

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC CÓ TIỀM NĂNG SINH HỌC TỪ NEM CHUA ĐỂ ỨNG DỤNG SẢN XUẤT PROBIOTIC

Phạm Hồng Nhung, Nguyễn Kim Thủy, Luyện Thị Ngọc Phương,
Trần Khánh Linh, Bùi Đoàn Trang Nhung, Trần Liên Hà*

Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Đời sống con người ngày một nâng cao, con người ngày càng quan tâm đến sức khỏe hơn nên các sản phẩm có lợi cho sức khỏe cũng được quan tâm nhiều hơn. Một trong những sản phẩm sinh học được sử dụng nhiều là probiotic với khả năng hỗ trợ tăng cường sức khỏe đường ruột, hỗ trợ điều trị một số bệnh cũng như quyết định tuổi thọ con người. Vi khuẩn lactic được đánh giá là an toàn và được sử dụng nhiều để sản xuất probiotic do có tiềm năng sinh học rất lớn đối với sức khỏe con người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng Nem chua làm nguồn phân lập nhằm chọn ra chủng vi khuẩn lactic để ứng dụng tạo ra sản phẩm probiotic. Từ 296 khuẩn lạc vi khuẩn lactic phân lập từ 4 mẫu Nem chua sau nhiều phương pháp tuyển chọn cuối cùng chọn ra được hai chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 và chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 đều có khả năng sinh enzyme β -galactosidase và exopolysaccharide. Chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 có khả năng sinh enzyme thủy phân muối mật trong khi chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 không có hoạt tính này. Tuy nhiên khả năng kháng khuẩn của chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 tốt hơn chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 đối với các vi khuẩn gây bệnh: *Escherichia coli* ATTC 25922 (1,6 cm; 1,4 cm), *Bacillus cereus* ATTC 11778 (1,6 cm; 1,2 cm), *Listeria monocytogenes* ATTC 19111 (3 cm; 1,1 cm), *Salmonella typhimurium* ATTC 14028 (2,3cm; 1,3cm) và được chứng minh nguyên nhân kháng chủ yếu là do bacteriocin được tạo ra. Chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 và *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 có hoạt tính sinh học tốt để ứng dụng sản xuất sản phẩm probiotic, để đem lại lợi ích cho sức khỏe con người.

Từ khóa: β -galactosidase, enzyme hydrolase muối mật, exopolysaccharide, probiotic, vi khuẩn lactic.

MỞ ĐẦU

Tỷ lệ người bị thiếu năng hấp thụ lactose ở Việt Nam năm 2018 được báo cáo ở mức rất cao lên đến 86,8%, tỷ lệ này trên toàn thế giới được ghi nhận đạt gần 65% (Đào Việt Hằng *et al.*, 2020). Theo báo cáo của Bộ Y Tế Việt Nam, có đến gần 50% người trưởng thành bị mỡ máu cao, đây cũng là vấn đề nhức nhối trên cả thế giới khi thống kê về Gánh nặng bệnh tật toàn cầu vào năm 2019 đã chỉ ra mỡ máu cao gây ra gần 4.4 triệu ca tử vong, tương đương 7,78% số ca tử vong trên toàn cầu. Cũng theo Bộ Y tế Việt Nam, trong năm 2023, toàn quốc ghi nhận 125 vụ ngộ độc thực phẩm làm hơn 2.100 người mắc, 28 trường hợp tử vong với nguyên nhân chính là do vi khuẩn gây bệnh có trong thực phẩm. Đây là những vấn đề đang được con người đặc biệt quan tâm vậy nên các sản phẩm có thể cải thiện tình trạng sức khỏe ngày càng được chú ý đến nhiều hơn, đặc biệt là các sản phẩm probiotic. Vi khuẩn lactic là một trong những nhóm vi khuẩn probiotic thiết yếu, vừa được công nhận là an toàn, vừa có lợi cho sức khỏe con người.

Vi khuẩn lactic có khả năng sinh enzyme β -galactosidase tác động tốt tới khả năng dung nạp lactose ở người. Các exopolysaccharide và enzyme hydrolase muối mật tạo ra bởi vi khuẩn lactic có khả năng hỗ trợ giảm cholesterol trong máu (Shehata *et al.*, 2016). Vi khuẩn lactic còn có thể tạo ra nhiều hợp chất kháng khuẩn khác nhau, như hydro peroxide, carbon dioxide, diacetyl và bacteriocin. Vi khuẩn lactic ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh, làm suy giảm độc tố nấm mốc (Mokoena, 2017). Chúng an toàn cho người tiêu dùng và không làm thay đổi chất lượng cũng như độ an toàn của thực phẩm. Mục đích của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn và xác định vi khuẩn lactic có tiềm năng sinh enzyme β -galactosidase, sinh exopolysaccharide, enzyme thủy phân muối mật và khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh để ứng dụng sản xuất thực phẩm và sản phẩm probiotic, đem lại lợi ích cho sức khỏe con người.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu Nem chua được lấy từ 4 cửa hàng bán khác nhau tại Thanh Hóa, ngày lấy 30/05/2023.

Môi trường và hóa chất

Môi trường MRS Broth (Himedia, Ấn Độ). Chế độ thanh trùng: 110°C, 30 phút.

Hóa chất: X-gal (Trung Quốc), Aniline blue (Trung Quốc), CaCO_3 (Trung Quốc), CaCl_2 (Trung Quốc), muối mật (Trung Quốc).

Phương pháp phân lập

Vi khuẩn lactic có khả năng sinh axit lactic phản ứng với CaCO_3 tạo thành muối Ca-lactic và H_2CO_3 là axit kém bền nên sẽ tạo thành H_2O và CO_2 từ đó tạo thành vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn lactic. Các mẫu Nem chua được pha loãng theo hệ số 10 rồi bổ sung 100 μL dịch ở ba nồng độ pha loãng cuối cùng lên mặt thạch MRS có bổ sung 0,5% CaCO_3 . Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 48 giờ.

Tuyển chọn chủng sinh enzyme β -galactosidase

Enzyme β -galactosidase phân cắt 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) giải phóng màu xanh lam của indole. Sử dụng X-gal làm chất nền, pha với nồng độ 20 mg/ml rồi lấy 100 μL từ dịch pha loãng lên mặt thạch MRS. Các chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm lên đĩa thạch MRS đã bổ sung X-gal. Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 48 giờ. Kết quả enzyme dương tính được thể hiện bằng việc quan sát thấy màu xanh lam bao quanh sự phát triển của khuẩn lạc (Gheytanchi *et al.*, 2010).

Tuyển chọn chủng sinh exopolysaccharide

Aniline blue là một chất nhuộm màu có khả năng bắt màu với liên kết β -(1,3)-glucan của exopolysaccharide. Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trên đĩa thạch MRS có bổ sung Aniline (1 mg/ml). Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 48 giờ. Khuẩn lạc màu xanh chứng tỏ khả năng sinh exopolysaccharide (Rühmann *et al.*, 2015).

Tuyển chọn chủng sinh enzyme hydrolase muối mật (Bile salt hydrolase, BSH)

Enzyme hydrolase muối mật khử liên kết của axit mật và taurine tạo ra axit deoxycholic, axit deoxycholic kết hợp với Ca^{2+} tạo thành kết tủa. Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trên đĩa thạch MRS chứa 0,3% CaCO_3 ; 0,5% muối mật (muối natri của axit taurodeoxycholic) và 0,037% CaCl_2 . Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 72 giờ. Vùng kết tủa xung quanh khuẩn lạc cho thấy hoạt động hydrolase muối mật của vi khuẩn (Shehata *et al.*, 2016).

Xác định khả năng kháng khuẩn và sinh bacteriocin

Nuôi lỏng các chủng vi khuẩn lactic trong 24 giờ. Sau đó ly tâm 10.000 vòng trong 20 phút. Cấy 150 μL dịch chứa chủng vi khuẩn gây bệnh lên mặt thạch. Tiến hành đục lỗ thạch khoảng 4 mm và cấp 20 μL dịch sau ly tâm vào giếng. Các đĩa được nuôi trong bình yếm khí, nhiệt độ 30°C trong 16 giờ.

Bacteriocin có bản chất là protein và peptide của vi khuẩn kìm hãm hay ức chế sự phát triển của vi khuẩn khác, không gây ra các vấn đề về sức khỏe và đặc biệt bị phân hủy nhanh bởi protease. Sử dụng pepsin để phân hủy bacteriocin, sau đó dựa vào sự chênh lệch vòng kháng khuẩn khi cho pepsin và khi không cho pepsin để xác định khả năng sinh bacteriocin của chủng. Dựa trên phương pháp của Techo và đồng tác giả (2018), nuôi các chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS lỏng trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm 10.000 vòng trong 20 phút. Ủ dịch ly tâm với pepsin (1 mg/ml) trong 3 giờ. Sau đó nhỏ dịch vào giếng thạch, nuôi trong bình yếm khí 30°C trong 16 giờ.

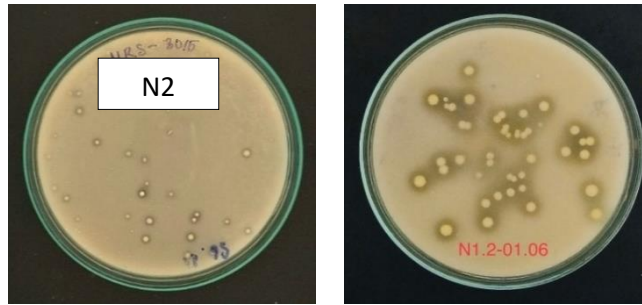
Định danh chủng

Định danh chủng vi khuẩn lactic thực hiện như sau: Tách chiết DNA và thực hiện PCR với mỗi đặc hiệu 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3', 1492R: 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3'. Sau đó giải trình tự (Công Ty Cổ Phần Phù Sa Genomics) rồi so sánh trình tự với ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH từ đó xác định được loài của mẫu vi khuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn lactic

Từ bốn mẫu Nem chua đã phân lập được 296 khuẩn lạc vi khuẩn lactic có khả năng tạo vòng phân giải với CaCO_3 . Các khuẩn lạc phân lập được có kích thước khuẩn lạc (d) và kích thước vòng phân giải (D) khác nhau. Tỷ lệ $D/d < 2$ chiếm khoảng 38,9% trong khi tỷ lệ $D/d \geq 2$ chiếm 61,1%, các khuẩn lạc có khả năng sinh axit lactic tốt chiếm đa số. Chọn đại diện 10 chủng từ mỗi mẫu, các chủng được chọn có kích thước khuẩn lạc và kích thước đường kính vòng phân giải khác nhau, 5 chủng vi khuẩn lactic có $D/d < 2$ và 5 chủng vi khuẩn lactic có $D/d \geq 2$. Từ đó, 40 chủng được chọn để tiến hành kiểm tra hoạt tính sinh học.

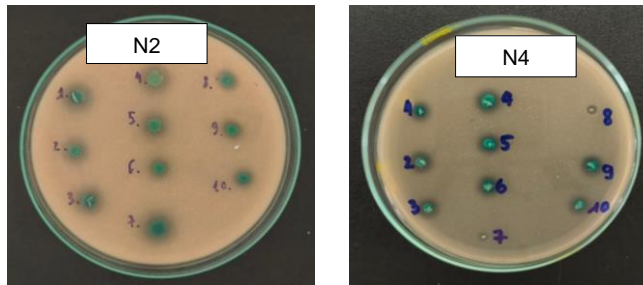


Hình 1. Mẫu khuẩn lạc phân lập

(N2 ký hiệu các chủng phân lập từ Nem chua 2; N1.2 ký hiệu các chủng phân lập từ Nem chua 1)

Tuyển chọn chủng sinh β -galactosidase

Từ kết quả phân lập chọn ra 40 chủng có sự đa dạng về kích thước khuẩn lạc cũng như khả năng sinh axit lactic. Các chủng được lựa chọn được cấy lên đĩa thạch có bổ sung X-gal để kiểm tra khả năng sinh enzyme β -galactosidase. Các chủng có khả năng sinh enzyme β -galactosidase sẽ cho khuẩn lạc có màu xanh.



Hình 2. Khả năng sinh β -galactosidase của các chủng từ mẫu N2, N4

Sau 48 giờ, kết quả thu được 35 chủng cho khuẩn lạc màu xanh nên có khả năng sinh enzyme β -galactosidase và 5 chủng không có khả năng sinh enzyme β -galactosidase do khuẩn lạc không có màu xanh. 41 chủng *Lactobacilli* phân lập từ mẫu nem chua tại thành phố Hồ Chí Minh (Le *et al.*, 2015), các chủng vi khuẩn phân lập từ sữa và phô mai cũng cho kết quả có khả năng sinh β -galactosidase (Gheyntanchi *et al.*, 2010).

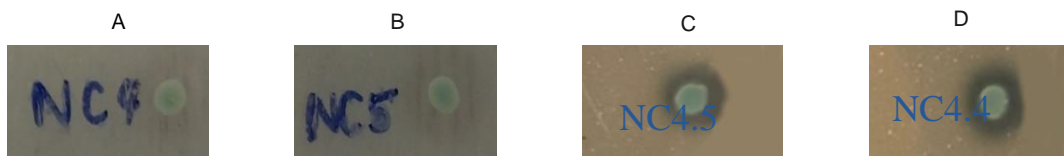
Tuyển chọn chủng sinh exopolysaccharide

35 chủng phân lập từ Nem chua sau khi tuyển chọn với khả năng sinh β -galactosidase được tiếp tục tuyển chọn khả năng sinh exopolysaccharide. Sử dụng Aniline làm thuốc nhuộm để xác định exopolysaccharide do sự biểu hiện màu khi liên kết với β -(1-3)-glucan.

Bảng 1. Biểu hiện hoạt tính exopolysaccharide

Tên chủng	NC1.2	NC1.6	NC4	NC5	NC2.6	NC3.1.2	NC3.1.3	NC4.4	NC4.5
Biểu hiện	++	+	++	++	+	+	+	++	++

(+ : biểu hiện màu xanh nhạt, ++: biểu hiện màu xanh đậm)



Hình 3. Khả năng sinh exopolysaccharide

(A: Chủng NC4, B: Chủng NC5, C: Chủng NC4.5, D: Chủng NC4.4)

Trong số 35 chủng sau tuyển chọn β -galactosidase chỉ có 9 chủng có khuẩn lạc màu xanh khi tác dụng với Aniline, được đánh giá là có khả năng sinh exopolysaccharide. Chủng NC4, NC4.4, NC4.5 có biểu hiện dương tính tốt hơn 6 chủng còn lại chứng tỏ khả năng sinh exopolysaccharide tốt hơn. Khả năng sinh exopolysaccharide cũng từng được phát hiện trên một số chủng vi khuẩn lactic *Weissella confusa* (SKP 173), *Weissella cibaria* (SKP 182), và *Leuconostoc citreum* (SKP 281) phân lập từ kim chi bằng phương pháp thay thế glucose thành sucrose

(Kang *et al.*, 2023). Theo Broder Rühmann, việc sử dụng nuôi cấy chủng vi khuẩn lactic lên môi trường đĩa thạch có bổ sung sucrose có thể tạo ra hiện tượng âm tính giả do phương pháp này lựa chọn chủng thông qua hình thái khuẩn lạc xảy ra theo cách giải thích của con người và khó có thể được tiêu chuẩn hóa. Các polyme mới có thể không được phát hiện do thiếu sự hình thành chất nhầy rõ ràng. Ruas-Madiedo và De Los Reyes-Gavilán (2005) cũng chỉ ra rằng từ ngữ được sử dụng để mô tả các hình thức tổng hợp exopolysaccharide khác nhau của vi khuẩn lactic có thể gây nhầm lẫn. Vì vậy nghiên cứu này đã sử dụng Aniline làm thuốc nhuộm để có tính chính xác cao hơn.

Tuyển chọn chủng sinh enzyme hydrolase muối mật

Khả năng của các chủng probiotic giải độc muối mật bằng cách tạo ra hoạt tính enzyme hydrolase muối mật thường được đưa vào một trong các tiêu chí để lựa chọn chủng probiotic (Shehata *et al.*, 2016). Khi các chủng vi khuẩn lactic sản xuất enzyme BSH được cấy trên các đĩa MRS chứa muối mật, axit mật liên kết taurine được khử liên kết tạo ra axit deoxycholic. Hoạt tính sinh enzyme hydrolase muối mật của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được thể hiện trong Hình 4, axit deoxycholic kết tủa xung quanh các khuẩn lạc và khuếch tán vào môi trường xung quanh.



Hình 4. Khả năng sinh enzyme hydrolase muối mật của chủng NC4, NC4.4, NC4.5

Từ 9 chủng có khả năng sinh exopolysaccharide tiếp tục được đánh giá khả năng sinh enzyme hydrolase muối mật. Sau 72 giờ quan sát thấy có 5 chủng có tạo vòng kết tủa chứng tỏ khả năng sinh enzyme BSH. Các chủng NC4, NC4.4 và NC4.5 tạo vòng kết tủa tốt nhất (đường kính vòng kết tủa lần lượt là 6 mm, 4 mm, 6 mm), chủng NC5, NC2.6 có biểu hiện kém hơn. Sự hiện diện của enzyme thủy phân muối mật làm cho chúng có khả năng chịu đựng muối mật tốt hơn, điều này cũng giúp làm giảm mức cholesterol trong máu của vật chủ.

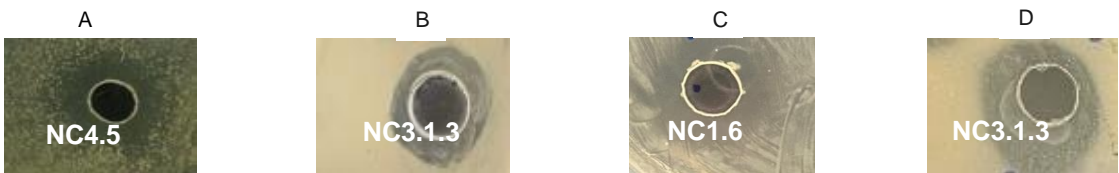
Trái ngược với kết quả của nghiên cứu hiện tại, có nghiên cứu đã báo cáo rằng hoạt động của enzyme hydrolase muối mật chưa được phát hiện ở vi khuẩn phân lập từ môi trường không có muối mật (Begley *et al.*, 2006). Đặc biệt cả 5 chủng vi khuẩn lactic dương tính với enzyme thủy phân muối mật đều không liên quan đến môi trường đường tiêu hóa. Một số chủng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa và các sản phẩm từ sữa cũng đã được xác định có khả năng sinh enzyme BSH trong báo cáo của Shehata và đồng tác giả (2016) theo phương pháp này.

Xác định khả năng kháng khuẩn và sinh bacteriocin

Sử dụng 4 chủng vi khuẩn gây bệnh: *Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 11778, *Listeria monocytogenes* ATTC 19111, *Salmonella typhimurium* ATTC 14028 để đánh giá khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic.

Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn (Đơn vị: cm)

Tên chủng	NC1.2	NC1.6	NC4	NC5	NC2.6	NC3.1.2	NC3.1.3	NC4.4	NC4.5
<i>Bacillus cereus</i> ATTC 11778	-	-	1,4	1,6	1,3	1,0	1,6	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922	1,1	1,2	1,2	1,5	1,3	1,6	1,6	0,9	1,2
<i>Listeria monocytogenes</i> ATTC 19111	-	-	1,1	-	-	1,0	2,5	-	1,0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATTC 14028	-	1,5	1,3	1,5	1,7	1,3	1,75	-	1,0



Hình 5. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh

(A: Vi khuẩn chỉ thị *Escherichia coli* ATTC 25922, B: Vi khuẩn chỉ thị *Bacillus cereus* ATTC 11778, C: Vi khuẩn chỉ thị *Salmonella typhimurium* ATTC 14028, D: Vi khuẩn chỉ thị *Listeria monocytogenes* ATTC 19111)

Từ kết quả Bảng 2. cho thấy chủng NC3.1.3 và NC4 có khả năng kháng cả 4 loại vi khuẩn gây bệnh (*Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 11778, *Listeria monocytogenes* ATTC 19111, *Salmonella typhimurium* ATTC 14028) nhưng khả năng kháng của chủng NC3.1.3 tốt hơn chủng NC4 với biểu hiện vòng kháng khuẩn có đường kính lớn. Tiến hành khảo sát khả năng sinh bacteriocin của chủng NC3.1.3.



Hình 6. Khả năng sinh bacteriocin của chủng NC3.1.3

(A: Vi khuẩn chỉ thị *Escherichia coli* ATTC 25922, B: Vi khuẩn chỉ thị *Salmonella typhimurium* ATTC 14028, C: Vi khuẩn chỉ thị *Listeria monocytogenes* ATTC 19111; Ký hiệu P: có bổ sung pepsin)

Sau khi ủ pepsin trong 12 giờ, không quan sát thấy vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch chứng tỏ yếu tố kháng khuẩn có bản chất protein hoặc peptide đã bị phân hủy bởi pepsin. Các hợp chất kháng khuẩn có bản chất là peptide hay protein do vi khuẩn sản xuất ra được gọi là bacteriocin nên trong nghiên cứu này đã sử dụng pepsin làm enzyme để phân giải bacteriocin, các protein và peptide bị phân hủy dẫn đến chủng NC3.1.3 không còn khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh trên. Do đó, có thể kết luận chủng NC3.1.3 kháng một số vi khuẩn gây bệnh là do có bacteriocin. Hoạt tính kháng khuẩn do bacteriocin của vi khuẩn lactic phân lập từ Nem chua đã được nghiên cứu trước đây và được báo cáo với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình từ 9,75 mm – 16 mm (Võ Ngọc Chi *et al.*, 2021). Theo Le và đồng tác giả (2015) đã báo cáo, các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ Nem chua có khả năng kháng *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* có thể do yếu tố khác không phải axit hữu cơ.

Như vậy, sau khi trải qua quá trình tuyển chọn về các đặc tính sinh học, cuối cùng chọn ra 2 chủng NC4 và NC3.1.3 là hai chủng có nhiều tiềm năng sinh học để đem đi định danh.

Định danh chủng

Các phương pháp phân tử rất quan trọng để nhận dạng vi khuẩn và có thể chính xác hơn đối với các phương pháp kiểu hình thông thường. Trong nghiên cứu này, 16S-rARN của 2 chủng vi khuẩn lactic NC4 và NC3.1.3 đã được khuếch đại và giải trình tự để nhận dạng. Sau khi thu được trình tự 16S-rARN chủng NC4 với độ dài 1436bp và chủng NC3.1.3 là 1414bp, tiến hành chạy trên chương trình BLAST SEARCH để xem mức độ tương đồng với các chủng trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả giải trình tự gen cho thấy chủng NC4 thuộc loài *Pediococcus pentosaceus* với mức tương đồng 100% với chủng *Pediococcus pentosaceus* LB_34, *Pediococcus pentosaceus* LB_38 và *Pediococcus pentosaceus* LB_39. Chủng NC3.1.3 thuộc loài *Lactobacillus plantarum* với mức tương đồng 99,93% với chủng *Lactobacillus plantarum* AR513 và chủng *Lactobacillus plantarum* strain LAG1. Vì vậy, chủng NC4 định tên là *Pediococcus pentosaceus* NC4, và chủng NC3.1.3 định tên là *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3.

KẾT LUẬN

Từ 4 mẫu Nem chua phân lập được 296 khuẩn lạc, sau khi đánh giá hoạt tính sinh học, chọn ra 2 chủng tốt nhất là NC4 và NC3.1.3. Chủng NC4 cho màu xanh đậm khi tác dụng với X-gal và Aniline nên có khả năng sinh β -galactosidase và exopolysaccharide tốt. Khả năng sinh enzyme hydrolase muối mật của NC4 biểu hiện tốt với vòng kết tủa lớn (6mm), chủng NC3.1.3 không có khả năng sinh enzyme BSH, khả năng sinh β -galactosidase và exopolysaccharide kém hơn chủng NC4. Khả năng kháng khuẩn của chủng NC3.1.3 và chủng NC4 lần lượt đối với *Escherichia coli* ATTC 25922 là 1,6 cm và 1,4 cm; *Bacillus cereus* ATTC 11778 1,6 cm và 1,2 cm; *Listeria monocytogenes* ATTC 19111 2,5 cm và 1,3 cm; *Salmonella typhimurium* ATTC 14028 1,75 cm và 1,3 cm. Đồng thời đã xác định nguyên nhân kháng chủ yếu của chủng NC3.1.3 là do bacteriocin. Chủng NC4 và NC3.1.3 được định danh bằng 16S-rARN và xác định tên của chủng lần lượt là *Pediococcus pentosaceus* NC4 và chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Begley M, Hill C, Gahan CG (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol*, 72(3): 1729-1738.
- Gheyntanchi E, Heshmati F, Shargh BK, Nowroozi J, Movahedzadeh F (2010). Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *Afr J Microbiol Res*, 4(6): 454-458.
- Đào Việt Hằng, Trần Thị Phụng, Hall R, Đào Văn Long (2020). Bước đầu khảo sát tình trạng kém hấp thu lactose ở người Việt Nam. *Journal of 108 - Clinical Medicine and Pharmacy*, 13(7): 57-62.
- Kang YJ, Kim TJ, Kim MJ, Yoo JY, Kim JH (2023). Isolation of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria from Pa-Kimchi and Characterization of Exopolysaccharides. *Microbiol Biotechnol Lett*, 51(2): 157–166.
- Nguyen Thi My Le, Nguyen Thuy Huong, Pham Viet Nam (2015). Probiotic properties of Lactobacilli isolated from Vietnam traditional fermented foods. *Int J Energy Environ Eng*, 3(1): 06-12.

- Mokoena MP (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8): 1255
- Ruas-Madiedo P, De Los Reyes-Gavilán CG (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 88(3): 843-856.
- Rühmann B, Schmid J, Sieber V (2015). Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol*, 6: 565.
- Shehata MG, El Sohaimy SA, El-Sahn MA, Youssef MM (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Ann Agric Sci*, 61(1): 65-75.
- Techo S, Visessanguan W, Vilaichone RK, Tanasupawat S (2019). Characterization and Antibacterial Activity Against *Helicobacter pylori* of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Fermented Rice Noodle. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 11(1): 92-102.
- Võ Ngọc Chi, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Đinh Anh Khoa, Phan Bích Tuyết, Hoàng Diễm Hằng, Lê Thị Thủy, Kha Chấn Tuyên (2021). Khảo sát khả năng sinh bacteriocin của vi khuẩn lactic phân lập trên nem chua Thủ Đức. *Tạp Chí Nông nghiệp Và Phát triển*, 20(2): 62-68.

ISOLATION AND SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA WITH PROBIOTIC POTENTIALS FROM NEM CHUA FOR APPLICATION IN PROBIOTIC PRODUCTION

**Pham Hong Nhung, Nguyen Kim Thuy, Luyen Thi Ngoc Phuong,
Tran Khanh Linh, Bui Doan Trang Nhung, Tran Lien Ha***

School of Chemistry and Life Science, Hanoi university of Science and Technology

SUMMARY

In an era of advancing human lifestyles, heightened awareness of health issues has intensified interest in health-promoting products. Probiotics, particularly those derived from lactic acid bacteria, have gained significant attention for their potential to enhance gut health, aid in disease management, and potentially extend human lifespan. Lactic acid bacteria are considered safe and are extensively used in probiotic production due to their significant biological potential for human health. This study focused on isolating lactic acid bacteria strains from Nem chua, a Vietnamese traditional fermented pork sausage, to explore their probiotic potential. Among 296 lactic acid bacteria strains isolated from 4 Nem chua samples, after various selection methods, we identified two strains: *Pediococcus pentosaceus* NC4 and *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3. Both strains exhibited enzymatic activity in β -galactosidase and exopolysaccharide production. *Pediococcus pentosaceus* NC4 showed bile salt hydrolase enzyme activity, while *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 did not. However, *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 demonstrated superior antibacterial activity compared to *Pediococcus pentosaceus* NC4 strains of *Escherichia coli* ATTC 25922 (1,6 cm; 1,4 cm), *Bacillus cereus* ATTC 11778 (1,6 cm; 1,2 cm), *Listeria monocytogenes* ATTC 19111 (3 cm; 1,1 cm), *Salmonella typhimurium* ATTC 14028 (2,3 cm; 1,3 cm), primarily attributed to bacteriocin production. The enzymatic and antimicrobial properties observed in *Pediococcus pentosaceus* NC4 and *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 highlight their suitability for further development into probiotic formulations. These findings contribute to advancing the understanding and application of probiotics in promoting human health.

Keywords: β -galactosidase lactic acid bacteria, enzyme bile salt hydrolase, exopolysaccharide, probiotic.

* Author for correspondence: Tel: 934138189; Email: Nhung.ph201203@sis.hust.edu.vn