương trình BLAST và dựa vào sự tương đồng trong trình tự của đoạn gen để định danh đến loài. Kết quả cho thấy, trình tự DNA 16S của chủng DC1 khi đối chiếu với trình tự gen của chủng *Lb. fermentum* CECT 5716 ở ngân hàng gen có độ đồng nhất đạt đến 99%. Vì vậy, chủng DC1 thuộc loài *Lb. fermentum*. Chúng tôi gọi chủng này là *Lb. fermentum* DC1.

```
TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTC
GAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGA
GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGG
AAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCT
TCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCT
ACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGAC
ACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAA
GAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAGTCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGGCCGCGGT
```

Hình 1. Trình tự mã hóa ADN 16S của DC1

3.3. Xác định khả năng sinh acid lactic trong dịch nuôi cấy của chủng *Lb. fermentum* DC1

Sau khi nuôi cấy chủng DC1 trong môi trường MRS lỏng có bổ sung glucose (20 g/l), trong 72 giờ, nhiệt độ 37⁰C, dịch môi trường nuôi cấy được thu nhận bằng cách ly tâm, pha loãng 10 lần, và lọc qua màng lọc 0,20 μ m. Hàm lượng acid lactic trong dịch lọc được xác định bằng HPLC (Hình 2). Kết quả cho thấy rằng chủng DC1 có khả năng lên men sinh acid lactic mạnh. Nồng độ acid lactic sinh ra trong môi trường lên men là 20,93 g/l (>20 g/l). Theo Cock và Rodríguez de Stouvenel (2006), chủng *Lactococcus lactis* subs *lactis*, được phân lập và khảo sát sự lên men trong điều kiện chưa tối ưu hóa bởi, có khả năng sinh 13,7g/l acid lactic trong môi trường nuôi cấy; Nacib và đồng tác giả (2001) đã công bố hàm lượng acid lactic đạt được 45g/l khi nuôi cấy *Lb. casei* subsp. *Rhamnosus* trong môi trường MRS. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thế Trang và Trần Đình Mẫn (2008) trên môi trường MRS có bổ sung 15 g/l glucose, pH 6,0, sau 48 - 60 giờ nuôi cấy, ở 30⁰C chủng vi khuẩn lactic HN11 có thể sản sinh 10,94 g/l. Với chủng HN34 ở cùng môi trường và thời gian nuôi cấy nhưng nhiệt độ nuôi 37⁰C lượng acid lactic đạt 12,76 g/l. Đối chiếu với các kết quả nghiên cứu trên cho thấy chủng DC1 có khả năng sinh acid lactic tương đối cao.



Hình 2. Sơ đồ ký hiệu xác định hàm lượng acid lactic
 A. Mẫu chuẩn; B. Dịch lên men bởi *Lb. fermentum* DC1

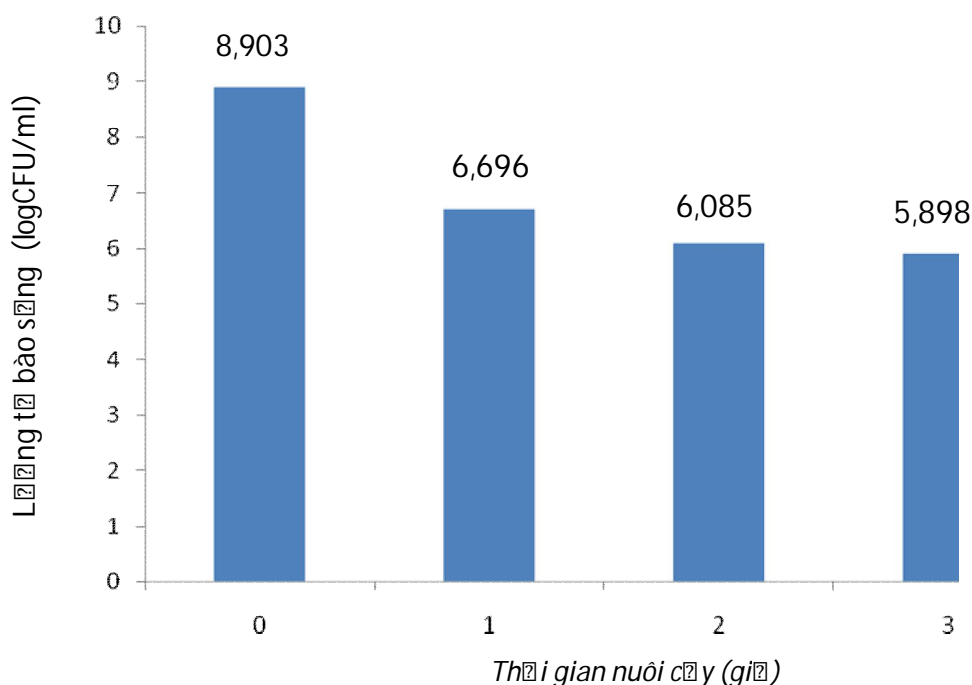
3.4. Kết quả khảo sát một số tính chất về tiềm năng probiotic của *Lactobacillus fermentum* DC1

3.4.1. Khả năng chịu muối mật của *Lb. fermentum* DC1

Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng kháng muối mật của *Lb. fermentum* DC1 thông qua khả năng phát triển ở nồng độ muối mật 0,3%. Kết quả cho thấy *Lb. fermentum* DC1, khá cao, sau 4 giờ Δ OD đo ở bước sóng 600nm đạt 0,516. Các tác giả Liong và Shah (2005) đã tiến hành khảo sát khả năng tăng trưởng của vi khuẩn lactic trong môi trường MRS có 0,3% dịch mật bò, kết quả cho thấy tốc độ tăng OD ở bước sóng 600nm trong khoảng 0,068 (*Lb. casei* ASCC 290) đến 0,127 (*Lb. casei* ASCC 1520) đơn vị/giờ, tương đương với Δ OD khoảng 0,275 – 0,508 sau 4 giờ. Mota và đồng tác giả (2006) cũng đã tiến hành nghiên cứu khả năng kháng muối mật của 3 chủng vi khuẩn *Lb. acidophilus*, *Lb. acidophilus* 2M14E bị ức chế mạnh, sau 4 giờ trong pha log chỉ tăng được khoảng 0,2 đơn vị OD 600 ở nồng độ mật 0,3%, *Lb. acidophilus* 2G14E bị ức chế trung bình thì tăng được khoảng 0,4 và *Lb. acidophilus* 5C14E ít bị ức chế thì tăng được khoảng 0,5. So sánh với các công bố này, chúng tôi nhận thấy các chủng *Lb. fermentum* DC1 có khả năng chịu muối mật tốt.

3.4.2. Khả năng chịu acid của *Lb. fermentum* DC1

Khả năng chịu acid của *Lb. fermentum* DC1 được khảo sát bằng cách xác định số tế bào sống qua các mốc thời gian liên tục từ 0 giờ đến 3 giờ trong môi trường pH 2. (Hình 3). Kết quả sau 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ ủ ở pH 2 lượng tế bào sống vẫn còn tương ứng là 6,696 log CFU/ml (75,21% so với ban đầu), 6,085 CFU/ml (68,35% so với ban đầu) và 5,898 CFU/ml (66,25% so với ban đầu). Kim và đồng tác giả (2007) cho thấy khi xử lý bằng dịch dạ dày pH = 2,5, có 3/7 chủng vi khuẩn có khả năng chịu môi trường acid, tuy nhiên, tỉ lệ sống của các chủng này giảm mạnh chỉ còn 0,8% đến 8% sau 30 phút xử lý và tiếp tục giảm mạnh sau 2 giờ xử lý (từ 0,04% đến 0,2% so với ban đầu). Nghiên cứu của Liong và Shah (2005) trên 11 chủng lactic bao gồm *Lb. acidophilus* và *Lb. casei* kết quả cho thấy cả *Lb. acidophilus* và *Lb. casei* đều có khả năng chịu acid sau 2 giờ nuôi cấy. Trong đó *Lb. acidophilus* ATCC 4962, *Lb. casei* ASCC 290 và *Lb. casei* ASCC 292 là những chủng chịu tốt nhất khi giảm từ 10 logCFU/ml xuống 7logCFU/ml (70% so với ban đầu, có một số chủng chỉ còn 10⁴ CFU/ml (1 triệu lần). Maragkoudakis và đồng tác giả (2006) cũng khảo sát khả năng chịu axit của một số chủng *Lactobacillus*, kết quả cho thấy các chủng có khả năng kháng acid mạnh nhất là *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 130, *Lb. plantarum* ACA-DC 146, *Lb. rhamnosus* ACA-DC 112, với mức giảm logCFU/ml từ 8,6 xuống còn lần lượt là 6,8; 5,7 và 7,1 sau 3 giờ ủ ở pH 2, ngoài ra, một số chủng trong nghiên cứu của nhóm tác giả này không có khả năng sống sót ở pH 2 sau 1 giờ. So sánh với các công trình đã công bố cho thấy khả năng chịu acid của chủng *Lb. fermentum* DC1 khá cao. Đây là một chỉ tiêu đánh giá tiềm năng ứng dụng làm probiotic của nó.



Hình 3. Khả năng sống sót của *Lactobacillus fermentum* DC1 ở pH 2 theo thời gian

3.4.3. Khả năng bám dính của *Lactobacillus fermentum* DC1

Khảo sát khả năng bám dính của *Lb. fermentum* DC1 được tiến hành bằng cách khảo sát khả năng tự kết dính, khả năng đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* và khả năng bám dính vào một số dung môi (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng bám dính của *Lb. fermentum* DC1

Tiêu chí đánh giá	Khả năng bám dính (%)
Khả năng tự kết dính	24,49
Khả năng đồng kết dính với <i>Staphylococcus aureus</i>	14,19
Khả năng bám dính với dung môi xylene	61,66
Khả năng bám dính với dung môi ethyl acetate	52,31
Khả năng bám dính với dung môi chloroform	83,76

Khả năng tự kết dính giúp cho vi khuẩn lactic kết dính lại với nhau để hình thành một quần thể lớn, giúp tăng cường được sức sống và sự phát triển của chúng theo kiểu mối quan hệ hỗ trợ cùng loài. Khả năng tự kết dính còn có sự liên quan đến khả năng bám dính đường ruột và còn làm tăng khả năng lưu lại trong đường tiêu hóa của chúng vi sinh vật. Kết quả thu được khi tiến hành khảo sát khả năng tự kết dính của chủng vi khuẩn lactic *Lb. fermentum* DC1 (bảng 2) sau 5 giờ đạt 24,49%. Trong khi đó, Orłowski và Beelecka (2006) đã nghiên cứu khả năng tự kết dính của *Lactobacillus* và

Bifidobacterium đã nhận thấy có sự biến động lớn trong khả năng tự kết dính của các chủng, 5 chủng được khảo sát trong thí nghiệm có kết quả tự kết dính là 5,5%, 15%, 23%, 75% và 77% ở nhiệt độ phòng. Kết quả nghiên cứu khả năng tự kết dính của các chủng *Bifidobacterium* ở 37°C bởi Rahman và đồng tác giả (2008) nằm trong khoảng 0,9% ÷ 13,2%. So sánh với các kết quả đã công bố cho thấy *Lb. fermentum* DC1 có khả năng tự kết dính khá cao (24,49%) nên có thể sử dụng để làm probiotic.

Vi khuẩn lactic có khả năng đồng kết dính với vi sinh vật gây bệnh như *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Coliform*... do đó làm tăng được khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, góp phần cân bằng hệ vi sinh đường ruột. Lee và Salminen (2009) cho rằng các vi khuẩn lactic có khả năng sinh bacteriocin sẽ tạo hiệu quả miễn dịch tốt hơn khi chúng kết dính với vi khuẩn gây bệnh. Collado và đồng tác giả (2007) đã khảo sát khả năng đồng kết dính của các chủng vi khuẩn lactic cho thấy sau 4 giờ, tỷ lệ đồng kết dính trong khoảng 6% đến 27%. Từ đó cho thấy rằng khả năng đồng kết dính với vi khuẩn gây bệnh của *Lactobacillus fermentum* DC1 (14,19%) ở mức trung bình nên cũng có thể làm điều kiện sử dụng trong probiotic.

Khả năng bám dính dung môi được xem là một phương pháp gián tiếp để nghiên cứu chọn lọc dòng tế bào có khả năng bám dính đường ruột cao.

Kết quả bám dính với xylene phản ánh tính kỵ nước của bề mặt tế bào. Rahman và đồng tác giả (2008) đã công bố khả năng kỵ nước của một số vi khuẩn *Bifidobacterium* biến động rất lớn (14,4% - 97,3%). Pelletier và đồng tác giả (1997) cho kết quả khảo sát sự bám dính với hexadecane (dung môi không phân cực) của một số chủng *L. casei* subsp. *casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus* là 5,8% - 26,5%.

Khả năng bám dính vào ethyl acetate (dung môi có tính base) phản ánh tính phân cực và tính acid của bề mặt tế bào vi khuẩn lactic. Khả năng bám dính ethyl acetate cao có khả năng kéo theo cơ hội bám dính vào những yếu tố phân cực có tính base trong biểu mô ruột. Theo Maria (2006), khả năng bám dính ethyl acetate của một số chủng *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei* nằm trong khoảng 0 ÷ 79,2%. Khả năng bám dính với dung môi ethylacetate của *Lb. casei* cho kết quả nằm trong khoảng 10 ÷ 60% (Provencio et al., 2009).

Tính ưa nước của bề mặt tế bào vi khuẩn có thể là do các hợp chất có tính acid hoặc base trên bề mặt, hoặc có thể có cả hai. Sự bám dính của tế bào vi khuẩn với chloroform (dung môi có tính acid) phản ánh tính base của bề mặt tế bào. Provencio và đồng tác giả (2009) công bố khả năng bám dính với dung môi chloroform của *Lactobacillus casei* từ 20 đến 98%. Maria (2006) đã ghi nhận khả năng bám dính chloroform của một số chủng trong các loài *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei* thay đổi từ 11,6% đến 100%.

Từ các kết quả đã công bố cho thấy chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 có khả

năng bám dính dung môi rất cao. Khả năng bám dính của chủng này với xylen, ethyl acetate và chloroform lần lượt là 61,66 %, 52,31 % và 83,76 % (Bảng 2). Từ đó cho thấy tiềm năng probiotic của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 khá lớn.

4. Kết luận

Chủng DC1 phân lập từ dưa cải chua Huế được xác định thuộc loài *Lactobacillus fermentum*. Chủng này có khả năng lên men sinh lactic acid cao. Nồng độ lactic acid trong môi trường sau 72 giờ nuôi cấy trong MRS lỏng có bổ sung glucose (20 g/l) ở 37°C đạt được là 20,93 g/l. Hơn nữa, nó còn có tiềm năng probiotic do có một số đặc tính như khả năng chịu muối mật khá cao, sau 4 giờ ΔOD đo ở bước sóng 600nm đạt 0,516; khả năng chịu acid tốt (phần trăm số tế bào sống sót so với ban đầu sau khi ủ ở pH2 trong một giờ, hai giờ và ba giờ lần lượt là 75,21% , 68,35% và 66,25% so với ban đầu; và khả năng tự kết dính và đồng kết dính với *Staphylococcus aureus* là 24,49 % và 14,19 %, khả năng bám dính với các dung môi xylene, ethyl acetate và chloroform lần lượt là 61,66%, 52,31% và 83,76 %. Chính vì vậy, chủng này có tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mai Đàm Linh, Đỗ Minh Phương, Phạm Thị Tuyết, Kiều Hữu Ảnh, Nguyễn Thị Giang, *Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn thành phố Hà Nội*, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 24: (2008), 221-226.
2. Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn, *Một số đặc điểm phân loại của hai chủng vi khuẩn lactic HN11 và HN34 sinh tổng hợp L(+)-Lactic axit phân lập tại Việt Nam*, Tạp chí Công nghệ sinh học 6(4): (2008), 505-511.
3. Axelsson L., *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*, in: *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. 3rd edition, Seppo Salminen, Atte von Wright, Arthur Ouwehand, Marcel Dekker, Inc, New York, USA: (2004), 19-85.
4. Cock L S, Rodríguez de Stouvenel A., *Lactic axit production by a strain of Lactococcus lactis subs lactis isolated from sugar cane plants*, Electronic Journal of Biotechnology, Vol.9 No.1: (2006), 40-45.
5. Liong M T and Shah N P., *Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains*, J. Dairy Sci. 88: (2005), 55–66.
6. Maria VP., *Molecular and physiological studies on the functionality of probiotic lactobacilli*, Doctor thesis on Biochemistry, Karlsruhe University, Argentina, (2006).
7. Provencio D, Lopis, Antolin, Torres, Monedero., *Adhesion properties of Lactobacillus*

casei strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix, Arch Microbiol, 191: (2009), 153-161.

8. Rahman MM, Woan-Sub Kim WS, Kumura H, Shimazaki KI, *Autoaggregation and surface hydrophobicity of Bifidobacteria*, World J Microbiol Biotechnol, 24: (2008), 1593–1598.

IDENTIFICATION AND SOME USEFUL PROPERTIES OF *Lactobacillus fermentum* DC1 ISOLATED FROM “DUA CAI”, A TRADITIONAL LACTIC FERMENTED PRODUCT IN HUE CITY, VIETNAM

Nguyen Thi Diem Huong, Do Thi Bich Thuy
College of Agriculture and Forestry, Hue University

Abstract. A lactic bacterium strain was isolated from “Dua cai”, a traditional lactic fermented product in Hue city, Vietnam. Biochemical and physiological characterizations (investigation of the growth in pH 4,4 and 9,6, at temperature 10⁰C and 45⁰C, 6,5% and 18% of NaCl concentrations, ability to produce CO₂) showed that this strain belongs to genera *Lactobacillus*. Phylogenetic analysis showed that this strain was closest to *Lactobacillus fermentum* named *Lactobacillus fermentum* DC1. The lactic acid content analysed by HPLC in culture medium was obtained after growing it in MRS medium for 72 hours at 37⁰C was 20,93 g/l. Study of potential probiotic showed that this strain had high promise. The percents of cell number surviving after incubation in pH2 in one hour, two hours and 3 hour are 75,21%, 68,35% and 66,25% respectively compared with the initial. The bile salt tolerance of this strain was high; after 4 hours of incubation in 0,3% of bile salt solution Δ OD in 600 nm was 0,516. It exhibited the ability of autoaggregation to be 24.49% and that of coaggregation with *Staphylococcus aureus* to be 14,19%. Its abilities of adhesions to xylene, ethyl acetate and chloroform were 61,66 %, 52,31% and 83,76% respectively.

Keywords: Identification, isolation, lactic acid fermentation, *Lactobacillus fermentum*, probiotic.