

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG *LACTOBACILLUS* TỪ KIM CHI DÙNG ĐỂ PHÁT TRIỂN CHẾ PHẨM SINH HỌC

Phạm Minh Hằng, Phạm Thị Thu Thủy, Nguyễn Việt Không
Viện Thú y

TÓM TẮT

Chế phẩm sinh học là những vi sinh vật sống, khi được sử dụng với số lượng vừa đủ sẽ mang lại lợi ích về sức khỏe cho vật chủ. Hiện nay, chế phẩm sinh học được chấp nhận là những lựa chọn thay thế thích hợp cho kháng sinh trong việc kiểm soát nhiễm khuẩn và cải thiện hiệu suất vật nuôi. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và đánh giá đặc tính sinh học của một số chủng *Lactobacillus* từ kim chi để phát triển chế phẩm sinh học. Ảnh hưởng của lượng đường, thời gian và bổ sung chất dinh dưỡng đối với hiệu suất lên men của vi khuẩn cũng được nghiên cứu. Tám trong số các khuẩn lạc, bao gồm *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* và *L. plantarum* đã được phân lập, xác định bằng cách sử dụng trình tự gen 16S rRNA và sàng lọc sơ bộ về khả năng chịu acid đã được lựa chọn. Các chủng vi khuẩn này có thể chịu được pH=2 trong 2 giờ, tạo ra acid lactic cho pH<4. Các chủng *Lactobacillus* có thể sinh trưởng tốt trong 5 ngày ở 3% rỉ đường và 0,19% rỉ đường bổ sung vào cám gạo.

Từ khóa: *Lactobacillus*, chế phẩm sinh học, rỉ đường, cám gạo, lên men.

Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains from kimchi for development of probiotics

Pham Minh Hang, Pham Thi Thu Thuy, Nguyen Viet Khong

SUMMARY

Probiotics are the live microorganisms, when they are used with the adequate amounts, probiotics bring health benefit for the host animals. Now probiotics are accepted as the suitable alternatives to antibiotics in the control of bacteria infection and improving the animal production. The objective of this study aimed at isolating, identifying, and characterizing some *Lactobacillus* strains from kimchi for developing the potential probiotics. The effects of sugar content, time and nutrient supplementing for fermentation performance were also investigated. Eight colonies including *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* and *L. plantarum* were isolated, identified by using 16S rRNA gene sequences and a preliminary screening for acid tolerance, eight of the best isolates were selected. They were able to tolerate pH=2 for 2 hours, produced acid lactic for pH<4. *Lactobacillus* species could grow well in 5 days with 3% of molasses and 0.19% of molasses supplementation with rice bran.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotics, molasses, rice bran, fermentation.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chế phẩm sinh học đã được nghiên cứu rộng rãi từ rất lâu vì khả năng điều chỉnh hệ vi sinh vật đường ruột và hệ thống miễn dịch ở cả người và vật nuôi (Celiberto *et al.*, 2017), trong đó chúng được dùng như thuốc dự phòng cũng như điều trị bệnh trong nhân y và thú y. Một chế phẩm sinh học tốt phải không gây bệnh, không độc hại và có khả năng tạo ảnh hưởng có lợi cho vật chủ. Chúng có khả năng sống sót và chuyển hóa trong môi trường ổng tiêu hóa, đồng thời

có khả năng tồn tại và ổn định ở điều kiện bảo quản và điều kiện thực địa. Chế phẩm sinh học đã được chứng minh có tác dụng thúc đẩy tăng trưởng, cải thiện hiệu quả sử dụng thức ăn, bảo vệ vật chủ khỏi nhiễm khuẩn đường ruột và kích thích phản ứng miễn dịch ở động vật chăn nuôi (Ezema, 2013). Do đó, chế phẩm sinh học được coi là một lựa chọn mới, an toàn và khả thi thay thế kháng sinh trong kiểm soát nhiễm khuẩn và tăng hiệu suất của vật nuôi (Zhao *et al.*, 2015).

Vi khuẩn lactic đặc biệt là *Lactobacillus* là những

vi sinh vật được sử dụng phổ biến nhất làm chế phẩm sinh học do chúng là thành viên mong muốn của hệ vi sinh đường ruột và vì những vi khuẩn này “được công nhận là an toàn” (Generally Recognized As Safe - GRAS). *Lactobacillus* thường được tìm thấy trong môi trường như đất, nước, thực vật phân hủy, cũng như trong hệ vi sinh bình thường của đường tiêu hóa (GIT) động vật (Adhikari và Kwon, 2017).

Mục đích của nghiên cứu này là phân lập và xác định đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. từ kim chi như nguồn chế phẩm sinh học tiềm năng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- MRS agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE) (Hi-Media, India)

- Lactobacilli MRS broth (Hi-Media, India)

- Acid citric (Trung Quốc)

- Yeast extract (Hi-Media, India)

- PBS (Invitrogen), giấy kiểm tra pH (Advantec)

- QIAamp Cador pathogen mini kit (Qiagen, Germany)

- Primers, Ethanol 100% (Applichem GmbH, Germany), DNase I (Ambion, Inc., Carlsbad, CA, USA), runSAFE (Clever Scientific, UK), deoxynucleoside triphosphate mix (Qiagen), 10×PCR buffer (New England Biolabs, USA), DNA ladder 100 bp (New England Biolabs), Agarose - TAE blend 2,0% (Sigma), Taq DNA polymerase (New England Biolabs, USA).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp lấy mẫu* (Reuben *et al.*, 2019)

Lấy 5 mẫu kim chi khác nhau (2 mẫu được mua trong siêu thị, 2 mẫu được mua tại chợ và 1 mẫu tự làm), mỗi mẫu 100g kim chi cho vào trong túi nilon vô trùng. Mẫu được bảo quản lạnh trong thùng đá khô, sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm ngay trong ngày.

- *Phương pháp pha loãng mẫu* (FDA, 2005)

Pha loãng mẫu kim chi theo tỷ lệ 1/10 bằng cách lấy 25g mẫu cho vào túi dập mẫu chứa 225ml dung dịch PBS. Lấy 1ml của hỗn hợp pha loãng nói trên tiếp tục pha loãng mẫu theo dãy nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-3} bằng PBS.

- *Phương pháp phân lập vi khuẩn Lactobacillus* (Adhikari và Kwon, 2017)

Dùng pipet hút 100µl dung dịch từ mỗi ống của dãy pha loãng nhỏ lên trên bề mặt đĩa thạch MRS. Láng đều mặt thạch bằng que cấy thủy tinh hình tam giác. Mỗi nồng độ pha loãng nuôi cấy trên 1 đĩa và ở nhiệt độ 37°C/ 24-72h ở điều kiện hiếu khí. Trên đĩa thạch, các khuẩn lạc riêng rẽ màu trắng và kem được chọn và được tinh sạch qua ba lần cấy chuyển liên tiếp trên môi trường thạch MRS.

- *Phương pháp nhận dạng Lactobacillus spp.* (Talib *et al.*, 2019)

Nhận dạng các dòng vi khuẩn được phân lập bằng phương pháp PCR và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA được tóm tắt như sau:

Môi trường nuôi cấy MRS qua đêm (1,5ml) của 10 khuẩn lạc tinh sạch được ly tâm ở 4200 rpm trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Cụm tế bào được chiết tách genomic DNA bằng QIAamp Cador pathogen mini kit (Qiagen). 16S rRNA gen của *L. acidophilus*, *L. case*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* được nhân lên bằng phương pháp PCR. Chu trình PCR: 94°C trong 4 phút; 35 chu kỳ ở 94°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây và bước kéo dài 72°C trong 1 phút; và bước kéo dài cuối cùng được điều chỉnh ở 72°C trong 4 phút.

Đoạn gen 16S rRNA của *L. acidophilus*, *L. case*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* được gửi đi phân tích trình tự nucleotide bằng phương pháp giải trình tự Sanger ở công ty Phù Sa. Các chuỗi trình tự được kiểm tra lỗi bằng phần mềm BioEdit 7.2, căn chỉnh trên phần mềm MEGA v6.0 (Tamura và ctv, 2013), được nhận dạng thông BLAST (Nucleotide BLAST, database 16S rRNA sequences) và được công bố trên GenBank: LC604800, LC604801, LC604802, LC604803.

- *Phương pháp kiểm tra sự thuần khiết*

Môi trường nuôi cấy *Lactobacillus* được nhuộm gram để kiểm tra đặc điểm hình thái và độ thuần khiết dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40X và 100X.

- Phương pháp xác định vi khuẩn tổng số (FDA, 2005)

Dùng pipet hút 100µl dung dịch từ mỗi ống của dây pha loãng nhỏ lên trên bề mặt đĩa thạch MRS. Láng đều mặt thạch bằng que cấy thủy tinh hình tam giác. Mỗi nồng độ pha loãng nuôi cấy trên 2 đĩa và ở nhiệt độ 35°C/ 48h.

Công thức tính vi khuẩn tổng số (TCVN 6404: 2016):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

N = Số khuẩn lạc có trong mẫu;

$\sum C$ = là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa được giữ lại từ hai độ pha loãng liên tiếp, trong đó ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 10 khuẩn lạc;

V = là thể tích chất cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml);

d = là độ pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng đầu tiên được giữ lại

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy và thời gian nuôi cấy đến sự phát triển của *Lactobacillus* (Reuben *et al.*, 2019)

Mỗi chủng *Lactobacillus* ở nồng độ $10^7 \log$ CFU/ml được nuôi cấy trong môi trường cám gạo với các hàm lượng đường bổ sung khác nhau 0,5%, 1%, 2% và 3% hoặc được nuôi cấy trong môi trường ri mật đường ở các nồng độ 0,5%, 1%, 2% và 3% tại nhiệt độ 35°C trong thời gian 24h,



Hình 1A. Hình thái khuẩn lạc của *Lactobacillus* spp. trên thạch MRS ở 35°C sau 48 giờ nuôi cấy

48h, 72h, 5 ngày và 15 ngày.

- Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được nhập vào phần mềm Excel 2010 và được phân tích theo phương pháp: One-way ANOVA (ANalysis Of VAriance) with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) test for comparing multiple treatments (Brooks và Johanson, 2011). Đánh giá mức độ ý nghĩa thống kê bằng xem xét giá trị p-value trong mỗi trắc nghiệm trong đó $p < 0,05$ thì nghiên cứu có ý nghĩa thống kê và $p > 0,05$ thì nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập, thuần khiết chủng vi khuẩn, định danh

Chi *Lactobacillus* bao gồm hơn 200 loài khác nhau được đặc trưng bởi đặc tính sinh lý đa dạng (Lukjancenکو *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn các chủng *Lactobacillus* sp. có hoạt tính lợi khuẩn tiềm năng trong số các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được phân lập từ kim chi. Các khuẩn lạc có đầu nhọn, màu trắng và kem đặc trưng cho *Lactobacillus* spp. trên mặt thạch MRS (hình 1A) được lựa chọn.

Các khuẩn lạc được thuần khiết bằng cách cấy truyền 3 lần liên tiếp trên thạch MRS và được kiểm tra hình thái bằng nhuộm gram. Trên vi trường thuần nhất dòng *Lactobacillus* spp. có dạng hình que, bắt màu gram dương (hình 1B).



Hình 1B. Hình thái vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được nhuộm gram dưới kính hiển vi (1000x)

Phương pháp PCR được sử dụng để với các cặp môi như trình bày trong định danh các vi khuẩn phân lập được hình 2.

ttgqgttaagtcccqcaacgagcgcacacccttggtactagttgccagcattaagtggggcac
tctagtgagactgcccgtgacaaaccggaggaaggtggggaacgacgacagatcatcatgc
cccttatgacctgggctacacacgctgctacaatggacggtacaacgagtcgcgaactcgc
gagggcaagcaaattctttaaaccgttctcaqgtccgactqcaggcgtgcaactcgcctg
L. acidophilus

ttgaaqaaagctttccggtcgtaaaaactctgttgggagaagaatggtcggcagagtaa
ctgt-gtcggcgtgacggtatccaaccagaaagccacggcctaactacggtccagcagccg
Cggtaatacgtaggtggcaagcgttatctggatttattggcgtaaagcgagcgcagggcg
gttttttaagtctgatgtgaaagccctcggcttaaccgaggaagcgcacatcggaaactggg
aaacttgagtgacagaagaggacagtggaactccatgtgtagcgggtgaaatgcgtagatat
atggaagaacaccagtgggcgaagggcgtgtctgtgtgtaactgacgctgaggtcggaa
agcatgggtagcgaacaggattagataccctggtagtccatgccgtaaacgatgaatgct
aggtgttgagggttccgccttcaqgtccqcagctaacgcattaagcattccgcctg
L. Casei

taacacgtggqcaatctgcctaaaagactgggataaccacttggaacaggtgctaatacc
ggataacaacatgaatcgcgatgattcaagttgaaaggcggcgaactcgtcacttttagg
atgagcccgcggcgcatttagctagttggtgggtaaaaggctaccaaggcaatgatgcgt
agccgagttgagagactgatcggccacattgggactgagacacggcccaactcctacgg
gaggcagcagtagggaatctccacaatggacgcaagctctgatggagcaacgcgcgtga

gtgaagaaggtcttcggatcgtaaagctctgttgggtggaagaaggatagaggcagtaa
ctggtctttatttgacggtaatcaaccagaaagtcacggcctaactacggtccagcagccg
cggtaatacgtaggtggcaagcgttctcggatttattggcgtaaagcgagcgcagggcg
gaatgataaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggaactgcacatcggaaactgtc
attcttgagtgacagaagaggagagtggaactccatggtaqcggtggaatgcqtagat
L. Delb

ggtgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccqcaacgagcgcacaccctt
attatcagttgccagcattaagtgggcaactctggtagactgccggtgacaaaccggag
gaaggtgggatgacgtcaaatcatcatgccccttatgacctgggtacacacggtgtac
aatggatggtacaacgagttgcgaactcgcgagagtaagctaattctttaaagccattct
cagttcggattgtagcgtgcaactcgcctacatgaagtcggaatcgtagtaatcgcgga
tcagcatgccgggtgaatacgttcccgggccttqtacacaccgcccqtcacaccatgag
L. plantarum

Hình 2. Vị trí và trình tự các cặp môi định danh Lactobacillus

Gen 16S rRNA của *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* và *L. plantarum* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR đã tạo ra các sản phẩm có kích thước khoảng 240p-500bp, như thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Hình ảnh PCR gen 16S rRNA của Lactobacillus spp.

Giếng 1, 2, 3: mẫu dương với *L. acidophilus*; giếng 4: mẫu âm tính; giếng 5, 7, 13: đối chứng âm; giếng 6: marker; giếng 8, 9, 10, 11, 12: mẫu dương với *L. plantarum*; giếng 14, 15, 17, 18: mẫu dương với *L. casei*; giếng 16: mẫu dương với *L. delbrueckii*.

3.2. Xác định khả năng chịu acid của các chủng vi khuẩn được phân lập

Thời gian cho ăn, tuổi và loài vật nuôi có ảnh hưởng đến pH của dịch vị; có thể thay đổi từ 2,0 đến 3,5. Probiotics phải tồn tại trong môi trường acid nói trên nếu chúng xâm nhập vào vật chủ và cư trú ở ruột non. Vi khuẩn *Lactobacillus* bản chất có khả năng kháng acid. Mặc dù có sự khác biệt giữa các loài và các chủng *Lactobacillus* nhưng nhìn chung vi khuẩn thường biểu hiện độ miễn cảm tăng lên ở môi trường pH dưới 3,0. Bên cạnh đó, vi khuẩn này còn sản sinh acid lactic và các hợp chất cacbonyl. Acid lactic làm giảm độ pH dẫn đến ức chế sự phát triển vi sinh vật gây bệnh (Gutiérrez *et al.*, 2016). Do đó, khả năng chịu acid và sản sinh pH thấp là những đặc tính mong muốn để lựa chọn các chủng *Lactobacillus* lợi khuẩn tiềm năng. Để lựa chọn các chủng *Lactobacillus* có thể sống sót trong điều kiện acid, chúng tôi đã nuôi cấy 4 loại *Lactobacillus* nói trên trong môi trường dung dịch MRS có bổ sung acid citric để pH=2 ở nhiệt độ 35°C trong 2h. Sau khi ủ; 0,1ml dung dịch nuôi cấy của mỗi loại *Lactobacillus* được phết trên mặt thạch MRS bằng que cấy thủy tinh và được ủ ở nhiệt độ 35°C trong 36h. Chỉ 3-4 khuẩn lạc mỗi loại *Lactobacillus* có thể sống sót, tiếp tục được nuôi cấy trong môi trường dung dịch MRS pH=4,5 ở nhiệt độ 35°C trong 24h. Để kiểm tra khả năng sản sinh acid trong quá trình nuôi

cấy, khuẩn lạc mỗi loại *Lactobacillus* được nuôi cấy trong môi trường MRS có pH = 6,2 trong 48h. pH của môi trường nuôi cấy được kiểm tra bằng giấy thử (Advantec) sau 24h và 48h nuôi cấy. Chỉ những khuẩn lạc có khả năng sản sinh acid làm pH của môi trường xuống ≤ 4 mới được lựa chọn. Cuối cùng 4 khuẩn lạc của 4 loại *Lactobacillus* đã được lựa chọn, được giải trình tự và được công bố trên GenBank với các mã số LC604800, LC604801, LC604802, LC604803.

3.3. Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn *Lactobacillus*

Sự phát triển của vi khuẩn acid lactic bị ảnh hưởng rất nhiều bởi các điều kiện lên men như nhiệt độ, thời gian, hàm lượng đường và thành phần các chất trong môi trường, trong đó các loại môi trường tăng trưởng đóng một vai trò quan trọng đối với khả năng tồn tại của vi khuẩn. Do đó quá trình lên men là một yếu tố quan trọng nhất trong sản xuất quy mô lớn chế phẩm sinh học.

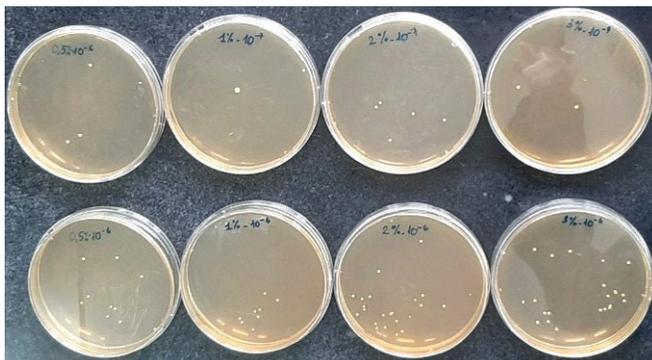
Để đánh giá các yếu tố nhiệt độ, thời gian và hàm lượng đường (saccharose) ảnh hưởng thế nào đến quá trình phát triển và tồn tại của vi khuẩn *Lactobacillus*, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm nuôi cấy vi khuẩn trên 2 loại môi trường: môi trường dung dịch rỉ mật đường và môi trường cám gạo bổ sung rỉ mật đường ở 35°C trong thời gian nuôi cấy khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 1, 2 và hình 4.

Bảng 1. Sự phát triển của *Lactobacillus* trong môi trường dung dịch rỉ mật đường

Thời gian nuôi cấy	Hàm lượng rỉ mật đường (số lượng khuẩn lạc log CFU/ml)				P
	A (0,5%)	B (1%)	C (2%)	D (3%)	
E (24h)	6,65±0,13	7,3±0,12	7,38±0,2	7,49±0,31	
F (48h)	7,22±0,05	8,15±0,03	8,18±0,12	8,3±0,07	0,06 (E và F)
G (72h)	7,65±0,1	8,29±0,15	8,39±0,05	8,44±0,13	0,01 (E và G)
H (5 ngày)	7,9±0,16	8,29±0,08	8,16±0,11	8,56±0,09	0,009 (E và H)
I (15 ngày)	7,8±0,16	7,8±0,1	8,16±0,09	8,29±0,06	0,05 (E và I)
P		A và B 0,2	A và C 0,1	A và D 0,04	

Kết quả cho thấy trong số 4 dung dịch rỉ mật đường nồng độ từ 0,5-3%; số lượng khuẩn lạc của dung dịch D (3% mật rỉ đường) là cao nhất và cao hơn đáng kể so với dung dịch A (0,5% rỉ

mật đường) khi giá trị $p < 0,05$. Số lượng khuẩn lạc *Lactobacillus* của dung dịch B (1% rỉ mật đường) và C (2% rỉ mật đường) không có sự sai khác so với dung dịch A khi $p > 0,05$ (bảng 1 và hình 4).



Hình 4. Sự phát triển của *Lactobacillus* trong môi trường dung dịch rỉ mật đường

Đánh giá về thời gian nuôi cấy ảnh hưởng đến số lượng khuẩn lạc *Lactobacillus*, ở thời gian nuôi cấy E (24h) so với thời gian nuôi cấy F (48h) không có sự chênh lệch nhiều ($p > 0,05$). Tuy nhiên khi so sánh số khuẩn lạc ở mốc thời gian E với 2 mốc thời gian G (72h) và H (5 ngày) thì có sự chênh lệch rõ rệt ($p < 0,05$). Trong đó số khuẩn lạc ở mốc thời gian H cao nhất đối với tất cả các nồng

độ dung dịch mật rỉ đường (bảng 1).

Kết quả nghiên cứu sự phát triển *Lactobacillus* trên môi trường nuôi cấy cám gạo bổ sung rỉ mật đường cho thấy vi khuẩn phát triển tương đối tốt với cả ba nồng độ rỉ mật đường khác nhau bổ sung, sau 48h cả ba nồng độ có số lượng khuẩn lạc đạt > 9 log CFU/ml (bảng 2).

Bảng 2. Sự phát triển của *Lactobacillus* trong môi trường cám gạo bổ sung rỉ mật đường

Thời gian	Hàm lượng rỉ mật đường bổ sung vào cám gạo (số lượng khuẩn lạc - log CFU/ml)		
	0,1%	0,14%	0,19%
24h	7,9±0,09	8,07±0,11	8,25±0,08
48h	9,43±0,13	9,45±0,1	9,52±0,15
5 ngày	Bị mốc	6,25±0,07	6,56±0,05
10 ngày	Bị mốc	Bị mốc	4,15±0,31

Tuy nhiên sau 5-10 ngày nuôi cấy ở môi trường bổ sung 0,1% và 0,14% rỉ mật đường; các đĩa nuôi cấy đã có nấm mốc phát triển. Còn môi trường bổ sung 0,19% rỉ mật đường tuy không có nấm mốc nhưng số lượng khuẩn lạc ở ngày thứ 10 giảm đi đáng kể; chỉ còn 4,15±0,31 log CFU/ml.

Trong số các vi sinh vật được sử dụng làm probiotics thì vi khuẩn lactic là vi khuẩn hiệu quả nhất và an toàn nhất vì chúng không gây bệnh cho động vật hoặc con người. Chúng sử dụng đường làm nguồn năng lượng và tạo ra acid lactic như một sản phẩm lên men ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, do đó tăng cường chức năng

đường ruột và phòng bệnh tiêu hóa. Ngoài ra, chúng sinh ra men tiêu hóa, làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn, cải thiện tăng trọng động vật và làm giảm mùi hôi trong chuồng trại chăn nuôi.

Lactobacillus spp. là loại vi khuẩn yêu cầu môi trường phức hợp cho sự phát triển và lên men như cám gạo và rỉ mật do có carbohydrate, khoáng chất, vitamin và các chất dinh dưỡng cần thiết khác. Hai hỗn hợp trên có thể trực tiếp được sử dụng làm chất nền lên men của vi khuẩn probiotic mà mức sinh khối đạt được cao hơn với môi trường yêu cầu tối thiểu cho một chế phẩm sinh học (Saman *et al.*, 2009).

Rỉ mật đường là một sản phẩm phụ từ quá trình sản xuất đường, thường bao gồm khoảng 50% (w/w) đường tổng số trong đó có glucose (Nurkhamidah *et al.*, 2019). Cám gạo là sản phẩm phụ của ngành xay xát gạo và chiếm khoảng 10% tổng trọng lượng gạo thô. Cám gạo chứa 46,1% carbohydrate trong đó 38,3% glucose và còn là một nguồn giàu vitamin, khoáng chất, amino acid, chất xơ và sterol khác (Choi, 2020). Quá trình lên men vi khuẩn lactic thường mất từ 3 đến 6 ngày để lên men hoàn toàn hàm lượng đường 5-10%. Về lý thuyết, lượng đường sẽ giảm khi thời gian lên men tăng lên vì đường đã được vi sinh vật chuyển hóa thành sản phẩm thông qua quá trình lên men (Nurkhamidah *et al.*, 2019). Như vậy, có thể giải thích tại sao số lượng khuẩn lạc *Lactobacillus* ngày thứ 15 ở môi trường rỉ mật đường và ngày thứ 10 môi trường cám gạo giảm rõ rệt, thậm chí là ở nồng độ rỉ mật đường thấp 0,1% và 0,14% vi khuẩn *Lactobacillus* đã chết và lúc này chỉ có nấm mốc mọc. Bên cạnh đó, có thể giải thích số lượng khuẩn lạc ở môi trường cám gạo bổ sung rỉ mật đường cao hơn môi trường rỉ mật đường (không bổ sung thêm gi) do trong môi trường cám gạo ngoài đường còn rất giàu vitamin và amino acid.

IV. KẾT LUẬN

Bốn loài *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* và *L. plantarum* có thể chịu được ở môi trường pH=2 và có thể sản sinh pH ≤ 4 trong quá trình lên men sinh khối đã được lựa chọn.

Bốn loài *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* và *L. plantarum* có thể phát triển tốt (>8log CFU/ml) ở môi trường rỉ mật đường 3% và môi trường cám gạo bổ sung 0,19% rỉ mật đường ở ngày thứ 5 sau nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adhikari B, Kwon YM, 2017. Characterization of the culturable subpopulations of *Lactobacillus* in the chicken intestinal tract as a resource for probiotic development. *Front Microbiol.* 8: 1389.
- Brooks GP, Johanson GA, 2011. Sample size considerations for multiple comparison procedures in ANOVA. *Journal of Modern Applied Statistical Methods* 10 (1): 97-109
- Celiberto LS, Bedani R, Rossi EA, Cavallini DC, 2017. Probiotics: The scientific evidence in the context of inflammatory bowel disease. *Crit Rev*

Food Sci Nutr. 57(9):1759-1768

- Choi HJ, 2020. Agricultural biowaste, rice bran, as carbon source to enhance biomass and lipid production: analysis with various growth rate models. *Water Sci Technol* 82(6): 1120-1130
- FDA, 2005. Bacteriological analytical manual. 18th Ed., AOAC, Washington, DC
- Ezema, C, 2013. Probiotics in animal production: A review. *J. Vet Med Ani Health* 5(11): 308-316
- Gutiérrez S, Martínez-Blanco H, Rodríguez-Aparicio LB, Ferrero MA, 2016. Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation. *J Dairy Sci.* 99(4): 2654-2665.
- Lukjancenko O, Ussery DW, Wassenaar TM, 2012. Comparative genomics of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related probiotic genera. *Microb Ecol.* 63(3): 651-673
- Nurkhamidah S, Altway A, Susianto, Rahmawati Y, Taufany F, Hendrianie H, Ni'mah H, Gunardi I, Zulaikah S, Ningrum EO, Nyamiati RD, Ramadhani A, 2019. Utilization of molasses to produce lactic acid by using *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus plantarum* materi. *Scien. Engineer:* 543: 012005
- Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, Alam RU, Jahid IK, 2019. Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiol* 19: 253.
- Saman P, Fuciños P, Vázquez J. A, Pandiella S.S, 2009. Fermentability of brown rice and rice bran for growth of human *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. *Food Technol. Biotechnol.* 49 (1): 128–132
- Talib N, Mohamad NE, Yeap SK, Hussin Y, Aziz MNM, Masarudin MJ, Sharifuddin SA, Hui YW, Ho CL, Alitheen NB, 2019. Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from Kefir samples in Malaysia. *Molecules* 24(14): 2606.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30 (12): 2725 – 2729.
- Zhao P, Kim I, 2015. Effect of direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 200: 86–92.

Ngày nhận 19-1-2021

Ngày phản biện 21-2-2021

Ngày đăng 1-7-2021