

**CÔNG NGHỆ VI SINH,  
THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG**

# ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA NHÓM VI KHUẨN LACTIC *Lactobacillus* spp. ĐỐI KHÁNG VỚI LOÀI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* & *Aeromonas hydrophila* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA BỘT (*Pagasianodon hypophthalmus*)

Nguyễn Thành Luân\*, Phạm Quỳnh Vân, Phạm Quỳnh Anh, Nguyễn Tam Minh Hòa, Diệp Hà Như Ý

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Việc sử dụng probiotics trong phòng bệnh trên cá được xem là phương pháp an toàn, tiềm năng và bền vững đối với ngành thủy sản cũng như giúp nâng cao và cải thiện chất lượng môi trường nước. *Edwardsiella ictaluri* (EI) được biết đến là loài vi khuẩn gây bệnh gan thận mũ và vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (AH) gây bệnh xuất huyết ở các loài cá tra. Chúng thường bị ức chế sau khi thử nghiệm đối kháng *in vitro* bởi các loài vi khuẩn lactic acid (LAB) như *Lactobacillus acidophilus* (LAT) và *Lactobacillus plantarum* (BB2). Nghiên cứu này đã xác định được nồng độ gây bệnh của 2 loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (EI) và *Aeromonas hydrophila* (AH) ở mật độ sinh khối  $10^5$  CFU/mL. Nồng độ được sử dụng để đối kháng *in vitro* các loài gây bệnh từ các loài vi khuẩn *Lactobacillus* sp. ở mật độ  $10^8$  CFU/mL. Tỷ lệ phối trộn 1:1 của 2 chủng *Lactobacillus* sp. LAT và BB2 được lựa chọn cho khả năng kháng khuẩn hiệu quả trên cả hai đối tượng gây bệnh và thử nghiệm trên cá tra bột từ khi mới nở đến 1 tuần tuổi được nuôi trong các bể thử nghiệm riêng lẻ để ngăn ngừa sự hao hụt số lượng. Định lượng acid lactic chỉ ra rằng acid lactic tỷ lệ nghịch với sự gia tăng pH trong môi trường kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus*. Nghiên cứu chuyên sâu về thành phần kháng khuẩn có thể tạo ra chế phẩm cần được đánh giá nhiều hơn để mang đến tiềm năng không những sử dụng trong phòng và chữa bệnh trên cá tra mà còn có thể được ứng dụng vào nuôi trồng các loài thủy sản chất lượng cao, an toàn và sạch bệnh.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, cá tra bột, *Edwardsiella ictaluri*, *Lactobacillus* spp., probiotics.

## MỞ ĐẦU

Diện tích nuôi trồng cũng như sản lượng cá tra tăng theo từng năm, đưa sản xuất cá tra trở thành một trong những nguồn thu ngoại tệ lớn của Việt Nam (Tổng cục Thủy sản Việt Nam, 2017 & 2018). Việc mở rộng diện tích nuôi trồng nhằm gia tăng lợi nhuận với việc không được quy hoạch, nhận thức đúng cùng kinh nghiệm kém trong việc phòng và chữa bệnh cho cá nuôi làm cho môi trường nuôi cá không còn đảm bảo an toàn, mất cân bằng dinh dưỡng, độc tố, tác động tiêu cực đến năng suất. Chất lượng sản phẩm cá tra Việt Nam bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Sự ảnh hưởng đời sống cá tra chủ yếu đến từ sự tấn công của các loài virus, vi nấm, vi khuẩn (Phạm Thị Kim Oanh và Trương Hoàng Minh, 2011). Đồng thời, việc xuất hiện bệnh gan thận mũ do *Aeromonas hydrophila* (AH) và nhiễm trùng máu do *Edwardsiella ictaluri* (EI) ở cá tra trong nuôi trồng thủy sản công nghiệp gây thiệt hại nặng cho sản xuất tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (Tran *et al.*, 2013). Vấn đề nhiễm bệnh thường được giải quyết bằng vôi bột, thuốc sát trùng, kháng sinh nhưng lâu dài lại có khả năng ảnh hưởng đến điều kiện sống của cá với nguy cơ cao về khả năng kháng thuốc (Pirarat *et al.*, 2016).

Việc ứng dụng tiêm các vaccine nhược độc cho giai đoạn cá bột được nghiên cứu với tiềm năng hiệu quả cao nhưng chi phí tốn kém trong quá trình sản xuất và phối trộn, xử lý bằng phương pháp này cần được lặp lại thường xuyên, đòi hỏi trình độ chuyên môn cao (Gatesoupe, 2008). Vì thế, việc sử dụng probiotics được chú ý nghiên cứu và đánh giá như giải pháp khắc phục với probiotics có khả năng ức chế mầm bệnh, an toàn đối với môi trường thủy sản. Bên cạnh đó, chúng còn tác động tích cực lên vật chủ như một yếu tố tăng trưởng, cân bằng dinh dưỡng, cải thiện môi trường nước (Hongyu *et al.*, 2019). Vi khuẩn lactic trong đó có vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được biết đến là loài vi khuẩn có khả năng ức chế mạnh một số loài vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm, nông nghiệp, chế phẩm và xử lý môi trường. Loài vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* được phát hiện trong một số trường hợp cá nhiễm bệnh và chủng này chủ yếu ứng dụng cho cải thiện môi trường nước ao nuôi (Vaquez *et al.*, 2005). Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* được tìm thấy trên tất cả mẫu bệnh phẩm do AH và EI gây ra (Tran *et al.*, 2013). Sự phối trộn hai chủng này với mục đích tạo ra chế phẩm phòng bệnh cho cá tra, đồng thời cải thiện môi trường nước nuôi cá mở ra nhiều triển vọng đánh giá nghiên cứu về vi khuẩn tương tác ở cá tra bằng đối kháng sinh học (Older *et al.*, 2024).

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Hai chủng vi khuẩn gây bệnh *Edwardsiella ictaluri* (EI), *Aeromonas hydrophila* (AH) và bốn chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* (LA, LAT), *Lactobacillus plantarum* (BB1, BB2) chọn lọc từ ngân hàng giống nghiên cứu

có khả năng kháng khuẩn cao tại phòng thí nghiệm thuộc Khoa Sinh học và Môi trường thuộc trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh. Môi trường Brain Heart Infusion broth (BHI-broth), MRS được sử dụng cho tăng sinh và hoạt hoá vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* cùng các chủng *Lactobacillus acidophilus* LA, LAT tương ứng. Các hóa chất chính với NaOH 1N và phenolphthalein, kháng sinh Tetracycline 0,001% và nước muối sinh lý được sử dụng trong định lượng acid lactic và các chất đối chứng so sánh hiệu quả của sản phẩm probiotics với khả năng kháng vi khuẩn EI và AH trong nghiên cứu *in vitro*.

### Phương pháp nghiên cứu

#### **Xác định khả năng đối kháng của *Lactobacillus acidophilus* và *Lactobacillus plantarum* đối với các nồng độ *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila***

Các dịch tăng sinh sẽ được pha loãng đến nồng độ thí nghiệm dựa trên kết quả của thí nghiệm xác định độc lực. EI và AH được tăng sinh trên môi trường thạch BHI khảo sát từ nồng độ tế bào  $10^3$  đến  $10^7$  CFU/mL theo phương pháp đục lỗ với sáu giếng, mỗi giếng được bổ sung 100  $\mu$ L dung dịch: kháng sinh tetracycline 0.001% (đối chứng dương), nước muối sinh lý (đối chứng âm), 4 giếng với chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. sử dụng trong các thí nghiệm LA, LAT, BB1, BB2. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong vòng 24 giờ, thu nhận kết quả đường kính vòng kháng khuẩn (mm).

#### **Định lượng acid lactic**

Phương pháp định lượng acid lactic được sử dụng dựa trên phương pháp của Therner (Vazquez *et al.*, 2005) với hai chủng vi khuẩn *Lactobacillus*. sau khi được nuôi cấy trong 10 mL môi trường MRS-broth, ly tâm loại sinh khối, thêm 20 mL nước cất. Cho vào 1-2 giọt phenolphthalein 1%. Tiến hành chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi dịch xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì ngừng chuẩn độ. Khi đó độ acid lactic ( $^{\circ}$ T) được tính bằng công thức:

$$^{\circ}\text{T} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Với  $1^{\circ}\text{T} \approx 9$  mg acid lactic

Từ kết quả này, nhận xét được hàm lượng acid lactic được sinh ra theo thời gian.

#### **Đối kháng với tổng sản phẩm thứ cấp ngoại bào loại acid của *Lactobacillus* được chọn với hai chủng gây bệnh EI và AH**

Hai chủng *Lactobacillus* sp. lựa chọn được nuôi cấy trong môi trường canh lỏng MRS Broth với các mốc thời gian nhất định khảo sát ở 24 giờ, 30 giờ, 36 giờ, 42 giờ, 48 giờ, 54 giờ, 60 giờ, 66 giờ và 72 giờ. Mẫu tăng sinh được chọn lọc thể tích hút ở 1 mL dịch, ly tâm loại bỏ sinh khối. Sau đó, mẫu được tiến hành thử nghiệm đối kháng bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch trên một đĩa môi trường BHI-Agar với 4 lỗ thạch được khảo sát bao gồm: nước làm đối chứng âm, kháng sinh làm đối chứng dương, 1 lỗ cho LAT/LA và lỗ còn lại cho BB1/BB2. Mẫu được thu nhận kết quả đối kháng, so sánh với hàm lượng acid lactic sinh ra trong cùng mốc thời gian để tìm kiếm mối quan hệ giữa lượng acid lactic sinh ra với khả năng đối kháng với hai chủng gây bệnh EI và AH ở nồng độ từ  $10^3$ - $10^7$  CFU/mL.

#### **Lựa chọn tỷ lệ phối trộn hai chủng *Lactobacillus* phù hợp cho kháng khuẩn**

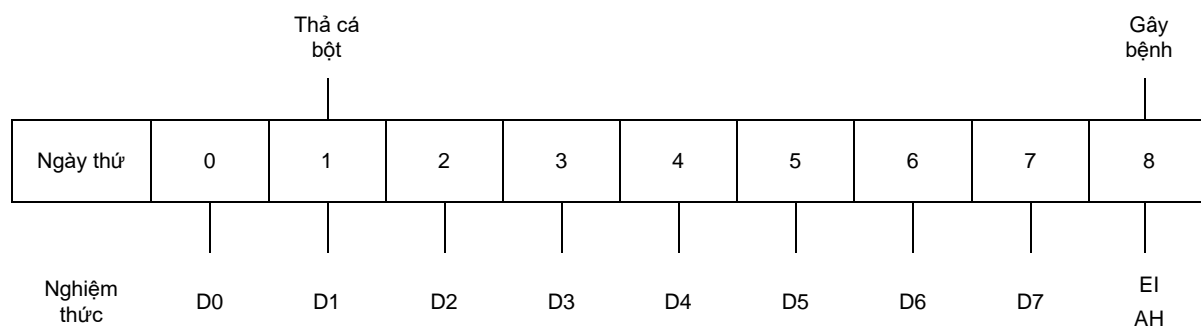
Kết quả của thí nghiệm đối kháng được tiếp tục sử dụng trong khảo sát khả năng đối kháng của 2 chủng *Lactobacillus* spp. với chủng gây bệnh để lựa chọn nồng độ kháng khuẩn. Tỷ lệ giữa *L. acidophilus*: *L. plantarum* (LAT và BB2) được khảo sát tương ứng ở 1:1, 2:1 và 1:2, được đánh giá với tổng thể tích là 60  $\mu$ L vi khuẩn đối kháng. Vì vậy, việc chọn lọc thể tích cấy cho vi khuẩn gây bệnh EI và AH khảo sát với thể tích 60  $\mu$ L, 120  $\mu$ L và 180  $\mu$ L ở mô hình *in vitro* tương ứng tỷ lệ 1:1, 1:2 và 1:3 về thể tích và mật độ vi sinh vật.

#### **Ứng dụng nồng độ phối trộn trên để khảo sát tỷ lệ sống chết ở giai đoạn cá bột**

Bố trí thí nghiệm với 8 lô cho vi khuẩn *E. ictaluri* độc lập, bao gồm: 1 lô đối chứng (chỉ thả cá, không bổ sung chế phẩm), 7 lô nghiệm thức theo dõi tương ứng các ngày khảo sát (Biểu đồ 1). Cá bột được mua từ trung tâm giống cá tra từ Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản 2, Thành phố Hồ Chí Minh. Nguồn cá thí nghiệm là cá mới nở đến 8 ngày tuổi được ươm nuôi theo quy trình từ Viện Nuôi trồng Thủy sản 2 một cách độc lập theo lô thí nghiệm. Cách chăm sóc quản lý dịch bệnh đảm bảo vô trùng khi bàn giao mẫu cá tra bột theo 10 con/lô thí nghiệm. Các nghiệm thức thử nghiệm theo chu kỳ 7 ngày (theo lô D0 đến D7 là ngày bổ sung chế phẩm). Tại ngày 1, tương ứng với nghiệm thức D1, sẽ bổ sung cá vào tất cả các thùng nghiệm thức. Vì vậy, với thùng D0 có ý nghĩa là bổ sung chế phẩm trước khi thả cá 1 ngày, từ ngày D1 sử dụng phương pháp cảm nhiễm qua phương pháp tẩm có ý nghĩa là bổ sung cá và chế phẩm cùng lúc từ nghiệm thức tối ưu theo tỷ lệ 1:1 tương ứng mật độ cảm nhiễm  $10^8$  CFU/mL với thể tích 180 mL dịch khuẩn, D2 có ý nghĩa là bổ sung chế phẩm sau khi thả cá 1 ngày, D3 có ý nghĩa là bổ sung chế phẩm sau khi thả cá 2 ngày, các nghiệm thức D4, D5, D6, D7 lần lượt bổ sung chế phẩm sau khi thả cá 3, 4, 5, 6 ngày. Đến ngày thứ 8, sẽ bổ sung chủng gây bệnh EI tương ứng theo tỷ lệ gây chết 50%  $10^8$  CFU/mL. Sau đó, tỷ lệ cá sống được theo dõi ở ngày 8, 9, 10. Thí nghiệm được thực hiện tương tự đối với AH theo tỷ lệ cảm nhiễm gây chết 50%  $10^8$  CFU/mL bằng phương pháp tẩm.

Tỷ lệ sống = số cá còn sống/số cá ban đầu \*100

Lựa chọn nghiệm thức có tỷ lệ sống cao và ổn định nhất.



Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại, thu nhận tỷ lệ cá sống trong tổng số cá thả, số liệu được thu nhận và xử lý theo phần mềm Statgraphics centurion XVI.

Biểu đồ 1. Biểu đồ bố trí nghiệm thức khảo sát theo mô hình thực nghiệm ở giai đoạn cá bột

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định khả năng đối kháng của *L. acidophilus* và *L. plantarum* đối với các nồng độ *E. ictaluri* (EI) và *A. hydrophila* (AH).

Khả năng đối kháng của *Lactobacillus acidophilus* (LAT, LA) giảm theo sự tăng nồng độ EI. Chủng LAT không có khả năng ức chế nồng độ EI  $10^7$  CFU/mL. Trong khi đó LA chỉ có hiệu suất ức chế duy nhất ở nồng độ EI  $10^3$  CFU/mL các nồng độ còn lại từ  $10^4$ - $10^7$  CFU/mL không có sự đối kháng (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng đối kháng của vi khuẩn *L. acidophilus* (LA và LAT) với *E. ictaluri* (EI)

Nồng độ EI (CFU/mL)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
	Kháng sinh	LAT	LA
$10^3$	20,00 ± 1,15 <sup>a</sup>	15,67 ± 0,88 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,32 <sup>a</sup>
$10^4$	18,00 ± 1,00 <sup>ab</sup>	14,67 ± 0,88 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>
$10^5$	18,67 ± 0,88 <sup>ab</sup>	13,00 ± 0,58 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>
$10^6$	15,50 ± 0,50 <sup>ab</sup>	12,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
$10^7$	16,00 ± 4,00 <sup>ab</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>

\*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%,  $p < 0,05$ .

Trong khoảng nồng độ từ  $10^3$ - $10^5$  CFU/mL của AH, khả năng kháng khuẩn của hai chủng *Lactobacillus* giảm dần nhưng không có sự chênh lệch nhiều giữa các nồng độ (Bảng 2). Từ nồng độ  $10^6$  CFU/mL trở lên, LAT và LA không có khả năng kháng khuẩn (Bảng 2). Sự khác biệt về khả năng kháng khuẩn của LAT và LA có thể là do sự khác nhau về thành phần, số lượng, hoạt tính của các sản phẩm ngoại bào, cách tác động của các yếu tố này hoặc khả năng đáp ứng khác nhau các yếu tố bất lợi của hai chủng gây bệnh (EI, AH).

Bảng 2. Khả năng đối kháng của vi khuẩn *L. acidophilus* LA và LAT) với *A. hydrophila* (AH)

Nồng độ AH (CFU/mL)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
	Kháng sinh (ĐC)	LAT	LA
$10^3$	20,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,67 ± 0,33 <sup>a</sup>
$10^4$	20,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	4,00 ± 1,73 <sup>a</sup>
$10^5$	20,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,58 <sup>a</sup>
$10^6$	20,67 ± 0,67 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
$10^7$	14,33 ± 0,33 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>

\*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%,  $p < 0,05$ .

**Xác định khả năng đối kháng của *L. plantarum* đối với các nồng độ *E. ictaluri* và *A. hydrophila***

Hai chủng *L. plantarum* BB1 và BB2 đều biểu hiện việc giảm khả năng đối kháng khi tăng nồng độ EI. Chủng BB1 đối kháng được với nồng độ  $10^3$ ,  $10^4$  CFU/mL trong khi đó chủng BB2 duy trì khả năng kháng khuẩn từ  $10^3$ - $10^6$  CFU/mL và luôn cho biểu hiện khả năng đối kháng tốt hơn chủng BB1 tương ứng là 11,33 và 10 mm so với 7 và 2 mm (Bảng 3).

**Bảng 3. Khả năng đối kháng của *L. plantarums* (BB1, BB2) với *E. ictaluri* (EI)**

Nồng độ EI (CFU/mL)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
	Kháng sinh (ĐC)	BB1	BB2
$10^3$	20,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	7,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	11,33 ± 2,40 <sup>a</sup>
$10^4$	18,00 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	10,00 ± 1,00 <sup>b</sup>
$10^5$	18,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	8,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>
$10^6$	15,50 ± 0,67 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	7,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
$10^7$	16,00 ± 0,33 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>

\*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%,  $p < 0,05$ .

Cả 2 chủng BB1 và BB2 đều cho thấy khả năng đối kháng tốt với AH ở nồng độ  $10^3$ - $10^5$  CFU/mL. Tương tự, cả 2 chủng đều không cho thấy khả năng đối kháng với AH ở nồng độ  $10^6$  và  $10^7$  CFU/mL. Tuy khả năng kháng khuẩn giảm khi tăng nồng độ gây bệnh, giữa BB1 và BB2 không có sự khác nhau nhiều về đường kính vòng phân giải (Bảng 4). Sự khác nhau này có thể do các yếu tố kháng khuẩn khác nhau về thành phần, hàm lượng, hoạt tính, cách tác động, khả năng đáp ứng lại các yếu tố bất lợi của hai chủng gây bệnh (EI, AH) là khác nhau.

**Bảng 4. Khả năng đối kháng của *L. plantarums* (BB1, BB2) với *A. hydrophila* (AH)**

Nồng độ AH (CFU/mL)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)		
	Kháng sinh (ĐC)	BB1	BB2
$10^3$	20,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	5,33 ± 0,67 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,67 <sup>a</sup>
$10^4$	20,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,67 <sup>ab</sup>	4,67 ± 0,33 <sup>ab</sup>
$10^5$	20,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,33 <sup>b</sup>	4,33 ± 0,33 <sup>b</sup>
$10^6$	20,67 ± 0,67 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
$10^7$	14,33 ± 0,33 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>

\*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%,  $p < 0,05$ .

**Định lượng acid lactic**

Lượng acid lactic của LAT sinh ra nhiều hơn hẳn chủng BB2, tương ứng với khối lượng dao động từ 81-225 mg theo thời gian 24 - 66 giờ nghiên cứu. Lượng acid lactic của chủng BB2 tuy sinh ra ít nhưng luôn ổn định trong khoảng 75-110 mg trong cùng thời gian khảo sát. LAT có khả năng sinh acid lactic cao và khoảng pH biến động lớn hơn BB2 sẽ dễ gây ảnh hưởng đến ứng dụng tạo chế phẩm probiotics. Chủng LAT trong 24 giờ đầu tiên pH đạt  $5,33 \pm 0,76$  mm cho thấy điều kiện môi trường này chưa phù hợp cho vi khuẩn phát triển. Do đó, acid lactic từ chủng BB2 được tiết ra để đạt pH thích hợp với tăng lượng acid lactic nhằm duy trì pH. Vì vậy, nghiên cứu có thể thấy sự tương phản của giai đoạn pH tăng thì acid lactic giảm và ngược lại (Hình 1).

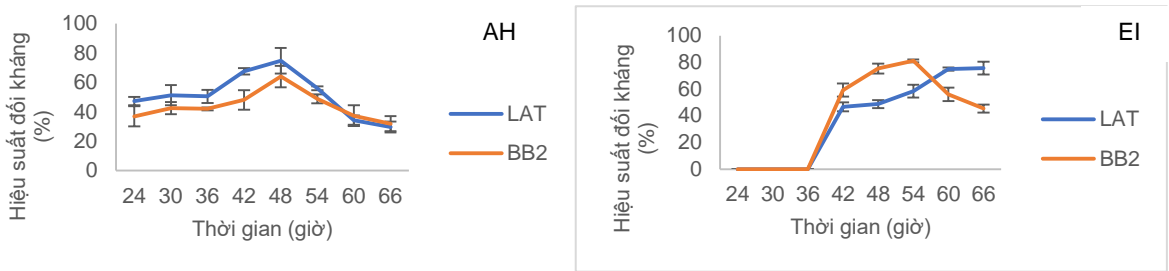


**Hình 1. Sự thay đổi pH và acid lactic của LAT và BB2 theo thời gian**

**Đối kháng với tổng sản phẩm thứ cấp ngoại bào loại acid của LAT và BB2 với AH & EI**

Hiệu suất kháng khuẩn của LAT sau khi loại acid tăng trong khoảng thời gian 24-48 giờ và giảm trong khoảng 48-66 giờ. Lượng acid lactic của LAT tăng liên tục trong 54 giờ đầu. Vậy, acid lactic không tác động hoặc tác động rất ít đến khả năng kháng khuẩn. Lượng acid lactic tăng, hiệu suất kháng khuẩn tại thời gian này cũng giảm, tại 66 giờ acid lactic của BB2 thấp hơn tại 24 giờ 3 mg/mL, nhưng hiệu suất đối kháng lại chênh lệch 5,01%; tại 66 giờ thấp hơn tại 30 giờ 0,5 mg/mL nhưng hiệu suất lại chênh lệch 10,61%. Khả năng kháng khuẩn của BB2 có được có thể là do các sản phẩm thứ cấp khác, không phải acid lactic, vì chưa thấy được sự tương quan giữa sự thay đổi của acid lactic và hiệu suất kháng khuẩn loại acid theo thời gian (Hình 2).

Lượng acid lactic LAT từ 24-30 giờ tạo ra còn ít có thể không đủ lượng để đối kháng với EI; từ 30-66 giờ, khả năng kháng khuẩn tăng liên tục trong khi hàm lượng acid lactic có sự thay đổi theo thời gian (tăng trong thời gian 30-54 giờ và giảm lúc 54-66 giờ). Vậy, acid lactic không ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của LAT mà do các sản phẩm thứ cấp khác. Khả năng kháng khuẩn của BB2 không có trong khoảng thời gian 24-36 giờ. Lượng acid lactic của BB2 ổn định trong khoảng nồng độ 75-110 mg/mL, từ 24-66 giờ. Sự thay đổi hiệu suất kháng khuẩn của BB2 đối với EI có thể là do các sản phẩm thứ cấp khác (Hình 2).



Hình 2. Hiệu suất đối kháng tổng sản phẩm thứ cấp ngoại bào loại acid của LAT và BB2 với AH & EI

**Lựa chọn tỷ lệ phối trộn hai chủng phù hợp cho kháng khuẩn**

Việc so sánh giữa các tỷ lệ phối trộn của LAT:BB2 cho thấy tỷ lệ 2:1 cho kết quả kháng khuẩn cao nhất ở hai thể tích EI thí nghiệm 60 µL, 120 µL tương ứng lần lượt là 6,33 ± 0,88 mm và 5,00 ± 0,00 mm. Tỷ lệ phối trộn 1:1 không có khả năng kháng khuẩn với vi khuẩn *A. hydrophila* (AH) gia tăng ở 180 µL. Tỷ lệ phối trộn của LAT và BB2 ở 1:1 cho kết quả đối kháng tốt ở 2 thể tích AH 60 µL và 120 µL, tương ứng là 6,33 và 5,50 mm. Vì vậy, tỷ lệ 1:1 (LAT:BB2) được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo (Bảng 5). Tuy nhiên khả năng kháng khuẩn của các tỷ lệ phối trộn không có sự khác biệt nên có thể thay thế cho nhau. Với mục tiêu xác định một tỷ lệ LAT:BB2 phù hợp cho đối kháng cả hai chủng gây bệnh dù so với đối chứng vẫn còn nhiều hạn chế. Tuy nhiên, kết quả cần một tỷ lệ vi khuẩn an toàn hơn so với việc dùng kháng nên kết quả thí nghiệm này chọn tỷ lệ 1:1 cho những nghiên cứu thực nghiệm tiếp theo (Bảng 5).

Bảng 5. Khảo sát đường kính vòng phân giải với tỷ lệ phối trộn LAT:BB2 đối kháng các thể tích khác nhau của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (AH) và *Edwardsiella ictaluri* (EI)

Thể tích AH & EI (µL)	Đường kính vòng phân giải theo tỷ lệ phối trộn LAT:BB2 (mm)			Bổ sung kháng sinh (ĐC) (mm)
	1:1	2:1 (mm)	1:2	
60	6,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	14,50 ± 0,87 <sup>a</sup>
120	5,50 ± 0,29 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	11,67 ± 0,33 <sup>b</sup>
180	0 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	11,00 ± 1,00 <sup>c</sup>

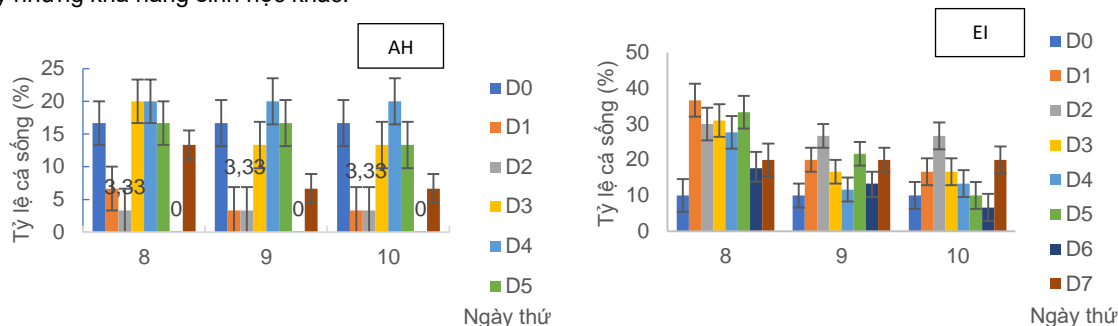
\*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%, p < 0,05.

Ứng dụng nồng độ phối trộn trên để khảo sát tỷ lệ sống chết ở giai đoạn cá bột với tỷ lệ cá sống vào ngày thứ 8, 9, 10, công độc bởi EI.

Tỷ lệ cá sống trong thí nghiệm công độc bởi AH cho thấy nghiệm thức D0, D2, D4, D6 không có sự thay đổi giữa 3 ngày khảo sát, nghiệm thức D1, D3, D5, D7 đều giảm. Không có nghiệm thức có tỷ lệ cá sống cao hơn 20%, kết quả cao nhất thu được là 20% của ngày thứ 8 của D3 và D4. Ứng dụng nồng độ phối trộn của LAT:BB2 trên cá tra bột cho thấy, sử dụng chế phẩm vào ngày thứ 2 sau thả cá bột đối với EI ngày thứ 4 sau thả cá đối với AH cho hiệu quả duy trì tỷ lệ cá sống ổn định (Biểu đồ 2).

Tỷ lệ cá tra bột sống sau khi công độc bởi EI cho kết quả có sự suy giảm qua từng ngày với ngày thứ 9 và thứ 10 của nghiệm thức D2, tỷ lệ cá sống không có sự thay đổi tương ứng ở tỷ lệ sống 26,67%. Trong khi đó, các

thực nghiệm còn lại có tỷ lệ cá sống giảm dưới 20%. Kết quả trên cho thấy ngày 8 công độc được xem là tối ưu với tỷ lệ thực nghiệm cho chủng *Edwardsiella ictaluri* (EI) khi thực nghiệm ở giai đoạn cá bột (Biểu đồ 2). Tuy nhiên, kết quả trên chưa đánh giá các yếu tố ảnh hưởng khác đến sự sinh tồn của cá như nguồn nước thay đổi hay những khả năng sinh học khác.



Biểu đồ 2. Biểu đồ tỷ lệ cá sống vào ngày thứ 8, 9, 10, công độc bởi AH & EI

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá thành công với tỷ lệ phối trộn 1:1 của hai chủng *Lactobacillus* LAT và BB2 (nồng độ  $10^8$  CFU/mL) có khả năng kháng khuẩn tối ưu đối với hai chủng gây bệnh *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*. Tuy nhiên sản phẩm thứ cấp cũng như acid lactic mà các chủng *Lactobacillus* có khả năng ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi. Thành phần kháng khuẩn của *Lactobacillus* spp. với lượng acid lactic có thể không phải nguyên liệu chủ yếu nên có thể nghiên cứu tạo ra chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao nhưng lượng acid lactic được kiểm soát ở mức thấp để tránh ảnh hưởng đến đời sống sinh vật. Kết quả nghiên cứu có thể phát triển để hoàn thiện chế phẩm sinh học bổ sung vào môi trường nước nuôi để phòng bệnh ở các giai đoạn, mở ra tiềm năng sản phẩm vừa phòng bệnh vừa cải thiện môi trường nước, tăng tỷ lệ sống của cá tra trong giai đoạn ương nuôi.

**Lời cảm ơn:** Để thực hiện đề tài này, chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến sự hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu Đề tài cấp trường dành cho giảng viên và sinh viên Nghiên cứu Khoa học của Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Gatesoupe FJ (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Micor Biotech* 14(1-3): 107-114.
- Hongyu Z, Wang H, Hu K, Jiao L, Zhao M, Yang X and Xia L (2019). Effect of Dietary Supplementation of *Lactobacillus Casei* YYL3 and *L. Plantarum* YYL5 on Growth, Immune Response and Intestinal Microbiota in Channel Catfish, *Animals* 9(12): 1005 -1019.
- Older CE, Griffin MJ, Richardson BM, Waldbieser GC, Reifers JG, Goodman PM, Ware C, Gatlin D 3<sup>rd</sup>, Wise DJ, & Yamamoto FY (2024). Influence of probiotic and prebiotic supplementation on intestinal microbiota and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) following florfenicol administration. *J Fish Dis*, 47 (4): 3663–3672.
- Pirarat N, Ooi EL, Thompson KD, Nguyen HT, Maita M. & Katagiri T (2016). Examination of entry portal and pathogenesis of *Edwardsiella ictaluri* infection in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) *Aquaculture*, 464:279-285.
- Phạm Thị Kim Oanh, Trương Hoàng Minh (2011), Thực trạng nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage) có liên kết và không liên kết ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 20: 48-58.
- Tổng cục Thủy sản Việt Nam (2017) theo báo cáo Văn Thọ, Bến Tre: Diện tích nuôi cá tra theo quy trình sản xuất tốt chiếm 29%.
- Tổng cục Thủy sản Việt Nam (2018) theo báo cáo của Hương Trà. Vụ Nuôi trồng thủy sản tổng kết công tác năm 2017 và triển khai nhiệm vụ năm 2018.
- Tran NT, Pham MD & Hatai K (2013). Overview of the use of probiotics in aquaculture, *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 3: 89-97.
- Vazquez., JA, Gonzalez., MP and Murado., MA (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquac Res* 245(1-4): 149-161.

ASSESSING THE IMPACT OF A MIXTURE OF LACTIC ACID BACTERIA, SPECIFICALLY *Lactobacillus* spp., AS ANTAGONISTS AGAINST *Edwardsiella ictaluri* AND *Aeromonas hydrophila*, WHICH CAUSE DISEASES IN *Pangasianodon hypophthalmus* DURING THE FRY STAGE

Nguyen Thanh Luan\*, Pham Quynh Van, Pham Quynh Anh, Nguyen Tam Minh Hoa, Diep Ha Nhu Y

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

**SUMMARY**

The applications of probiotics are currently considering not only as safe, potential and sustainable methods for aquaculture but also improving and enhancing water environment quality. *Edwardsiella ictaluri* (EI) has been known as a bacteria causing white spots in kidney and liver organs of striped catfish and hemorrhagic disease caused by *Aeromonas hydrophila* (AH) in striped catfishes. These bacteria also had been experienced for *in vitro* experiments of competition by LAB bacteria such as *Lactobacillus acidophilus* (LAT) and *Lactobacillus plantarum* (BB2). This study investigated the concentration of biomass that could cause disease by *Edwardsiella ictaluri* (EI) and *Aeromonas hydrophila* (AH) respectively  $10^5$  CFU/mL. The concentration of *Lactobacillus* sp. biomass in *in vitro* competition for both bacteria is  $10^8$  CFU/mL. The ratio of 1:1 between LAT and BB2 has been chosen for bio-antimicrobiology *in vitro* and *in vivo* study that affect for both infectious bacteria and one-week premature striped catfish. Antimicrobial experiments has been shown there was no evidence of lactic acid as the main factor in affect antimicrobial ability of *Lactobacillus* specimen. Advanced research of bio-antimicrobial ingredients in bioproduct application could lead the better improvement for disease treatment in not only striped catfish but also high quality, safe and clean products in aquaculture.

*Keywords:* *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Lactobacillus* spp., probiotics, striped catfish.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0917577828; Email: luannt@huit.edu.vn



# NGHIÊN CỨU TẠO TINH BỘT KHÁNG TIÊU HÓA TỪ CHUỐI TIÊU HỒNG (*Musa paradisiaca* L.)

Mai Vũ Hoàng Giang, Trương Thị Chiên, Đào Ngọc Ánh,  
Đỗ Thị Kim Trang, Trần Bình Minh, Vũ Xuân Tạo

Trung tâm Sinh học thực nghiệm - Viện Ứng dụng công nghệ - Bộ Khoa học và Công nghệ

## TÓM TẮT

Chuối là cây ăn quả được trồng phổ biến tại Việt Nam. Quả chuối có lượng tinh bột cao, đặc biệt có chứa nhiều tinh bột kháng tiêu hóa tự nhiên. Hiện nay, nhu cầu sử dụng tinh bột kháng tiêu hóa ngày càng tăng do hiệu quả tích cực của nguồn tinh bột này với sức khỏe đã được chứng minh. Việc nghiên cứu tạo tinh bột kháng tiêu hóa từ chuối là rất cần thiết, góp phần nâng cao giá trị của quả chuối. Nghiên cứu này đã xác định được độ già thu hái phù hợp đối với chuối tiêu hồng để tạo tinh bột kháng là 90 ngày từ khi nở hoa, chất xúc tác phù hợp cho quá trình biến tính tạo tinh bột kháng là acid citric và nhiệt độ sấy phù hợp là 70°C. Hàm lượng tinh bột kháng thu được sau quá trình biến tính là 56,4% cao hơn 38,5% so với lượng tinh bột kháng có trong tinh bột chuối trước biến tính (40,7%). Hơn nữa, nguyên liệu tinh bột chuối giàu tinh bột kháng thu được trong nghiên cứu này có chất lượng ổn định trong 6 tháng bảo quản ở 20°C. Đây là nguồn nguyên liệu tinh bột kháng tiềm năng cho phát triển các sản phẩm ăn kiêng.

*Từ khóa:* Biến tính, chuối tiêu hồng, tinh bột, tinh bột kháng.

## MỞ ĐẦU

Theo FAO, chuối là loại trái cây được sản xuất lớn thứ hai, sau cam quýt, chiếm khoảng 16% tổng số trái cây được sản xuất trên thế giới. Ấn Độ là nước sản xuất chuối lớn nhất, đóng góp tới 27% sản lượng chuối của thế giới (FAO, 2009). Những quốc gia xuất khẩu chuối hàng đầu thế giới phải kể đến Ecuador, Colombia, Philippines và Costa Rica. Chuối là thực phẩm rất giàu hợp chất phenolic và flavanoid, có đặc tính chống oxy hóa. Chuối xanh giàu carbohydrate với hàm lượng lên đến 60-80%, bao gồm cellulose, hemicelluloses, lignin, tinh bột, chất xơ và tinh bột kháng (resistant starch, RS). Chuối xanh chứa hàm lượng tinh bột cao, tinh bột này bị biến đổi dần thành đường trong quá trình chín và được xem là nguồn nguyên liệu giàu tinh bột kháng. Hiện nay, ngành sản xuất tinh bột từ chuối xanh được quan tâm do nguồn tinh bột này có giá trị dinh dưỡng với hàm lượng tinh bột kháng, chất xơ và các hợp chất có hoạt tính sinh học như acid phenolic cao (Zhang *et al.*, 2005).

Tinh bột kháng là một loại tinh bột không bị tiêu hóa khi đi qua ruột non. Tinh bột kháng không bị thủy phân thành D-glucose trong ruột non trong vòng 120 phút sau khi ăn nhưng bị lên men ở ruột kết. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng tinh bột kháng là phân tử mạch thẳng chứa  $\alpha$ -1,4-D-glucan được chuyển hóa từ phần amylose bị thoái hóa và có trọng lượng phân tử tương đối thấp ( $1,2 \times 10^5$  Da). Hiện nay, tinh bột kháng được phân thành 5 nhóm gồm RS1, RS2, RS3, RS4, và RS5 (Sajilata *et al.*, 2006; Gutierrez & Tovar, 2021) Nhóm RS1: Tinh bột thuộc nhóm này được tổng hợp ở trong nội nhũ của các loại hạt ngũ cốc và được bao quanh bởi gốc protein và thành tế bào. Những cấu trúc vật lý này hạn chế khả năng tiêu hóa của tinh bột RS1. Nhóm RS2: Tinh bột nhóm này có cấu trúc tinh thể loại B hay C là những loại tinh bột có tính kháng cao với sự thủy phân của enzyme. Tuy nhiên, sau quá trình chế biến, phần lớn tinh bột nhóm này bị hồ hóa không còn tinh thể loại B và C trở nên dễ tiêu hoá. Nhóm RS3: Nhóm tinh bột kháng được tạo thành do hiện tượng thoái hóa của tinh bột khi tinh bột được nấu chín và làm nguội. RS3 được đánh giá là rất bền với nhiệt độ và các tác nhân xử lý khác. Nhóm RS4: Là nhóm tinh bột kháng thu được từ quá trình biến đổi hóa học. Loại tinh bột kháng này rất đa dạng về cấu trúc và không có trong tự nhiên. Tinh bột RS4 là nhóm tinh bột biến tính hóa học bao gồm những loại được este hóa để làm giảm tính tiêu hóa của tinh bột. Dạng polysaccharide hòa tan là maltodextrin kháng cũng được gọi là tinh bột kháng. Nhóm RS5: Khi tinh bột tương tác với chất béo thì amylose và amylopectin hình thành nên những tổ hợp xoắn đơn với axit béo, đây là tinh bột RS5. Trong số các dạng tinh bột kháng, nhóm RS3 được xem là quan trọng bởi nhóm tinh bột này có tính bền nhiệt và đang được ứng dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm. Tinh bột kháng RS3 không có sẵn trong tự nhiên, chỉ thu được sau quá trình chế biến (Haramlampu, 2000). Việc tiêu thụ tinh bột kháng tiêu hóa có tác động tích cực đến sức khỏe ruột, cân bằng đường huyết, chuyển hóa lipid và trọng lượng cơ thể. Về mặt vật lý, tinh bột kháng tiêu hóa có tính chất tương đương với tinh bột, do đó đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến thực phẩm. Trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu làm giảm sự thủy phân tinh bột thành glucose nhờ các chất có nhóm carboxyl -C=O. Nhóm hydroxyl -OH của phân tử tinh bột sẽ liên kết với các phân tử có nhóm carboxyl -C=O như acid citric, acid tạo thành chức ester làm biến đổi tinh bột để thủy phân thành tinh bột thủy phân chậm hoặc tinh bột kháng (Reddy *et al.*, 2010; Dupuis *et al.*, 2014).

Với tiềm năng ứng dụng của tinh bột kháng, việc nghiên cứu các công nghệ chuyển hóa nhằm tăng hàm lượng tinh bột kháng trong nguyên liệu thực phẩm là vấn đề cần thiết và có ý nghĩa khoa học. Một số công nghệ đã được áp dụng trong việc chuyển hóa làm tăng hàm lượng tinh bột kháng ở tinh bột hạt mít sử dụng phương pháp nhiệt ẩm (Hồ Thị Hào *et al.*, 2024). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp biến tính tinh bột bằng acid và nhiệt độ để nâng cao hàm lượng tinh bột kháng trong tinh bột chuối tiêu hồng. Tinh bột chuối tiêu hồng giàu tinh bột kháng là nguồn nguyên liệu chất lượng cao cho phát triển các sản phẩm ăn kiêng.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chuối tiêu hồng được thu tại huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên. Chuối thí nghiệm là những quả chuối xanh có độ tuổi từ 80-100 ngày tuổi tính từ ngày trổ hoa. Tất cả các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này đều được mua từ hãng Sigma-Aldrich, Merck và Biobasic. Các hóa chất được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### Phương pháp

#### Phương pháp xác định hàm lượng tinh bột

Quy trình xác định hàm lượng tinh bột được thực hiện theo TCVN 12382:2018. Mẫu thử (1 g) được cho vào bình định mức 100 mL và bổ sung 70 mL nước ấm. Sau khi hòa tan mẫu thử, dung dịch được bổ sung 50  $\mu$ L alpha-amylase chịu nhiệt và đun nóng 30 phút ở 90°C trong nồi cách thủy. Mẫu thử được làm nguội nhanh về 60°C trong nồi cách thủy và bổ sung 5 mL dung dịch amyloglucosidase. Mẫu thử sau đó được làm nguội đến nhiệt độ phòng và định mức dung dịch trong bình định mức 100mL, đồng hóa và lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m, thu dịch chiết để tiến hành phân tích trên hệ thống HPLC. Quá trình phân tích HPLC được thực hiện trên hệ thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản) gồm bơm LC 20AD, detector SPD 20Aooj tiêm mẫu tự động SIL-20A HT. Hệ thống sử dụng cột C18 của hãng Agilent, kích thước cột là 250 x 4,6 mm, kích thước hạt 5  $\mu$ m. Pha động gồm hai dung môi là nước và axetonitril. Detector UV được xác định tại bước sóng 200 nm. Thể tích tiêm mẫu vào cột là 10  $\mu$ L.

#### Quy trình biến tính tinh bột chuối

Quá trình biến tính tinh bột chuối được thực hiện theo Waliszewski (2003) có cải tiến cho phù hợp điều kiện phòng thí nghiệm. Chuối xanh được rửa sạch, để ráo, tách bỏ vỏ chuối. Phần thịt quả được cắt thành từng lát mỏng, rửa, ngâm trong dung dịch NaHSO<sub>3</sub> 0,5% với tỷ lệ 1:2 (w/v) ở 40°C trong vòng 30 phút. Sau đó, hỗn hợp được xay nhuyễn bằng máy xay chuyên dụng với tốc độ 10.000 vòng/phút, lọc rửa bã ba lần với chất xúc tác acid với tỷ lệ 1:2 (w/v). Dịch lọc được làm lạnh ở nhiệt độ 8°C trong 24 giờ, sau đó tinh bột được thu bằng phương pháp gạn. Tinh bột được sấy ở nhiệt độ thích hợp trong vòng 6 giờ, sau đó nghiền mịn và lọc qua rây 200 mesh (Waliszewski *et al.*, 2003).

#### Phương pháp xác định một số điều kiện thích hợp trong quá trình biến tính tinh bột chuối tạo tinh bột kháng

Để xác định một số điều kiện thích hợp trong quá trình biến tính tinh bột chuối tạo tinh bột kháng, nghiên cứu tiến hành đánh giá ảnh hưởng của yếu tố chất xúc tác và nhiệt độ biến tính tới hàm lượng tinh bột kháng. Các yếu tố được khảo sát cụ thể bao gồm: chất xúc tác (acid citric, acid lactic, acid acetic) nồng độ 2,5% và nhiệt độ của quá trình biến tính (60, 70 và 80°C).

#### Phương pháp xác định hàm lượng tinh bột kháng

Quy trình xác định hàm lượng tinh bột kháng được thực hiện theo Hung và đồng tác giả (2013): 1 g tinh bột chuối được hòa với 25 mL đệm acetate (pH 6,0), đun sôi cách thủy 30 phút. Dịch huyền phù được xử lý với enzyme amylase (7000 U/g tinh bột) ở 37°C trong 2 giờ; sau đó xử lý bằng enzyme amyloglucosidase (50 U/g tinh bột) ở 60°C trong 30 phút. Hỗn hợp được ly tâm 1500 vòng/phút trong 15 phút. Phần cặn được rửa 3 lần với nước cất và sấy khô ở 50°C trong 48 giờ. Hàm lượng tinh bột kháng (%) được tính bằng khối lượng cặn thu được (tính theo trọng lượng khô) so với mẫu ban đầu (Hung *et al.*, 2013).

#### Phương pháp xử lý số liệu

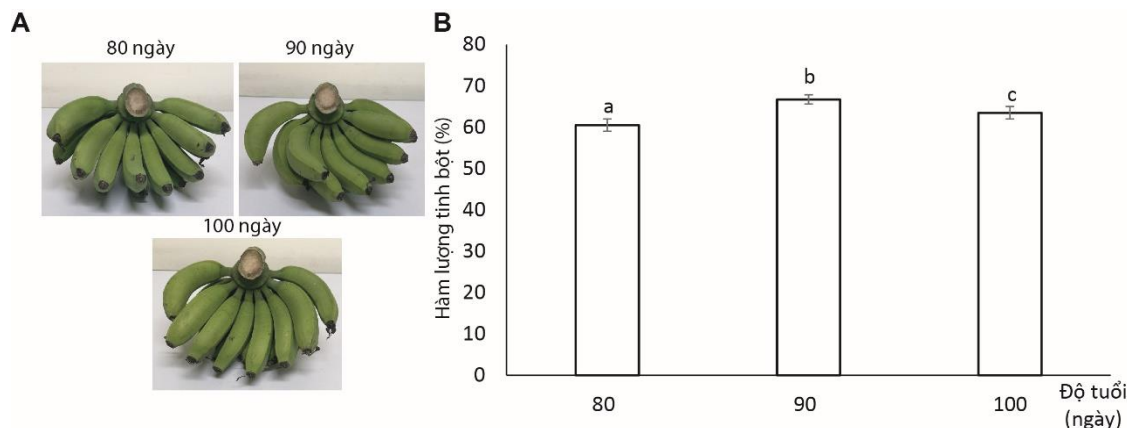
Kết quả nghiên cứu được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Excel 2016.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Đánh giá hàm lượng tinh bột trong chuối tiêu hồng ở các độ tuổi khác nhau

Độ tuổi (độ già thu hái) là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới hàm lượng tinh bột trong chuối. Theo nghiên cứu của Lê Văn Trọng và Nguyễn Như Khanh (2021), hàm lượng tinh bột trong quả chuối tây đạt giá trị cao nhất tại 14 tuần tuổi. Ở giai đoạn sau đó, sự trao đổi chất trong quả diễn ra mạnh mẽ, đặc biệt là quá trình hô hấp, do vậy tinh bột trong quả được sử dụng nhiều hơn dẫn tới hàm lượng của chúng giảm dần theo sự chín của quả. Sự biến đổi hàm lượng tinh bột trong quả phù hợp với sự biến động về hoạt tính của  $\alpha$ -amylase xúc tác phản ứng chuyển hóa tinh bột thành đường (Lê Văn Trọng và Nguyễn Như Khanh, 2021). Chính vì vậy, để lựa chọn được

mẫu chuối có hàm lượng tinh bột cao nhất, nghiên cứu này đã tiến hành đánh giá hàm lượng tinh bột có trong chuối tiêu hồng ở các thời điểm thu hái khác nhau (80, 90, và 100 ngày). Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng tinh bột trong chuối tăng từ 60,5% (80 ngày) đến 66,7% (90 ngày) nhưng lại giảm xuống 63,4% (100 ngày) (Hình 1). Như vậy, cho thấy chuối tiêu hồng có độ tuổi thu hái là 90 ngày cho hàm lượng tinh bột cao nhất. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thị Quỳnh Mai và đồng tác giả (2020) khi nghiên cứu về độ già thu hái của chuối Loba (3 tháng tuổi) (Nguyễn Thị Quỳnh Mai *et al.*, 2020). Vì vậy, nghiên cứu lựa chọn chuối tiêu hồng xanh 90 ngày để tiếp tục các thí nghiệm tiếp theo.

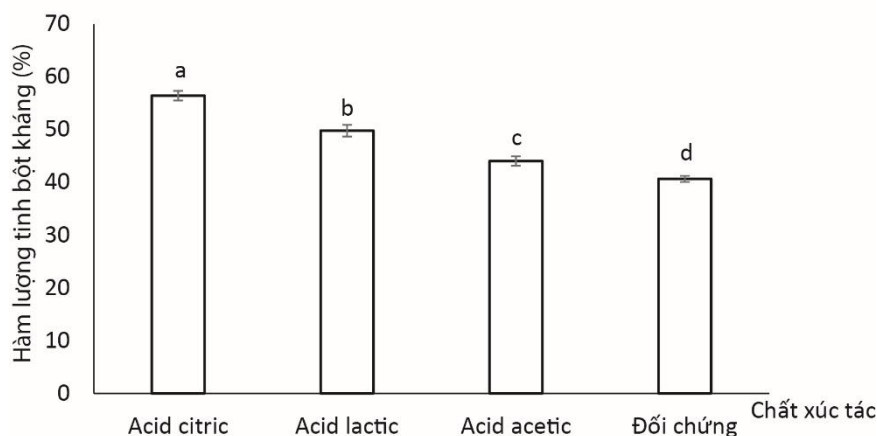


**Hình 1. Hàm lượng tinh bột trong chuối tiêu hồng ở các độ tuổi khác nhau**

(A) Mẫu chuối tiêu hồng ở các độ tuổi khác nhau, (B) Hàm lượng tinh bột trong các mẫu chuối tiêu hồng. Các chữ cái khác nhau trên các cột biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

### Xác định một số điều kiện thích hợp cho quá trình biến tính tinh bột chuối tạo tinh bột kháng

Để thu được tinh bột chuối có hàm lượng tinh bột kháng cao, nghiên cứu đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của chất xúc tác và nhiệt độ sấy tới hàm lượng tinh bột kháng. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất xúc tác (acid citric, acid lactic, và acid acetic) cho thấy, chất xúc tác là một yếu tố có ảnh hưởng quan trọng đến hàm lượng tinh bột kháng thu được. Hàm lượng tinh bột kháng khi sử dụng xúc tác acid citric, acid lactic, và acid acetic lần lượt là 56,4; 49,7; 44,1% và cao hơn mẫu đối chứng (40,7%) (Hình 2). Các nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh, acid citric là chất xúc tác tối ưu trong quá trình biến tính tinh bột chuối tạo tinh bột kháng (Olvera-Hernández *et al.*, 2017). Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn chất xúc tác là acid citric cho các thí nghiệm tiếp theo.

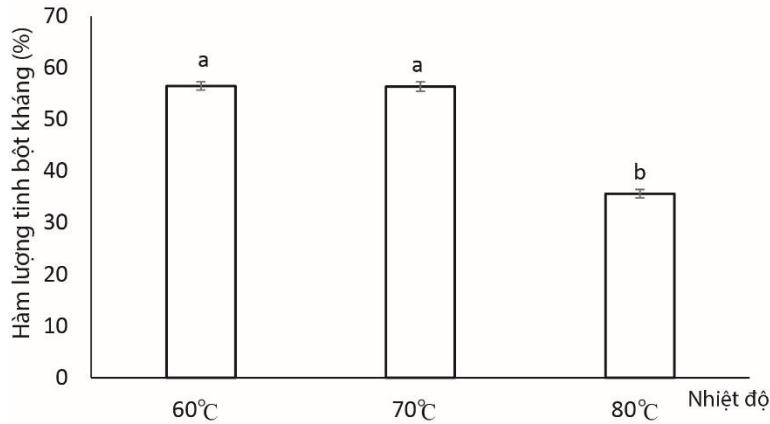


**Hình 2. Ảnh hưởng của chất xúc tác biến tính tinh bột chuối tới hàm lượng tinh bột kháng**

Các chữ cái khác nhau trên các cột biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Đồng thời, nghiên cứu đã tiến hành xác định ảnh hưởng của nhiệt độ sấy (60, 70 và 80°C) tới hàm lượng tinh bột kháng thu được. Kết quả thu được cho thấy, nhiệt độ của quá trình sấy là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hàm lượng tinh bột kháng. Khi sấy ở nhiệt độ 80°C, hàm lượng tinh bột kháng thấp hơn so với khi sấy ở nhiệt độ 60 và 70°C. Trong chuối xanh rất giàu carbohydrate, tinh bột và tinh bột kháng (RS2), khi gia nhiệt trong điều kiện độ ẩm và nhiệt độ cao, hơi nước đã xâm nhập và làm ảnh hưởng tới cấu trúc của RS2, dẫn đến cấu trúc này bị phá vỡ một phần, từ đó làm giảm hàm lượng tinh bột kháng (Zhang *et al.*, 2005; Bavaneethan, 2015). Ở nhiệt độ sấy 60, 70°C, hàm lượng tinh bột kháng không có sự khác biệt (Hình 3) ( $p > 0,05$ ). Đây cũng là khoảng nhiệt độ

thích hợp trong quá trình sấy tinh bột kháng từ gạo (Nguyễn Thị Quỳnh *et al.*, 2020). Tuy nhiên, thời gian để nguyên liệu đạt độ ẩm 7-8% khi sấy ở 60°C là 12 giờ, trong khi sấy ở 70°C là 6 giờ. Việc rút ngắn thời gian sấy mà vẫn đảm bảo hàm lượng tinh bột kháng của sản phẩm là điều kiện quan trọng trong sản xuất thực tế. Vì vậy,, nghiên cứu này lựa chọn nhiệt độ sấy là 70°C.

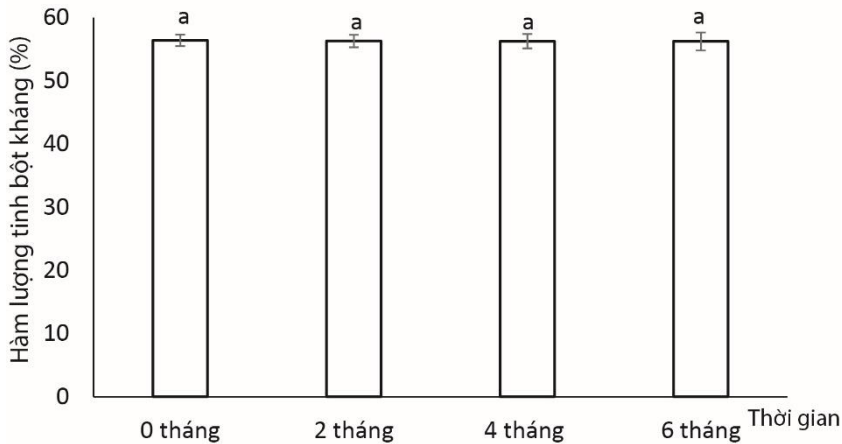


**Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy tới hàm lượng tinh bột kháng**

Các chữ cái khác nhau trên các cột biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

**Đánh giá hàm lượng của tinh bột kháng trong thời gian bảo quản**

Việc đảm bảo chất lượng trong thời gian lưu trữ nguyên liệu là quan trọng trong quá trình sản xuất. Thực tế trong quá trình sản xuất, các nguyên liệu khô thường được bảo quản trong các kho lạnh với nhiệt độ 15-20°C. Nghiên cứu này bước đầu đánh giá hàm lượng tinh bột kháng trong mẫu tinh bột thu được lưu giữ sau các khoảng thời gian khác nhau ở 20°C. Mẫu tinh bột sau khi thu nhận được đóng gói trong túi PE kín, lấy mẫu để phân tích hàm lượng tinh bột kháng sau 2, 4, 6 tháng bảo quản. Kết quả thu được cho thấy, hàm lượng tinh bột kháng không có sự thay đổi đáng kể sau 6 tháng bảo quản ở 20°C (Hình 4) ( $p > 0,05$ ). Như vậy, nguyên liệu tinh bột chuối giàu tinh bột kháng thu được trong nghiên cứu này có chất lượng ổn định trong 6 tháng bảo quản ở 20°C. Tuy nhiên, mẫu tinh bột chuối cần tiếp tục được đánh sự ổn định hàm lượng tinh bột kháng giá ở các khoảng nhiệt độ lưu giữ khác để lựa chọn được nhiệt độ lưu giữ phù hợp nhất.



**Hình 4. Đánh giá chất lượng của tinh bột kháng trong thời gian bảo quản**

Các chữ cái giống nhau trên các cột biểu đồ thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**KẾT LUẬN**

Nghiên cứu này đã lựa chọn được chuối tiêu hồng ở độ già thu hái là 90 ngày cho hàm lượng tinh bột cao nhất 66,7%, chất xúc tác và nhiệt độ sấy thích hợp cho quá trình biến tính tinh bột chuối tạo tinh bột kháng là acid citric (nồng độ 2,5%) và 70°C. Ở điều kiện này, hàm lượng tinh bột kháng thu được sau quá trình biến tính là 56,4% cao hơn 38,5% so với lượng tinh bột kháng có trong tinh bột chuối trước biến tính. Hơn nữa, nguyên liệu tinh bột chuối giàu tinh bột kháng thu được trong nghiên cứu này có chất lượng ổn định trong 6 tháng bảo quản ở 20°C.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí từ đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở của Viện Ứng dụng công nghệ: Nghiên cứu biến tính tinh bột chuối xanh tạo tinh bột kháng định hướng ứng dụng trong thực phẩm. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bavaneethan Y, Vasantharuba S, Balakumar S, Thayananthan K (2015). Effect of different processing time on resistant starch content of selected tubers. *World Journal of Agricultural Sciences*, 11(4): 244-246.
- Dupuis JH, Liu Q, Yada RY (2014). Methodologies for Increasing the Resistant Starch Content of Food Starches: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13:1219-1245.
- FAO (Food and Agricultural Organization, Geneva) 2009.
- Gutiérrez TJ and Tovar J (2021). Update of the concept of type 5 resistant starch (RS5): Self-assembled starch V-type complexes. *Trends in Food Science & Technology*, 109: 711-724.
- Haralampu SG (2000). Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydr Polym*, 41(3): 285–292.
- Hồ Thị Hào, Đặng Minh Nhật, Mạc Thị Hà Thanh (2024). Tối ưu hóa các điều kiện xử lý nhiệt-ẩm để thu nhận hàm lượng tinh bột kháng tiêu hóa cao nhất từ tinh bột hạt mít bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, 22(5A):75-80.
- Hung PV, Cham NTM, Truc PTT (2013). Characterization of Vietnamese banana starch and its resistant starch improvement. *Int Food Res J*, 20(1): 205-211.
- Lê Văn Trọng và Nguyễn Như Khanh (2021). Nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh lí, sinh hóa theo tuổi phát triển của quả chuối tây (*Musa paradisiaca* L.) trồng tại Thanh Trì, Hà Nội. *Tạp chí Khoa học -Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*, 66(1):87-95.
- Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Đào Thị Mỹ Linh, Kiều Yến Vy, Sơn Thiên Nga, Nguyễn Đăng Khoa (2021). Nghiên cứu tạo sản phẩm chức năng từ tinh bột chuối và bột vi gói probiotic. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 21(2):162-173.
- Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Đoàn Thanh Hiếu, Phạm Thị Duyên, Nông Phúc Thắng (2020). Chế biến gạo-citric từ gạo trắng và citric. *TNU Journal of Science and Technology* 225(1): 227-232.
- Olvera-Hernández V, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero LA, Ble-Castillo JL, Castellanos-Ruelas A. F. (2018). Morphological and Physicochemical Changes in Great Dwarf Banana (*Musa cavendish* AAA) Starch Modified by Pyrodextrinization and Enzymatic Hydrolysis. *Starch-Stärke*, 70(3-4), 1700122.
- Reddy N and Yang Y (2010). Citric acid crosslinking of starch films, *Food Chemistry*, 118(3): 702-711.
- Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR (2006). Resistant starch-A review. *Compr Rev Food Sci F*, 5(1): 1–17.
- Waliszewski KN, Aparicio MA, Bello LA, Monroy JA (2003). Changes of banana starch by chemical and physical modification. *Carbohydr Polym*, 52(3): 237-242.
- Zhang P, Whistler RL, BeMiller JN, Hamaker BR (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility - A review, *Carbohydr Polym* 59(4): 443-458.

## A STUDY ON OBTAINING RESISTANT STARCH FROM *Musa paradisiaca* L.

**Mai Vu Hoang Giang, Truong Thi Chien, Dao Ngoc Anh,  
Do Thi Kim Trang, Tran Binh Minh, Vu Xuan Tao\***

*Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology*

### SUMMARY

Banana is commonly grown in Vietnam for its nutritious fruit. Bananas have a high starch content, especially containing a lot of naturally resistant starch. Currently, the demand for resistant starch is increasing and the positive effects of this flour source on health have been proven. Research on creating resistant starch from bananas is very necessary, contributing to improving the value of bananas. This study has determined that the appropriate harvesting age for bananas to create resistant starch is 90 days from flowering. The appropriate catalyst for the denaturation process to create resistant starch is citric acid and the appropriate temperature is 70°C. The resistant starch content obtained after the modification process is 56.4%, 38.5% higher than the amount of resistant starch in banana starch before modification (40.7%). Furthermore, the banana resistant starch material obtained in this study had stable quality during 6 months of storage at 20°C. This is a potential source of resistant starch raw materials for the development of dietary products.

**Keyword:** Denaturaion, *Musa paradisiaca* L., starch, resistant starch.

\* Author for correspondence: Tel: 0914787419; Email: taovx.tsa@gmail.com

# NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN ĐIỀU KIỆN NUÔI TRỒNG THÍCH HỢP ĐỂ NÂNG CAO HÀM LƯỢNG LIPIT CỦA VI TẢO LỤC *Chlorella sorokiniana* CHO ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG SẢN XUẤT NHIÊN LIỆU SINH HỌC

Nguyễn Minh Châu<sup>3</sup>, Lê Thị Thơm<sup>1</sup>, Nguyễn Cẩm Hà<sup>1</sup>, Lê Anh Huy<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Đạt<sup>1</sup>, Ngô Thị Hoài Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Trang<sup>3</sup>, Trần Thị Liên<sup>3</sup>, Vũ Thị Thu Hà<sup>3</sup>, Đặng Diễm Hồng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST

<sup>3</sup>Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ lọc, hóa dầu, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

## TÓM TẮT

*Chlorella* là chi vi tảo lục có tốc độ sinh trưởng nhanh và có khả năng tích lũy lipit trong tế bào cao, được xem như là phản ứng tự vệ của cơ thể tảo với điều kiện môi trường sống bất lợi. Nuôi trồng chi vi tảo này theo công nghệ nuôi cấy 2 giai đoạn đang được tập trung nghiên cứu trên thế giới để thu được sinh khối tảo có hàm lượng lipit cao nhằm cung cấp nguồn sinh khối cho sản xuất nhiên liệu sinh học. Nghiên cứu này trình bày kết quả về ảnh hưởng của điều kiện môi trường lên sinh trưởng và tích lũy lipit của loài *Chlorella sorokiniana* ở giai đoạn 2. Sau 4 ngày nuôi cấy ở giai đoạn 1 trong môi trường BG-11 có NaNO<sub>3</sub> 3 g/L, glucose 10 g/L, nhiệt độ 28-30°C, cường độ chiếu sáng 40-100 μmol/m<sup>2</sup>s, pH 7, *C. sorokiniana* đạt sinh trưởng tốt nhất và chuyển sang giai đoạn 2. Kết quả thu được ở giai đoạn 2 cho thấy khi bổ sung NaCl 30 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 6 g/L vào môi trường nuôi, chiếu cường độ ánh sáng 150 μmol/m<sup>2</sup>s, *C. sorokiniana* có sinh khối khô (SKK) và hàm lượng lipit đạt cao nhất là 2,12 ± 0,06 g/L và 35,8% SKK, tương ứng. Axit béo C18:2 (chiếm 28,25% axit béo tổng số - total fatty acid/TFA), C18:3 (26,41% TFA), C16:0 (19,20% TFA) và C16:1 (17,25% TFA) là thành phần axit béo chính trong sinh khối tảo này nuôi trồng được. Kết quả thu được cho thấy sinh khối *C. sorokiniana* là nguyên liệu tiềm năng để sản xuất nhiên liệu sinh học chất lượng cao. Dựa trên độ không bão hòa của axit béo, tính toán chất lượng của biodiesel sản xuất từ thành phần axit béo trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn đạt 4 trên 5 tiêu chuẩn của Hoa Kỳ và Châu Âu đối với dầu diesel sinh học (B100), có tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn sản xuất.

**Từ khóa:** *Chlorella sorokiniana*, BG-11, điều kiện môi trường, nhiên liệu sinh học, nuôi cấy hai giai đoạn, vi tảo lục.

## MỞ ĐẦU

*Chlorella* là một trong những chi vi tảo lục được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất thực phẩm, dược phẩm, xử lý môi trường và sản xuất nhiên liệu sinh học do sinh khối của chi này có chứa hàm lượng lớn lipit, protein, cacbohydrat, sắc tố, khoáng đa và vi lượng và vitamin (Ibrahim *et al.*, 2020). Trong đó, *Chlorella sorokiniana* là một loài tiềm năng của chi *Chlorella* có năng suất sinh khối lớn, có khả năng tích lũy lipit cao dưới điều kiện môi trường nuôi thiếu dinh dưỡng, có tính chống chịu cao với nhiệt độ lên đến 42°C nên nó đã trở thành nguồn nguyên liệu có giá trị để sản xuất nhiên liệu sinh học, cung cấp một giải pháp tiềm năng cho giảm bớt tình trạng cạn kiệt nhiên liệu hóa thạch (Menegazzo *et al.*, 2022). Có 3 phương thức nuôi trồng chính (quang tự dưỡng, dị dưỡng và tạp dưỡng) có thể áp dụng cho nuôi trồng vi tảo tùy thuộc vào nguồn cacbon (vô cơ hay hữu cơ) và có hay không có chiếu sáng. Ở phương thức nuôi trồng quang tự dưỡng, sử dụng các hệ thống bể hở và bể phản ứng quang sinh kín (closed photobioreactors - PBRs), tảo sử dụng ánh sáng mặt trời và CO<sub>2</sub> trong khí quyển để sinh trưởng và phát triển là nguồn nguyên liệu thô tái tạo cho ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học (Sajjadi *et al.*, 2018). Ngoài ra, một số loài vi tảo sẽ có hàm lượng lipit cao khi sống theo phương thức dị dưỡng (sử dụng nguồn cacbon hữu cơ và không cần ánh sáng) kết hợp điều kiện môi trường nuôi bất lợi như thiếu chất dinh dưỡng (nitơ, photpho) (Srinuanpan *et al.*, 2018) hay khi có mặt các ion kim loại (đồng, kẽm) (Tan *et al.*, 2024), có sự thay đổi về nồng độ muối (cao và thấp) cũng như có chiếu cường độ ánh sáng cao (Ali *et al.*, 2021). Tuy nhiên, ở điều kiện môi trường nuôi bất lợi sẽ làm giảm sinh trưởng của tảo. Dựa trên cơ sở nêu trên, việc nuôi cấy vi tảo theo 2 giai đoạn đã được nghiên cứu. Ở giai đoạn 1, vi tảo được nuôi trong môi trường thích hợp để tảo có sinh trưởng đạt cao nhất. Sau đó, tảo được chuyển sang giai đoạn 2 có sự bất lợi về điều kiện môi trường nuôi. Trong điều kiện bất lợi, tảo bị giảm sinh khối nhưng sinh khối lại có hàm lượng lipit rất cao được xem là một giải pháp đầy hứa hẹn để nâng cao tích lũy lipit trong sinh khối tảo. Theo nghiên cứu của Kakarla và đồng tác giả (2018), *C. sorokiniana* được nuôi cấy 2 giai đoạn trong môi trường BG-11 có bổ sung NaCl 60 g/L và NaHCO<sub>3</sub> 1g/L đã cho sinh khối có hàm lượng lipit đạt cao nhất là 38%SKK. Tiếp theo các kết quả nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023) đã công bố về lựa chọn được điều kiện nuôi thích hợp *C. sorokiniana* ở giai

đoạn 1, trong nghiên cứu này, điều kiện nuôi trồng bất lợi về dinh dưỡng khác nhau cho loài vi tảo này ở giai đoạn 2 để có được sinh khối tảo có hàm lượng lipid cao làm nguyên liệu cho định hướng sản xuất nhiên liệu sinh học sẽ được trình bày.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Vật liệu:** Tảo giống *C. sorokiniana* thuộc bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được lưu giữ ở 28°C, chiếu ánh sáng có cường độ 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , quang chu kỳ sáng: tối là 12:12 giờ. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu là thông dụng và đảm bảo độ tinh khiết cho thí nghiệm.

### Phương pháp

#### Xác định sinh trưởng của tảo

Sinh trưởng của *C. sorokiniana* được đánh giá thông qua mật độ tế bào (MĐTB), SKK được xác định theo mô tả của Đặng Diễm Hồng (2019).

#### Phân tích hàm lượng lipid, protein, cacbohydrat, carotenoid và thành phần axit béo

Hàm lượng lipid tổng số được xác định theo phương pháp Bligh và Dyer (1959), có cải tiến phù hợp với điều kiện của Việt Nam (Đặng Diễm Hồng, 2019). Hàm lượng protein xác định theo phương pháp Bradford (1976), cacbohydrat xác định theo mô tả của Sun và đồng tác giả (2014). Thành phần và hàm lượng các axit béo của *C. sorokiniana* được xác định bằng GC/MS được tiến hành tại Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội theo mô tả của Đặng Diễm Hồng (2019).

#### Phân tích chất lượng biodiesel sản xuất từ sinh khối *C. sorokiniana*

Mức độ không bão hòa của thành phần axit béo và 5 chỉ số cơ bản của biodiesel: trọng lượng riêng, điểm chớp cháy, độ nhớt động học, chỉ số cetane và chỉ số iodine xác định theo công thức của Hoekman và đồng tác giả (2012).

#### Môi trường nuôi cấy *C. sorokiniana*

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường BG-11. Thành phần môi trường BG-11 gồm (g/L):  $\text{NaNO}_3$  - 3,0;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 0,02;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,036; Citric acid - 0,006;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,075;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 0,04;  $\text{EDTANa}_2$  - 0,001;  $(\text{NH}_4)[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2)_2]$  - 0,006; glucose - 10 và dung dịch  $\text{A}_5$  - 1 mL. Trong đó, dung dịch  $\text{A}_5$  (g/L):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 2,850,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 1,810,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,220,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,080,  $\text{MoO}_3$  - 0,015,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,044). Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 1.000 mL có chứa 450 mL môi trường, 28°C, chiếu sáng có cường độ 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , quang chu kỳ sáng: tối là 24:0 giờ, pH 7,4; tốc độ lắc 200 vòng/phút, MĐTB gieo ban đầu là  $10 \times 10^6$  TB/mL. Giống cấp 1: được nuôi ở môi trường BG-11 sau 6 ngày nuôi cấy (với giống gốc được nuôi giữ trên môi trường thạch).

#### Thí nghiệm lựa chọn điều kiện môi trường nuôi cấy thích hợp ở giai đoạn 2

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ  $\text{NaCl}$  (0; 20; 30; 40; 60 và 90 g/L), nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  (0; 1; 2; 4; 6; 8 và 10 g/L), nồng độ  $\text{NaNO}_3$  (0; 0,02228; 1 và 2 g/L), nồng độ photpho dưới dạng  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0; 45; 90 và 150 mg/L), nồng độ  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0; 15,7; 31,4; 47,1 và 68,2 mg/L), cường độ ánh sáng (0, 80, 150, 250 và 340  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) với quang chu kỳ sáng: tối là 24:0 giờ lên sinh trưởng và tích lũy lipid ở vi tảo *C. sorokiniana* đã được tiến hành nghiên cứu. Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 1.000 mL có chứa 450 mL môi trường, nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/ phút. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 2 lần. Hàng ngày lấy mẫu để xác định sinh trưởng bằng cách xác định SKK. Thí nghiệm sau kế thừa kết quả thông số tối ưu được lựa chọn của thí nghiệm trước. Loài *C. sorokiniana* được nuôi trong điều kiện tối ưu 4 ngày (ở giai đoạn 1). Sau đó, bổ sung điều kiện môi trường khác nhau cho từng thí nghiệm (ở giai đoạn 2) và thu sinh khối để phân tích thành phần dinh dưỡng, hàm lượng lipid và axit béo sau 2 ngày nuôi cấy.

#### Xử lý số liệu

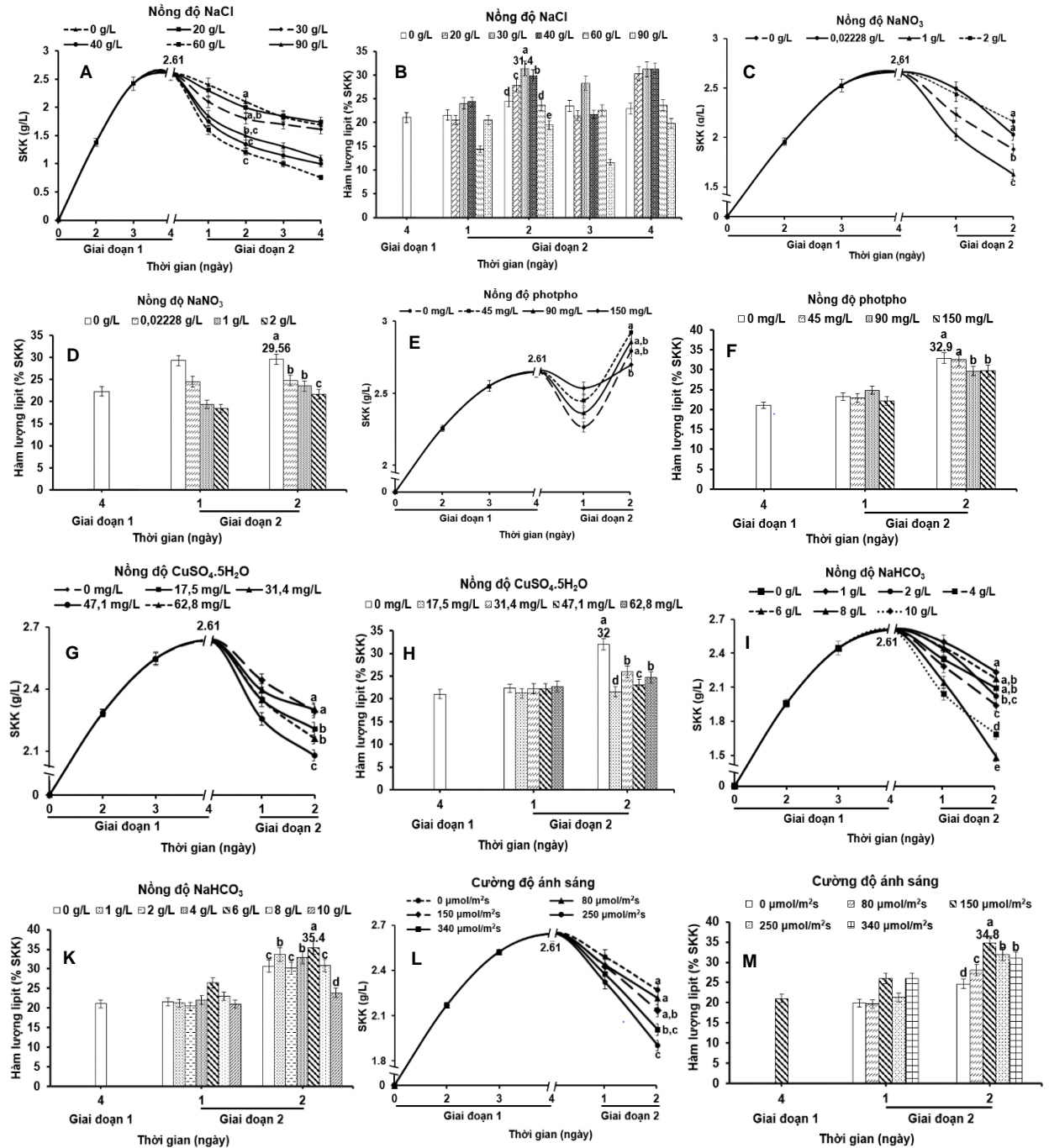
Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA một thành phần ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$  bằng phần mềm SPSS 16.0.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho tích lũy lipid của *C. sorokiniana* ở giai đoạn 2

Kế thừa các kết quả nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023) đã lựa chọn được các điều kiện nuôi thích hợp cho giai 1 bao gồm môi trường BG-11 có nguồn nitơ là  $\text{NaNO}_3$  3g/L, nguồn carbon là glucose 10 g/L, nuôi lắc 200 vòng/phút ở cường độ ánh sáng 40 -100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , nhiệt độ 30°C, pH 7, chủng *C. sorokiniana* có khả năng sinh trưởng tốt nhất với SKK cao nhất đạt  $2,84 \pm 0,06$  g/L và hàm lượng lipid cao nhất đạt  $21,06 \pm 0,10$  sau 4 ngày nuôi cấy ở giai đoạn này.

**Ảnh hưởng của nồng độ NaCl:** Ảnh hưởng của nồng độ NaCl (0; 20; 30; 40; 60 và 90 g/L) lên sinh trưởng và tích lũy lipid của *C. sorokiniana* (Hình 1A, 1B) cho thấy tảo tích lũy lipid tốt nhất trong môi trường có bổ sung 30 g/L NaCl với hàm lượng lipid đạt cao nhất là  $31,40 \pm 0,84\%$  SKK và SKK đạt  $1,8 \pm 0,31$  g/L sau 2 ngày bổ sung muối. Sinh trưởng của *C. sorokiniana* giảm dần trong các ngày nuôi khi tăng nồng độ muối. Kết quả này tương đối phù hợp với công bố của Yun và đồng tác giả (2019) khi nuôi chủng *Chlorella vulgaris* YH703 trong môi trường BG-11 có bổ sung 29,25 g/L NaCl, hàm lượng lipid đạt 24,7% SKK (so với đối chứng đạt 12,5% SKK) sau 2 ngày nuôi cấy ở giai đoạn 2. Do đó, nồng độ NaCl 30g/L được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Sinh trưởng và hàm lượng lipid của *C. sorokiniana* được nuôi trồng dưới điều kiện môi trường khác nhau. Nồng độ NaCl (A, B), nồng độ NaNO<sub>3</sub> (C, D), nồng độ photpho (E, F), nồng độ CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (G, H); nồng độ NaHCO<sub>3</sub> (I, J), cường độ ánh sáng (K, L)

Các chữ số a, b, c, d tại cùng một thời điểm chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ( $p < 0,05$ ).



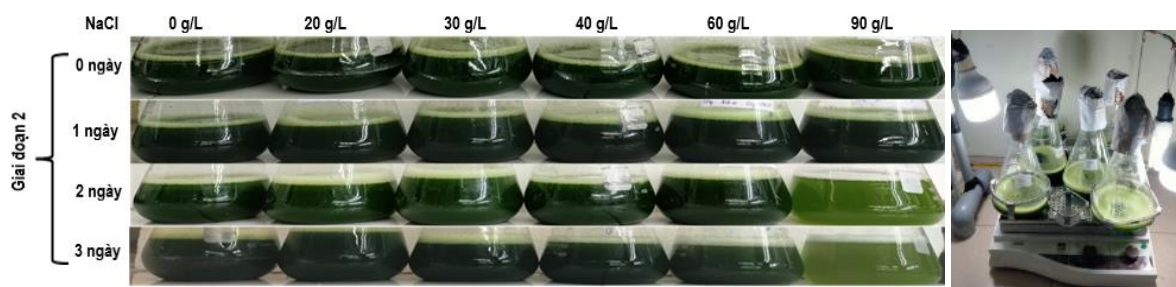
**Ảnh hưởng của nồng độ  $\text{NaNO}_3$ :** Ở giai đoạn 2, sau 2 ngày nuôi cấy ở nồng độ 0 và 22,28 mg/L  $\text{NaNO}_3$ , *C. sorokiniana* có sinh khối khô và tích lũy lipid đạt cao nhất là 1,89 và 2,04 g/L,  $29,56 \pm 0,33$  và  $24,8 \pm 0,33\%$  SKK, tương ứng (Hình 1C, 1D). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê sinh học ( $p > 0,05$ ). Theo công bố của Xie và đồng tác giả (2020) khi kết hợp hai yếu tố độ mặn cao và hàm lượng nitơ thấp (22,28 mg/L  $\text{NaNO}_3$ ) trong môi trường nuôi chủng *C. sorokiniana* SDEC-18 ở giai đoạn 2, hàm lượng lipid tăng lên 50,53% SKK nhưng SKK chỉ đạt 0,46 g/L. Do vậy, trong các thí nghiệm tiếp theo nên chọn nồng độ  $\text{NaNO}_3$  0 g/L (không bổ sung thêm  $\text{NaNO}_3$ ) ở giai đoạn 2 của quá trình nuôi cấy loài *C. sorokiniana*.

**Ảnh hưởng của nồng độ photpho dưới dạng  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ :** Sau 2 ngày bổ sung muối và tăng hàm lượng photpho (0; 45; 90 và 150 mg/L) trong môi trường nuôi, sinh trưởng của *C. sorokiniana* không có sự thay đổi nhiều. Tuy nhiên, hàm lượng lipid và SKK trong môi trường có nồng độ photpho là 0 và 45 mg/L photpho đạt  $32,9 \pm 0,40$  và  $32,56 \pm 0,23$  %SKK và 2,74 và 2,86 g/L, tương ứng (Hình 1E, 1F) với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học ( $p < 0,05$ ). Do đó, lựa chọn bổ sung 0 mg/L photpho cho các thí nghiệm tiếp theo vừa đơn giản, dễ thực hiện và giảm thiểu các vi sinh vật khác vì trong thí nghiệm này, các nghiệm thức cần li tâm thu sinh khối sau đó bổ sung môi trường có chứa hàm lượng photpho tương ứng, dẫn đến khả năng nhiễm cao trong quá trình thao tác.

**Ảnh hưởng của nồng độ  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :** Sau 2 ngày bổ sung hàm lượng  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0; 15,7; 31,4; 47,1 và 68,2 mg/L) vào môi trường nuôi, sinh trưởng của *C. sorokiniana* không có sự thay đổi nhiều. Ở nồng độ 0 và 31,4 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , *C. sorokiniana* có hàm lượng lipid và SKK đạt cao nhất là  $32,00 \pm 0,27$  và  $25,93 \pm 0,85$  %SKK và 2,24 và 2,25 g/L, tương ứng (Hình 1G, 1H). Sự khác biệt về lipid có ý nghĩa thống kê sinh học ( $p < 0,05$ ). Như vậy, lựa chọn nồng độ  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0 mg/L cho sinh khối tảo có hàm lượng lipid cao nhất sẽ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Ảnh hưởng của nồng độ  $\text{NaHCO}_3$ :** Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  (0; 1; 2; 4; 6; 8 và 10 g/L) lên sinh trưởng và hàm lượng lipid của *C. sorokiniana* đã cho thấy tảo có sinh khối và tích lũy lipid trong môi trường có bổ sung 6 g/L  $\text{NaHCO}_3$  đạt 2,21 g/L và  $35,4 \pm 1,33$  % SKK, tương ứng, sau 2 ngày bổ sung muối (Hình 1I, 1K). Theo Kakarla và đồng tác giả (2018) khi nuôi chủng *C. sorokiniana* HS1 ở môi trường BG-11 có bổ sung 1 g/L  $\text{NaHCO}_3$  ở giai đoạn 2 đã cho sinh khối tảo có hàm lượng lipid đạt cao nhất là 38% SKK. Có sự khác biệt giữa kết quả nghiên cứu của chúng tôi so với công bố của Kakarla và đồng tác giả (2018) có thể là do sự sai khác về chủng giống và điều kiện nuôi khác nhau. Do vậy, nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  6 g/L đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng:** Sau 2 ngày nuôi cấy ở giai đoạn 2, *C. sorokiniana* đạt sinh khối và hàm lượng lipid cao nhất là đạt 2,12 g/L và  $34,80 \pm 0,52$  % SKK, tương ứng, ở cường độ ánh sáng  $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (Hình 1L, 1M). Cường độ ánh sáng càng cao thì sinh trưởng càng bị giảm do đã có hiện tượng quang ức chế xảy ra nên hàm lượng lipid không tăng lên. Do vậy, cường độ ánh sáng  $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (tương đương với 7 - 8 klux) đã được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Ảnh minh họa nuôi loài *C. sorokiniana* ở môi trường nuôi có nồng độ NaCl khác nhau ở giai đoạn 2

### Phân tích thành phần axit béo và dinh dưỡng, chất lượng biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana*

Kết quả phân tích thành phần axit béo (Bảng 1) cho thấy trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* chủ yếu chứa các axit béo bão hòa và không bão hòa có 1 - 3 nối đôi như C16:0 (19,20% so với axit béo tổng số - TFA), C16:1 (17,25% TFA), C18:2 (28,25% TFA), C18:3 (26,41% TFA). Trong đó, các axit béo không bão hòa chiếm 79,92% so với TFA. Thành phần axit béo tương đối phù hợp với công bố của Menegazzo và đồng tác giả (2022), trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* CTT 7727 chứa chủ yếu các axit béo C16:0 (39,68% TFA), C16:1 (7,22% TFA), C18:0 (5,49% TFA), C18:1 (17,20% TFA), C18:2 (15,97% TFA) và C18:3 (11,03% TFA). Có sự khác biệt giữa hàm lượng các axit béo giữa kết quả của chúng tôi và công bố của Menegazzo và đồng tác giả (2022) do có sự sai khác về chủng giống và điều kiện nuôi trồng. Kết quả cho thấy sinh khối nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi đảm bảo chất lượng để làm nguyên liệu sản xuất nhiên liệu sinh học.

**CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG**

**Bảng 1. Thành phần axit béo và dinh dưỡng có trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn**

STT	Axit béo	Tên axit béo	Hàm lượng axit béo (% TFA)	STT	Tên axit béo	Hàm lượng axit béo (% TFA)
1	C16:2	7,10-Hexadecadienoic axit	7,80	10	Tổng các axit béo không no	79,92
2	C16:1	7-Hexadecenoic axit	17,25	11	Mức độ không bão hòa	1,69
3	C16:0	Palmitic axit	19,20	12	Protein (% SKK)	9,10 ± 0,50
4	C17:1	Heptadecenoic axit	0,21	13	Lipit (% SKK)	35,40 ± 1,33
5	C17:0	Margaric axit	0,24	14	Cacbohydrat (% SKK)	7,57 ± 0,1
6	C18:2	Linoleic axit	28,25	15	Chlorophyll a (µg/mL)	7,76 ± 0,10
7	C18:3	Gamma Linolenic axit	26,41	16	Chlorophyll b (µg/mL)	3,91 ± 0,15
8	C18:0	Stearic axit	0,62	17	Carotenoit (µg/mL)	0,51 ± 0,07
9		Tổng các axit béo no	20,06			

*Ghi chú: Mức độ không bão hòa = [1 x (% monene) + 2 x (% diene) + 3 x (% Triene) ...]/100*

Thành phần dinh dưỡng của *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng ở giai đoạn 2 (Bảng 1) đã cho thấy hàm lượng lipit, protein và cacbohydrat đạt lần lượt là 35,40 ± 1,33; 9,10 ± 0,5 và 7,57 ± 0,1 % SKK, tương ứng. Hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll b và carotenoit đạt 7,76 ± 0,1; 3,91 ± 0,15 và 0,51 ± 0,07 (µg/mL), tương ứng. Do có chứa hàm lượng lớn các chất dinh dưỡng, đặc biệt là hàm lượng lipit cao nên *C. sorokiniana* rất phù hợp làm nguyên liệu cho sản xuất nhiên liệu sinh học trong tương lai.

**Bảng 2. Dự đoán 5 chỉ số của biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn (Hoekman et al., 2012)**

Mẫu	5 chỉ số của biodiesel				
	Trọng lượng riêng (kg/m <sup>3</sup> )	Điểm chớp cháy (°C)	Độ nhớt động học	Chỉ số cetane	Chỉ số iodine (g I <sub>2</sub> /100 g)
<i>C. sorokiniana</i> nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn (của công bố này)	882	172,04	4,14	51,62	138,24
Mức cho phép (theo tiêu chuẩn Hoa Kỳ và châu Âu) B100	860 – 900	> 101	1,9 - 6,0	> 47	< 120

Chất lượng biodiesel phụ thuộc vào mức độ không bão hòa của thành phần axit béo (Hoekman et al., 2012). Kết quả phân tích các chỉ số của biodiesel (Bảng 2) cho thấy biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn đạt 4 trên 5 tiêu chí của Hoa Kỳ và Châu Âu đối với dầu diesel sinh học (B100). Chỉ số iodine của biodiesel được dự đoán cao hơn giá trị cho phép nên cần giảm hàm lượng các axit béo có nhiều nối đôi có trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* để sản xuất biodiesel có chất lượng cao.

**KẾT LUẬN**

Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy *C. sorokiniana* ở giai đoạn 2 là môi trường BG-11 có NaNO<sub>3</sub> 3g/L, glucose 10 g/L được duy trì đến giai đoạn 2. Ở giai đoạn 2 có bổ sung thêm NaCl 30 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 6 g/L, cường độ ánh sáng 150 µmol/m<sup>2</sup>s trong 4 ngày nuôi cấy. Hàm lượng lipit, protein và cacbohydrat đạt lần lượt là 35,4 ± 1,33; 9,10 ± 0,5 và 7,57 ± 0,1 %SKK, tương ứng. Sinh khối tảo này giàu các axit béo không bão hòa 1 và đa nối đôi như C16:0 (19,20% so với TFA), C16:1 (17,25% TFA), C18:2 (28,25% TFA), C18:3 (26,41% TFA), tương đối phù hợp cho sản xuất nhiên liệu sinh học sau khi loại bỏ bớt các axit béo không bão hòa có nhiều nối đôi. Chất lượng của biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn đạt 4 trên 5 tiêu chí của Hoa Kỳ và Châu Âu đối với dầu diesel sinh học (B100), có tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn sản xuất.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi đề tài “Nghiên cứu sản xuất năng lượng sạch với giá cạnh tranh từ sinh khối vi tảo chứa dầu bằng năng lượng mặt trời và CO<sub>2</sub> theo hướng công nghệ khép kín không phế thải” (do GS.TS. Vũ Thị Thu Hà làm chủ nhiệm và GS.TS. Đặng Diễm Hồng làm chủ nhiệm đề tài nhánh).

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Ali HEA, El-Fayoumy EA, Rasmy WE, Soliman RM, Abdullah MA (2021). Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. *J Appl Phycol* 33: 227-239.

Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Đặng Diễm Hồng (2019). *Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 749 trang.

Đặng Diễm Hồng, Lê Thị Thơm, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Anh Huy, Nguyễn Mạnh Đạt, Tô Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Thùy Linh, Vũ Thị Thu Hà (2023). Nghiên cứu lựa chọn điều kiện nuôi trồng thích hợp cho sinh trưởng của vi tảo lục *Chlorella sorokiniana* ứng dụng sản xuất nhiên liệu sinh học. *Tuyển tập báo cáo toàn văn tại Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2023*, trang 632-637.

Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan, M (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and sustainable energy reviews* 16(1): 143-169.

Ibrahim IA, Elbaily ZI (2020). A review: Importance of chlorella and different applications. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 65(1): 16-34.

Kakarla R, Choi JW, Yun JH, Kim BH, Heo J, Lee S, Cho DH, Ramanan R, Kim HS (2018). Application of high-salinity stress for enhancing the lipid productivity of *Chlorella sorokiniana* HS1 in a two-phase process. *Journal of microbiology* 56: 56-64.

Menegazzo ML, Nascimento VM, Hestekin CN, Hestekin JA, Fonseca GG (2022). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* cultivated in outdoor photobioreactors for biodiesel production. *Biofuels* 13(4): 483-488.

Sajjadi B, Chen WY, Raman AAA, Ibrahim S (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97: 200-232.

Srinuanpan S, Cheirsilp B, Prasertsan P, Kato Y, Asano Y (2018). Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: nutrient starvations and cost-effective harvesting process. *Renew Energy* 122: 507-516.

Tan S, Wen F, Liu D, Lu H, Li L, Zhu L (2024). Physiological responses and lipid accumulation of freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* under short-term zinc stress in water solution. *Algal Research* 80: 103528.

Xie Z, Pei H, Zhang L, Yang Z, Nie C, Hou Q, Yu Z (2020). Accelerating lipid production in freshwater alga *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 by seawater and ultrasound during the stationary phase. *Renew Energy* 161: 448-456.

Yun CJ, Hwang KO, Han SS, Ri HG (2019). The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and bioenergy* 127: 105277.

## RESEARCH ON SELECTING OPTIMAL CULTURE CONDITIONS FOR ENHANCING LIPID ACCUMULATION OF GREEN MICROALGA *Chlorella sorokiniana* FOR BIOFUEL PRODUCTION

Nguyen Minh Chau<sup>3</sup>, Le Thi Thom<sup>1</sup>, Nguyen Cam Ha<sup>1</sup>, Le Anh Huy<sup>1</sup>, Nguyen Manh Dat<sup>1</sup>, Ngo Thi Hoai Thu<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Trang<sup>3</sup>, Tran Thi Lien<sup>3</sup>, Vu Thi Thu Ha<sup>3</sup>, Dang Diem Hong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>National Key Laboratory for Petrochemical Refinery Technologies, Vietnam Institute of Industrial Chemistry

### SUMMARY

*Chlorella* is a fast-growing green microalga genus with a high lipid accumulation capacity within cells, regarded as a self-defense mechanism against adverse culture conditions. The cultivation of this algal genus using two-stage cultivation technology is a globally focused research project to achieve high algal biomass and lipid content for biofuel production. This study presents research results on the effects of culture conditions on the growth and lipid accumulation of *Chlorella sorokiniana* during the second stage. After 4 days of culture at the optimum conditions (i.e., BG-11 medium containing NaNO<sub>3</sub> 3 g/L, glucose 10 g/L, temperature 28-30°C, light intensity 40-100 μmol/m<sup>2</sup>s, pH 7) in the first stage, *C. sorokiniana* achieved the highest growth and transitioned to the second-stage cultivation. Obtained results from the second stage cultivation revealed that supplementing the cultivation medium with 30 g/L NaCl, 6 g/L NaHCO<sub>3</sub> under a light intensity of 150 μmol/m<sup>2</sup>s led to *C. sorokiniana* achieving the highest dry cell weight (DCW) and lipid content of 2.12 ± 0.06 g/L and 35.8% DCW, respectively. The predominant fatty acids in biomass were C16:0 (19.20% of total fatty acids -TFA), C16:1 (17.25% TFA), C18:2 (28.25% TFA), C18:3 (26.41% TFA). The results indicated that *C. sorokiniana* biomass is a potential feedstock for high-quality biofuel production. Based on the degree of unsaturation, the evaluation of biodiesel quality from the fatty acid composition of *C. sorokiniana* biomass cultured in two-stage mixotrophic conditions has shown that biodiesel is predicted to reach 4 out of 5 parameters according to U.S. and European standards on biodiesel (B100), showing potential for practical applications.

**Keywords:** *Chlorella sorokiniana*, BG-11, biofuel, culture conditions, green microalgae, two-stage cultivation.

\* Author for correspondence: Tel: 02437911059; ddhong60vn@yahoo.com (Prof. Dr. Dang Diem Hong)

# NÂNG CAO HOẠT ĐỘ NATTOKINASE CỦA CHỦNG *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* TVY.04 BẰNG TÁC NHÂN GÂY ĐỘT BIẾN NGẪU NHIÊN

Lê Tuấn, Nguyễn Mai Hiền, Nguyễn Lan Hương\*

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

## TÓM TẮT

Các bệnh liên quan đến tim mạch gây ra những hậu quả vô cùng nguy hiểm. Theo Tổ chức Y tế thế giới, đây là nguyên nhân cướp đi sinh mạng của 17,9 triệu người mỗi năm, chiếm khoảng 31% tổng số ca tử vong trên toàn cầu. Nguồn gốc của các bệnh này là do sự hình thành cục máu đông gây tắc nghẽn mạch máu. Với khả năng làm tan cục máu đông, nattokinase có tiềm năng lớn để ứng dụng phòng ngừa và điều trị các bệnh liên quan huyết khối. Đây là một loại enzyme ngoại bào được sinh tổng hợp bởi một số chủng thuộc loài *Bacillus*. Trong tự nhiên, các chủng sinh tổng hợp nattokinase với hoạt độ chưa cao và thường kèm theo nhiều sản phẩm phụ của quá trình trao đổi chất. Trong nghiên cứu này chủng *B. amyloliquefaciens* TVY.04 phân lập từ mẫu tương lấy từ tỉnh Vĩnh Yên được gây đột biến bằng tác nhân vật lý (chiếu tia UV) và hóa học (sử dụng đồng thời Ethyl methanesulfonate và Ethidium bromide) nhằm cải thiện khả năng sinh tổng hợp nattokinase. Sau quá trình đột biến, các biến chủng được sàng lọc định tính trên môi trường thạch LB có bổ sung 1% sữa gầy. Tiếp theo, tiến hành sàng lọc định lượng bằng phương pháp lên men lỏng và tiến hành đo hoạt độ enzyme với cơ chất fibrin. Cuối cùng các chủng đột biến tốt nhất được nuôi cấy 5 chu kỳ để đánh giá tính ổn định. Kết quả sàng lọc từ 100 biến chủng đã thu được chủng UV1.15 có hoạt độ Nattokinase tăng 19% so với chủng gốc.

*Từ khóa:* *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04, đột biến ngẫu nhiên, nattokinase, ethidium bromide, ethyl methanesulfonate, UV.

## MỞ ĐẦU

Nattokinase (NK) (E.C.3.4.21.62) là một serine protease thuộc họ subtilisin gồm 275 axit amin và có khối lượng phân tử xấp xỉ 28 kDa, pI 8,6 (Weng *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Nattokinase có khả năng làm tan cục máu đông bằng cách phân giải trực tiếp fibrin, chuyển đổi prourokinase thành urokinase và làm tăng mức độ chất hoạt hóa plasminogen t-PA (Milner and Makise, 2002; Weng *et al.*, 2017). Hơn nữa, hoạt tính làm tan huyết khối của NK được chứng minh cao gấp 4 lần so với plasmin (Chen *et al.*, 2018) và thời gian hiệu lực cao, đạt từ 8 - 12 giờ trong cơ thể, so với t-PA chỉ có hiệu quả cao nhất sau 3 - 6 giờ và urokinase từ 4 - 20 phút sau khi khởi phát (Milner and Makise, 2002). Chính từ những ưu điểm kể trên, NK đã được quan tâm nghiên cứu trên thế giới từ nhiều năm nay. Một trong số các hướng nghiên cứu tiềm năng là tạo ra các đột biến ngẫu nhiên hoặc có định hướng, nhằm cải thiện hoạt độ hoặc các tính chất của protein enzyme (Li *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2024).

Vi sinh vật có thể tạo ra đặc tính di truyền mới bằng hai cách là đột biến và tái tổ hợp di truyền. Phương pháp phổ biến nhất được sử dụng để tạo đột biến cho năng suất cao là xử lý một quần thể bằng tác nhân gây đột biến cho đến khi đạt được tỷ lệ sống sót mong muốn. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tần số đột biến thu được cao khi tỷ lệ sống sót nằm trong khoảng từ 0.1 - 10% (Jun *et al.*, 2012). Các đột biến ngẫu nhiên có thể được tạo ra khi sử dụng các tác nhân vật lý hoặc hóa học. Với phương pháp hóa học, các hóa chất như ethyl methanesulfonate (EMS), Ethidium bromide (EtBr) là những tác nhân gây đột biến mạnh với cơ chế gây ra sự thay đổi trong quá trình sao chép DNA. EMS tạo ra các đột biến ngẫu nhiên trong DNA bằng cách thay thế nucleotide, đặc biệt là bằng cách alkyl hóa guanine. EtBr gây đột biến bằng cách chèn vào giữa các sợi DNA và làm biến dạng DNA. Các đột biến hóa học làm tăng tần số đột biến và dễ dàng xử lý hơn (Latif *et al.*, 2018). Với các tác nhân đột biến hóa học, liều lượng và thời gian xử lý được báo cáo là những yếu tố chính ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tế bào và hiệu quả đột biến. Theo các công bố, đột biến hóa học có thể làm tăng hoạt độ enzyme của chủng từ 1,5 đến trên 9 lần (Latif *et al.*, 2018; Prihanto *et al.*, 2019; Sasi *et al.*, 2020).

Với phương pháp vật lý, các nguồn UVB (280 - 320 nm) và UVC (100 - 280 nm) có thể gây ra cả sự phá hủy trực tiếp và gián tiếp do khả năng hấp thụ mạnh mẽ của các phân tử DNA (Mohsin *et al.*, 2017). Phản ứng phổ biến nhất được chỉ ra là việc hình thành liên kết giữa các thymine liền kề tạo thành cấu trúc thymine dimer (T - T). Các dimer này dẫn đến những thay đổi cấu trúc trong DNA, ngăn cản quá trình phiên mã và sao chép DNA của vi sinh vật dẫn đến đột biến hoặc có thể gây chết tế bào (Prihanto *et al.*, 2020). Khoảng cách, thời gian và cường độ chiếu tia UV là các yếu tố mang tính quyết định đến hiệu quả của phương pháp đột biến này. Jun và đồng tác

giả (2012) thực hiện đột biến chủng *Bacillus subtilis* LD-8547 bằng tác nhân UV để nâng cao khả năng sinh tổng hợp enzyme phân giải fibrin, kết quả thu nhận được biến chủng có hoạt độ cao gấp 1,27 lần so với chủng gốc. Nghiên cứu, phương pháp đột biến bằng tia UV có thể làm tăng rõ rệt hoạt độ enzyme của các chủng vi sinh vật (Sasi *et al.*, 2020; Tuly *et al.*, 2022). Một điểm đáng lưu ý là sau khi chiếu UV, việc giữ tế bào trong bóng tối có thể giúp hạn chế kích hoạt cơ chế tự sửa chữa, qua đó thu được nhiều biến chủng hơn (Mohsin *et al.*, 2017).

Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus amiloliquefaciens* TVY.04 được đột biến ngẫu nhiên bằng các tác nhân vật lý và hóa học nhằm tìm kiếm biến chủng có khả năng sinh tổng hợp nattokinase cao hơn chủng gốc.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus amiloliquefaciens* TVY.04, có trình tự 16S rRNA ký hiệu Genbank OQ225003, được phân lập từ mẫu tương bản thu thập tại tỉnh Vĩnh Yên. Các hóa chất khác có nguồn gốc từ Sigma, Himedia.

### Phương pháp

#### Hoạt hóa và tăng sinh chủng

Chủng TVY.04 được hoạt hóa trên môi trường LBW (peptone 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L, sữa gầy 10 g/L, agar 18 g/L) sau đó được nuôi tĩnh ở 37°C, 16h. Chọn một khuẩn lạc riêng rẽ, có vòng phân giải rõ rệt và cấy chuyển vào 20 mL môi trường LB (peptone 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L) và nuôi lắc ở điều kiện 37°C, 150 rpm. Sau khi tăng sinh, canh trường vi khuẩn được ly tâm 10000 rpm, 5 phút, 4°C, loại bỏ dịch nổi và rửa sinh khối tế bào 3 lần bằng NaCl 0,9% để thu huyền phù vi khuẩn.

#### Đột biến bằng hóa chất

2 mL dịch huyền phù vi khuẩn được xử lý bằng hỗn hợp EMS và EtBr với hàm lượng của từng tác nhân bằng nhau và bằng 75 hoặc 100 µg/mL, thời gian xử lý ( $\Delta T$ ) 10 - 60 phút; tiến hành đồng thời mẫu kiểm chứng thay tác nhân đột biến bằng nước cất. Tế bào sau đột biến được rửa 3 lần bằng NaCl 0,9% (ly tâm 10000 rpm, 5 phút, 4°C) để loại bỏ tác nhân đột biến. Tiếp đó, tế bào được pha loãng, trải trên môi trường LBW và được nuôi tĩnh trong 16 h ở 37°C.

#### Đột biến bằng UV

2 mL dịch huyền phù vi khuẩn được trải trên đĩa Petri sạch. Một đĩa được giữ trong tối dùng làm mẫu kiểm chứng, các đĩa còn lại được chiếu UV (Toshiba GL15,  $\lambda = 253,7$  nm) ở khoảng cách (D) 30 cm hoặc 40 cm trong thời gian ( $\Delta T$ ) từ 2 - 90 phút. Sau chiếu xạ, huyền phù được giữ trong điều kiện tối, 4°C trong 24h nhằm ổn định cấu trúc pyrimidine dimers (Mohsin *et al.*, 2017). Huyền phù sau đột biến được pha loãng, trải trên môi trường LBW và nuôi tĩnh trong 10 h ở 37°C.

#### Sàng lọc biến chủng

Từ các đĩa petri có khuẩn lạc thu được sau đột biến, sàng lọc cấp 1 chọn các khuẩn lạc có vòng phân giải rõ ràng, xác định tỷ lệ D1/D2 với D1 là đường kính vòng phân giải cơ chất, D2 là đường kính khuẩn lạc. Các khuẩn lạc có D1/D2 lớn nhất được cấy chấm điểm sang đĩa môi trường LBW rắn, nuôi tĩnh ở 37°C, 12 h. Các khuẩn lạc tiếp tục được lựa chọn dựa trên tỷ lệ đường kính vòng phân giải và đường kính khuẩn lạc. Các khuẩn lạc này sẽ được sàng lọc cấp 2 bằng cách lên men trên môi trường GPY (peptone 10 g/L, cao nấm men 10 g/L, glucose 10 g/L, NaCl 5 g/L, CaCl<sub>2</sub> 1 g/L,) ở điều kiện 37°C, 150 rpm trong 24 h. Lấy mẫu đo hoạt độ enzyme nattokinase.

#### Xác định tỷ lệ tế bào sống sót

Tỷ lệ tế bào sống sót (SR) được tính toán dựa trên số khuẩn lạc thu được sau đột biến so với mẫu đối chứng không được xử lý chiếu UV hoặc hóa chất (Prihanto *et al.*, 2019).

#### Xác định hoạt độ Nattokinase

Phương pháp định lượng sử dụng cơ chất là fibrin 4 g/L điều kiện phản ứng: pH 7,4, nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Một đơn vị hoạt độ fibrin (FU) được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác phản ứng thủy phân fibrin tạo thành lượng sản phẩm tương ứng với 1 µg tyrosine trong thời gian 1 phút ở điều kiện thử nghiệm (Huong *et al.*, 2011). Hoạt độ tương đối của các biến chủng được định nghĩa là tỷ số giữa hoạt độ (FU/mL) của biến chủng và hoạt độ (FU/mL) của chủng gốc trong cùng điều kiện nuôi cấy.

#### Xác định độ ổn định của biến chủng

Chủng đột biến lựa chọn được ria trên môi trường LBW, nuôi tĩnh ở 37°C trong 24 h, lặp lại 5 chu kỳ. Lựa chọn khuẩn lạc riêng rẽ cấy chuyển vào môi trường LB sau đó lên men trên môi trường GYP ở điều kiện 37°C, 150 rpm trong 24 h và đo hoạt độ enzyme để đánh giá khả năng tái sửa chữa (Jun *et al.*, 2012).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

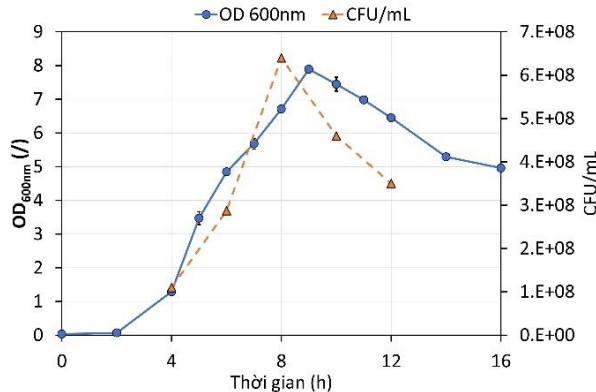
**Sinh trưởng của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04**

Đồ thị Hình 1 cho thấy chủng TVY.04 có pha log kéo dài từ thời điểm 2 h đến 9 h với giá trị OD 600 nm đạt cực đại xấp xỉ 8,0. Kết quả xác định mật độ khuẩn lạc bằng phương pháp trải đĩa cho thấy pha log chậm hơn, mật độ CFU/mL đạt cực đại sau 12 h nuôi cấy. Sự khác biệt có thể được giải thích do giá trị OD 600 nm phản ánh tổng lượng tế bào ở trạng thái huyền phù, trong khi giá trị CFU/mL chỉ đặc trưng cho các tế bào sống. Từ đồ thị sinh trưởng, dịch nuôi cấy sau 7 h được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm đột biến ngẫu nhiên.

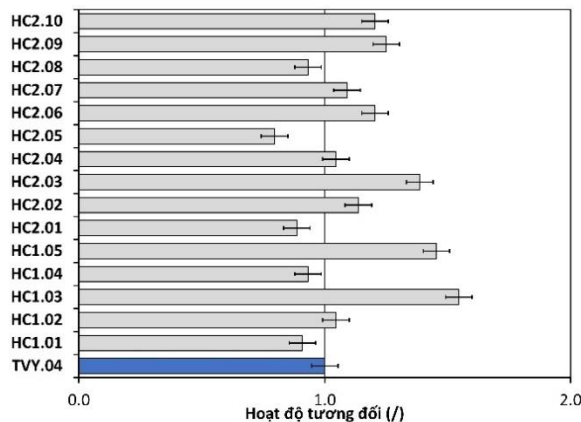
**Đột biến bằng hóa chất**

Với tác nhân đột biến là hỗn hợp EMS và EtBr cùng hàm lượng 100 µg/mL, ΔT = 10 - 60 phút, hầu hết các tế bào bị tiêu diệt, giá trị SR đều chỉ đạt dưới 0,02%. Khi giảm liều lượng tác nhân xuống 75 µg/mL, tỷ lệ sống sót của tế bào tăng đáng kể và đạt xấp xỉ 0,2% với thời gian xử lý ΔT = 10 phút và 30 phút. Kết quả tỷ lệ sống sót thu được có sự tương đồng với công bố của Prihanto và đồng tác giả (2020) trên đối tượng là chủng *Bacillus subtilis* RRM1.

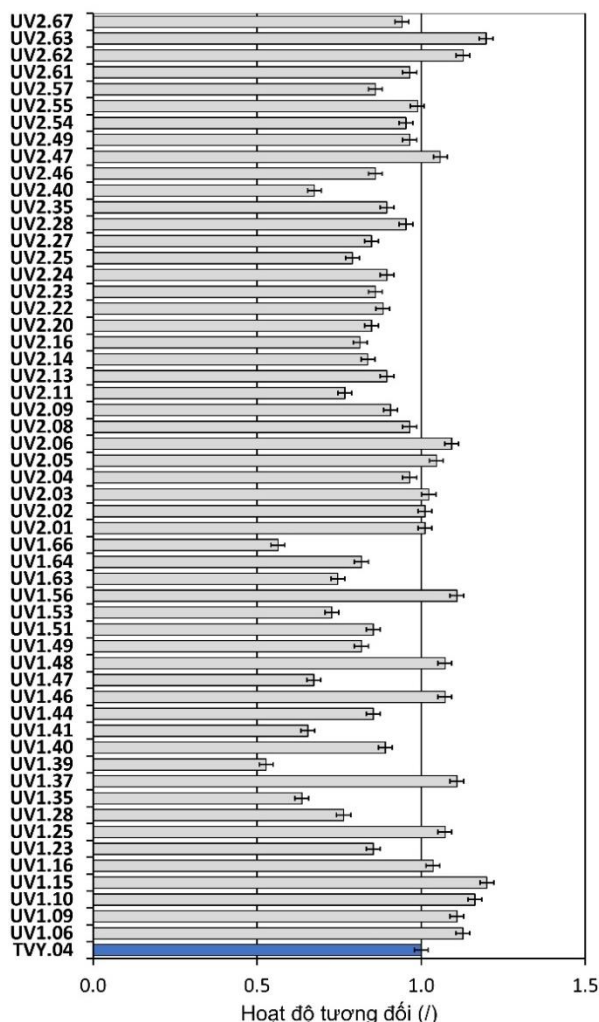
Do tỷ lệ sống sót của đột biến hóa học rất thấp, toàn bộ 15 khuẩn lạc thể hiện rõ ràng vòng phân giải cơ chất trong bước sàng lọc cấp 1 đều được lựa chọn để nuôi cấy trong môi trường lỏng. Kết quả xác định hoạt độ enzyme Nattokinase (Hình 2) cho thấy phần lớn các biến chủng có hoạt độ tương đương hoặc thấp hơn chủng gốc Chủng đột biến HC1.03 và HC1.05 đạt hoạt độ cao nhất, lần lượt gấp 1,55 và 1,44 lần chủng ban đầu. Biến chủng HC1.03 thu được ở chế độ đột biến ứng với hàm lượng tác nhân EMS và EtBr 100 µg/mL, ΔT = 10 phút, SR = 0,02%. Điều đáng lưu ý là biến chủng này chỉ có giá trị tỷ lệ D1/D2 đạt 1,9, thấp hơn đáng kể so với một số khuẩn lạc khác (D1/D2 đạt từ 2,0 đến 2,3). Điều này có thể được giải thích bởi sự hình thành vòng phân giải cơ chất còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như khả năng khuếch tán của enzyme ngoại bào, độ dày lớp thạch. Với các chủng sinh nattokinase thuộc chi *Bacillus*, enzyme ngoài bào thường được tiết ra cùng các exopolysaccharide tạo độ nhớt cao qua đó ảnh hưởng đến khả năng khuếch tán của enzyme trên đĩa thạch. Công bố của Rahman và đồng tác giả (2017) cũng kết luận không có mối quan hệ tuyến tính giữa tỷ lệ D1/D2 và hoạt độ enzyme khi nuôi lỏng. Như vậy, có thể thấy phương pháp sàng lọc các biến chủng dựa trên vòng phân giải cơ chất chỉ có ý nghĩa trong việc định tính và phân loại sơ bộ các biến chủng. Sàng lọc bằng phương pháp đo hoạt độ enzyme là cần thiết để thu được các kết quả định lượng tin cậy.



Hình 1. Sinh trưởng của chủng TVY.04 trên môi trường LB

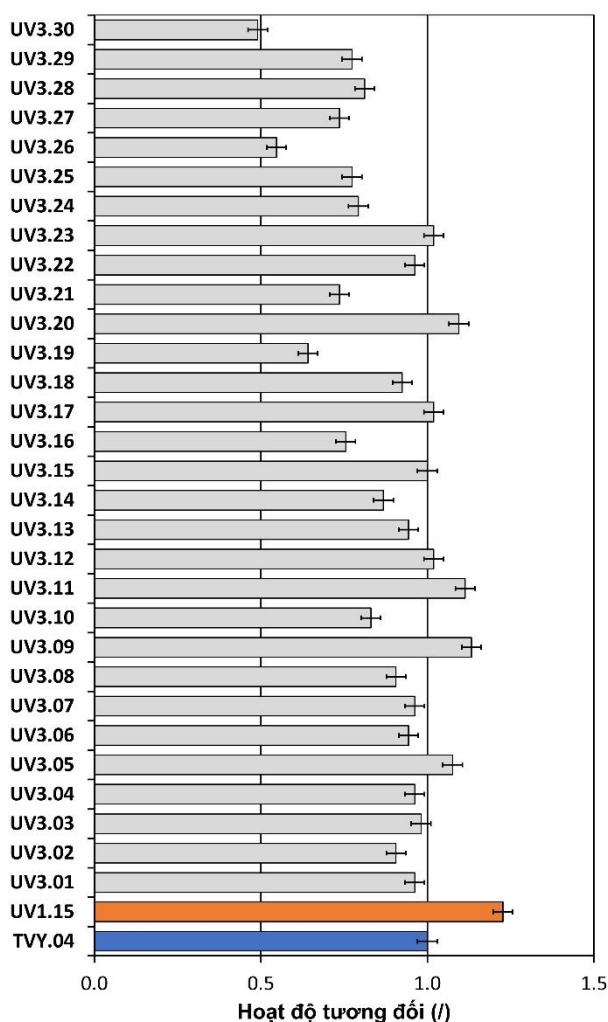


Hình 2. Hoạt độ tương đối của chủng đột biến hóa học so với chủng gốc TVY.04  
 HC1: Hàm lượng EMS và EtBr 100 µg/ml, HC2: Hàm lượng EMS và EtBr 75 µg/ml.



Hình 3. Hoạt độ tương đối của các chủng đột biến bằng UV so với chủng gốc TVY.04

UV1: Khoảng cách chiếu UV 30 cm, UV2: Khoảng cách chiếu 40 cm.



Hình 4. Hoạt độ tương đối của các chủng đột biến kép so với chủng gốc TVY.04

UV3: Đột biến kép với khoảng cách chiếu 30 cm, thời gian 2 phút.

### Đột biến bằng UV

Quá trình chiếu UV cho thấy tỷ lệ sống sót giảm dần theo thời gian chiếu UV với cả 2 khoảng cách chiếu là 30 cm (SR giảm từ 8,76% xuống dưới 0,01%) và 40 cm (SR giảm từ 7,71% xuống dưới 0,01%) với thời gian chiếu từ 2 – 20 phút. Khi tăng khoảng cách chiếu UV từ 30 cm lên 40 cm, tỷ lệ sống sót sau đột biến của chủng không có sự khác biệt đáng kể. Với các thời gian chiếu từ 30 đến 90 phút, không có tế bào sống sót nào thu được ở cả 2 khoảng cách chiếu đã nêu. Theo nghiên cứu trên chủng *B. subtilis* LD-8547, ở chế độ chiếu UV với D = 30 cm và ΔT = 3 - 15 phút, tỷ lệ sống sót đạt từ 0,17 – 39,74%. Ở cùng thời gian xử lý là 5 phút tỷ lệ sống sót của chủng *B. subtilis* LD-8547 đạt 23,08% (Jun *et al.*, 2012). Trong công bố của Prihanto và đồng tác giả (2020) khi thực hiện đột biến với chủng *B. subtilis* RRM-1 ở chế độ khắc nghiệt hơn với D = 15 cm và ΔT = 30 - 120 phút, tỷ lệ sống sót đạt 0,9 – 4,36%. Trong nghiên cứu này, hầu hết các tế bào của chủng TVY.04 đã bị tiêu diệt sau 20 phút và không có khuẩn lạc nào ghi nhận được với thời gian chiếu UV từ 30 đến 90 phút. Như vậy, chủng TVY.04 nhạy cảm hơn một số chủng sinh tổng hợp nattokinase thuộc cùng chi *Bacillus*. Tỷ lệ sống sót thấp khi tiến hành chiếu UV cũng cho thấy mức độ tác động mạnh mẽ của tác nhân đột biến đến tế bào TVY.04.

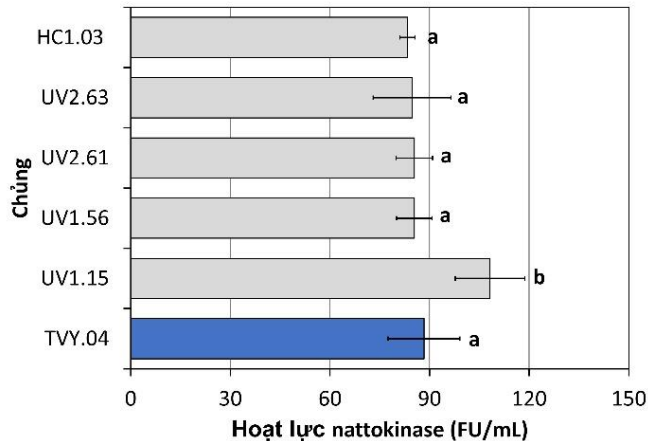
Từ các thí nghiệm chiếu UV, quá trình sàng lọc cấp 1 đã lựa chọn được 55 biến chủng có tỷ lệ D1/D2 tương đồng hoặc tốt hơn chủng gốc TVY.04. Tiếp tục tiến hành sàng lọc cấp 2 trên 55 biến chủng này (Hình 3). Hoạt độ tương đối (so với chủng gốc) của các chủng đột biến nằm trong khoảng từ 0,51 – 1,2. Trong đó các biến chủng UV1.15 và số UV2.63 đạt hoạt độ cao nhất. Trong một số nghiên cứu tương tự khi đột biến bằng tác nhân UV, biến chủng của *Bacillus subtilis* có hoạt độ protease tăng gấp 1,14 lần chủng gốc (Mohsin *et al.*, 2017), biến chủng của *Bacillus licheniformis* có hoạt độ chitinase tăng từ 3 đến 4 lần so với chủng gốc (Sasi *et al.*, 2020).

Biến chủng UV1.15 thu được ở chế độ chiếu xạ  $D = 30$  cm,  $\Delta T = 2$  phút,  $SR = 8,76\%$  được lựa chọn làm đối tượng tiến hành đột biến kép với cùng chế độ chiếu xạ ( $D = 30$  cm và thời gian  $\Delta T = 2$  phút).

Kết quả thực nghiệm cho thấy tỷ lệ sống sót của thí nghiệm đột biến kép đạt chỉ đạt 0,39%, thấp hơn đáng kể so với đột biến lần 1 trong cùng điều kiện. Điều này khẳng định thêm một lần nữa sự nhạy cảm với tác nhân UV của chủng *B. amyloliquefaciens* TVY.04. Do tỷ lệ sống sót thấp, tổng cộng 30 khuẩn lạc có vòng phân giải cơ chất rõ ràng trên môi trường sàng lọc cấp 1 đều được lựa chọn để nuôi cấy lỏng và hoạt độ tương đối được trình bày trên Hình 4. Có thể thấy tất các biến chủng đều có hoạt độ thấp hơn so với chủng UV1.15, thậm chí phần lớn có hoạt độ thấp hơn cả chủng gốc TVY.04. Như vậy quá trình đột biến kép có thể là không cần thiết hoặc đột biến xảy ra ngẫu nhiên nên số lượng khuẩn lạc sàng lọc cần nhiều hơn để có khả năng xuất hiện biến chủng tốt.

**Đánh giá độ ổn định của các chủng đột biến**

Từ kết quả đột biến hóa chất (Hình 2) và đột biến UV (Hình 3) các biến chủng có hoạt độ cao nhất được lựa chọn để đánh giá độ ổn định bao gồm HC1.61, UV1.15, UV1.56, UV2.62 và UV2.63. Kết quả cho thấy hầu hết các chủng đều có giá trị hoạt độ nattokinase trở về tương đương chủng gốc sau 5 chu kỳ cấy chuyển trên đĩa thạch LBW. Duy nhất UV1.15 là biến chủng giữ được hoạt độ nattokinase cao hơn 1,19 lần so với chủng gốc, đạt 108,2 FU/mL. Như vậy, có khả năng các biến chủng đã kích hoạt quá trình tự sửa chữa những đột biến sinh ra khi xử lý chiếu tia UV hoặc với hóa chất EMS, EtBr. Gần đây, nghiên cứu của Sheng và đồng tác giả (2024) khi đột biến *B. subtilis* ZZ-S1 bằng phương pháp chiếu xạ chùm carbon đã thu được biến chủng có hoạt độ cao gấp 1.66 lần chủng gốc và khả năng sinh tổng hợp enzyme được kiểm chứng ổn định qua 150 chu kỳ cấy chuyển. Như vậy, công đoạn kiểm tra độ ổn định của biến chủng là cần thiết để sàng lọc và chọn ra các biến chủng ổn định.



Hình 5. Hoạt độ nattokinase của chủng gốc TVY.04 và các biến chủng thu được từ đột biến UV và hóa chất sau 5 chu kỳ cấy chuyển trên đĩa thạch  
 Các chữ cái thể hiện khác biệt có nghĩa ( $p < 0,05$ ) được kiểm tra bằng Duncan test với số lần lặp tối thiểu 4.

**KẾT LUẬN**

Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04 sinh tổng hợp nattokinase đã được đột biến bởi các tác nhân vật lý (chiếu tia UV) hoặc hóa học (sử dụng hỗn hợp EMS/EtBr). Qua sàng lọc bằng phương pháp lên men lỏng đã thu được biến chủng UV1.15 có hoạt độ nattokinase cao nhất, đạt 108,2 FU/mL, cao gấp 1,19 lần chủng gốc *B. amyloliquefaciens* TVY.04 và ổn định qua 5 chu kỳ cấy chuyển. Biến chủng này thu nhận được từ quá trình đột biến bằng tác nhân UV với khoảng cách chiếu  $D = 40$  cm, thời gian  $\Delta T = 2$  phút. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ tiếp tục nâng cao hoạt độ của biến chủng UV1.15 bằng kỹ thuật tối ưu điều kiện lên men.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Chen H, McGowan EM, Ren N, Lal S, Nassif N, Shad-Kaneez F, Qu X, Lin Y (2018). Nattokinase: A promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Biomark Insights*, 13: 1-8.

Chen L, Yu K, Ma A, Zhu W, Wang H, Tang X, Tang Y, Li Y, Li J (2024). Enhanced Thermostability of Nattokinase by Computation-Based Rational Redesign of Flexible Regions. *J Agric Food Chem*, 72: 14241-14254.

Huong NL, Phuong HT, Luan PQ (2011). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh tổng hợp enzym nattokinaza từ một số thực phẩm đậu tương lên men. *Journal of Science & Technology Technical Universities*, 81: 175-179.

Jun Y, Guo-liang L, Rong-qiang S, Zhen-hong Z, Yan-ling Y (2012). Mutation of douchi fibrinolytic enzyme producing strain *Bacillus subtilis* LD-8547. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 34: 1251-1255.

Latif A, Iqbal M, Asgher M (2018). Ethyl Methane Sulfonate chemical mutagenesis of *Bacillus subtilis* for enhanced production of protease. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5: 555664.



- Li Y, Tang X, Chen L, Ma A, Zhu W, Huang W, Li J (2023). Improvement of the fibrinolytic activity, acid resistance and thermostability of nattokinase by surface charge engineering. *Int J Biol Macromol*, 253: 127373.
- Milner M, Makise K (2002). Natto and its active ingredient nattokinase a potent and safe thrombolytic agent. *Altern Complement Ther*, 8: 158-164.
- Mohsin I, Muhammad A, Fareeha B (2017). Development of *Bacillus subtilis* mutants for overproduction of protease. *J Microb Biochem Technol*, 9: 174-180.
- Prihanto AA, Firdaus M, Jatmiko YD (2019). Chemical mutation of *Bacillus subtilis* RRM1 increases L-asparaginase activity. *J Biotech Res*, 10: 250-254.
- Prihanto AA, Muyasyaroh H, Puspita FI (2020). Increasing the production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* RRM-1 by UV-mutation. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 493: 012012.
- Rahman CH, Soltana F, Abdelwaheb C (2017). Enhancement of protease production by *Bacillus sp.* and *Micrococcus varians* induced by UV-mutagenesis. *Int J Environ Agric Biotechnol*, 2: 2348-2353.
- Sasi A, Duraipandiyar N, Marikani K, Dhanasekaran S, Al-Dayyan N, Venugopal D (2020). Identification and characterization of a newly isolated chitinase-producing strain *Bacillus licheniformis* SSCL-10 for chitin degradation. *Archaea*, 2020: 8844811.
- Sheng Y, Zhang S, Li X, Wang S, Liu T, Wang C, Yan L (2024). Phenotypic and genomic insights into mutant with high nattokinase-producing activity induced by carbon ion beam irradiation of *Bacillus subtilis*. *Int J Biol Macromol*, 271: 132398.
- Tuly JA, Ma H, Zabed HM, Dong Y, Janet Q, Golly MK, Feng L, Li T, Chen G (2022). Harnessing the keratinolytic activity of *Bacillus licheniformis* through random mutagenesis using ultraviolet and laser irradiations. *Appl Biochem Biotechnol*, 194: 1546-1565.
- Weng Y, Yao J, Sparks S, YuejuWang K (2017). Nattokinase: an oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *Int J Mol Sci*, 18: 523.

## ENHANCE NATTOKINASE ACTIVITY OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* TVY.04 BY RANDOM MUTAGENESIS.

**Tuan Le, Mai Hien Nguyen, Lan Huong Nguyen\***

*Department of Bioengineering, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

### SUMMARY

Cardio vascular diseases (CVDs) cause extremely dangerous consequences. According to the World Health Organization, this deadly disease is responsible for 17.9 million deaths each year, accounting for about 31% of total deaths globally. The origin of these diseases is the formation of blood clots that block blood vessels. With the ability to dissolve blood clots, nattokinase has great potential for application in prevention and treatment of blood clot-related diseases. This is an extracellular protease biosynthesized by certain strains of the *Bacillus* species. In nature, wild type strains synthesize nattokinase with low activity and often mixed with several byproducts of metabolism. In this study, strain *B. amyloliquefaciens* TVY.04 isolated from a Tuong Ban origin from Vinh Yen province was treated using physical agents (UV irradiation) and chemical agents (simultaneous use of Ethyl methanesulfonate and Ethidium bromide) to improve the nattokinase activity. After the mutagenesis process, mutants were first screened by proteolytic halo formation on LB agar medium supplemented with 1% skim milk. Next, the potential mutants were cultivated in a liquid medium to assess their nattokinase activities using fibrin as the substrate. Finally, the best mutants were cultured for 5 cycles to evaluate their stability. By screening 100 mutants using the mentioned procedure, the best mutant UV1.15 was obtained, having nattokinase activity increased by 19% compared to the original strain TVY.04.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04, random mutagenesis, nattokinase, ethidium bromide, ethyl methanesulfonate, UV.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0903247172; Email: huong.nguyenlan@hust.edu.vn

# THỬ NGHIỆM TẠO DÒNG VI KHUẨN *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ MANG GEN TÁI TỔ HỢP TỔNG HỢP NHỰA POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE (PHB) TỪ VI KHUẨN *Rhizobium gallicum* M40.1 ĐỘT BIẾN

Nguyễn Thành Luân\*, Phan Thị Nguyệt Ánh, Huỳnh Thị Mỹ Trang, Tôn Trinh Trinh, Lê Thị Mỹ Lệ

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Poly- $\beta$  hydroxybutyrate (PHB) là loại nhựa sinh học thuộc nhóm poly hydroxyalkanoates (PHAs) và được dự trữ trong tế bào vi khuẩn dưới dạng polyester. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tạo dòng vi khuẩn *Escherichia coli* chứa gen *phbC*- mã hóa enzyme sinh tổng hợp PHB từ vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 đột biến. Kết quả thử nghiệm đã đánh giá cặp mồi F-*phbC*/R-*phbC* được thiết kế có khả năng khuếch đại gen *phbC* với kích thước 1000 bp. Để tối ưu hoá phản ứng PCR, khảo sát nhiệt độ bắt cặp và nồng độ của mồi F-*phbC*/R-*phbC* cho kết quả bắt cặp tốt ở nhiệt độ 62°C, với nồng độ mồi 25 pmol/ $\mu$ L. Vector tái tổ hợp pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* đã được biến nạp thành công vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  khả biến, chọn lọc vi khuẩn biến nạp trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB) chứa ampicillin (100  $\mu$ g/ml)/IPTG/X-gal cùng bước sàng lọc các vi khuẩn dương tính bằng phản ứng PCR khuẩn lạc. Nghiên cứu này có tiềm năng đánh giá việc chuyển đổi các gen từ vi khuẩn và tạo ra các dòng vi khuẩn tái tổ hợp mang gen mã hóa enzyme sinh tổng hợp PHB có hiệu suất cao ở quy mô công nghiệp trong ứng dụng vật liệu mới thay thế.

Từ khóa: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , nhựa sinh học, Poly- $\beta$  hydroxybutyrate, PHB, *Rhizobium gallicum*.

## MỞ ĐẦU

Nhựa sinh học được xem là một vật liệu mới có thể thay thế nhựa tổng hợp truyền thống và có thời gian phân hủy nhanh góp phần làm giảm ô nhiễm môi trường. Nhựa sinh học có rất nhiều loại như: nhựa dẻo từ tinh bột, nhựa acid polylactic (PLA), nhựa poly- $\beta$ - hydroxybutyrate (PHB), polyacrylamide 11 (PA 11), nhựa polyethylene xuất xứ sinh học (Đoàn Văn Thước và Lưu Thị Hối, 2015). Đặc biệt poly- $\beta$ - hydroxybutyrate (PHB) là một loại nhựa sinh học ưu việt có khả năng tự phân hủy thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O trong thời gian ngắn, không sinh chất độc dioxin như nhựa truyền thống khi xử lý và đặc biệt có thể sản xuất từ vi sinh vật. Nhựa PHB tồn tại trong tế bào chất dưới dạng hạt tinh thể và có thể tách chiết nhờ dung môi. PHB đã được xác định có thể tổng hợp trong hơn 20 chi vi khuẩn khác nhau trong đó có các chi lớn như *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* (Đỗ Thị Thanh Huyền *et al.*, 2017; Hungund *et al.*, 2018). Quá trình sinh tổng hợp PHB ở vi sinh vật bắt đầu bởi phản ứng trùng hợp của hai phân tử acetyl-CoA sinh ra sản phẩm là Acetoacetyl-CoA với sự xúc tác của enzyme  $\beta$ -ketothiolase được mã hóa bởi gen *phbA*, sản phẩm này sẽ bị khử thành D-( $\beta$ )-hydroxybutyryl-CoA do một Acetoacetyl-CoA reductase (được mã hóa bởi gen *phbB*). Bước cuối cùng và quan trọng nhất được xúc tác bởi enzyme sinh tổng hợp PHB tạo ra các mono-PHB được mã hóa khi có sự xuất hiện bởi gen *phbC* kết hợp sự tương tác cố định từ gen bảo tồn *phbA* và *phbB* (Hungund *et al.*, 2018).

Việc nghiên cứu ứng dụng PHB được xem xét ở các chủng vi khuẩn tái tổ hợp từ vi khuẩn *E.coli* được xem là khả dĩ nhất cho việc sản xuất PHB (Jiang *et al.*, 2023). Trên thế giới, các nghiên cứu nhằm tăng năng suất tạo nhựa như nghiên cứu tạo dòng một số vi khuẩn như *Azotobacter vinelandii*, *Ralstonia eutropha* và tối ưu hóa môi trường cho vi khuẩn tạo nhựa PHB được thực hiện tại Nepal (Thapa *et al.*, 2018). Tại Việt Nam, có nhiều nghiên cứu thành công đã được công bố mang lại nhiều hiệu quả tích cực và là nền tảng cho các nghiên cứu sau này như: Phạm Thanh Hà và đồng tác giả (2018) đã nghiên cứu tạo đột biến vi khuẩn *Alcaligenes latus* để nâng cao hoạt tính sinh học và đã khảo sát thành công điều kiện lên men thúc đẩy sự tích lũy PHB (Phạm Thanh Hà *et al.*, 2008; Đoàn Văn Thước và Lưu Thị Hối, 2015). Trong đó, Nguyễn Thành Luân và đồng tác giả (2018) đã nghiên cứu phân lập một số vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nhựa sinh học từ đất và thực vật tại tỉnh Bình Dương, phát hiện loài *R. gallicum* là vi khuẩn cố định đạm mới được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp nhựa sinh học PHB với hiệu suất cao 39,84% so với sinh khối khô (Nguyễn Thành Luân *et al.*, 2018). Đây là vi khuẩn tiềm năng trong nghiên cứu ứng dụng sản xuất nhựa PHB tại Việt Nam. Sau khi được phát triển, vi khuẩn *R. gallicum* đã được gây đột biến bằng tia UV thành vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 với khả năng tạo nhựa PHB đạt năng suất 56,97% PHB/trọng lượng khô tế bào (Nguyễn Thành Luân và Trần Mỹ Hiếu, 2019). Việc nghiên cứu tạo dòng *Massilia* sp. UMI-121 chuyển gen mang enzyme sinh tổng hợp PHB vào vi khuẩn *E.coli* DH5 $\alpha$  bằng vector mang gen pETDuet1-*phaA2phaB1-phaC1* và pETDuet1-*phaA2phaB1-phaC1-vgb* cho hiệu suất thu hồi nhựa PHB hơn 213,30%, khối lượng thô hơn 117,42% và 44,09% kết cấu so với chủng gốc chưa chuyển gen (Jiang *et al.*, 2023). Công nghệ chuyển gen ở vi khuẩn là một bước tiến giúp tạo ra các chủng tái tổ hợp mới an toàn và

hiệu quả cao hơn. Việc sử dụng công nghệ tạo dòng có thể nhân lên một số lượng lớn trong tế bào chủ với tốc độ nhanh nhờ thể truyền có thể là plasmid, phage và cosmid cũng như các nhiễm sắc thể (NST) nhân tạo đặc biệt ở vi khuẩn có khả năng tái tổ hợp mạng như *E.coli DH5α* (Lathwal *et al.*, 2018). Các vector tái tổ hợp được chuyển vào tế bào vật chủ để tăng khả năng sao chép DNA tái tổ hợp thành nhiều bản sao, nhờ một số vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium*, đặc biệt là vi khuẩn *E. coli* vì cấu trúc di truyền của chúng khá đơn giản, dễ dàng mang gen ngoại lai (Obterbaan *et al.*, 2018). Vì vậy, nghiên cứu này nhằm tạo dòng vi khuẩn *E. coli* DH5α tái tổ hợp mang gen *phbC* tổng hợp nhựa poly-β hydroxybutyrate (PHB) từ vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 đột biến bằng tia UV nhằm lưu giữ và kiểm tra khả năng sản xuất nhựa sinh học PHB từ chủng vi sinh. Nghiên cứu tạo ra các dòng *E. coli* DH5α tái tổ hợp mang gen tổng hợp PHB để mang lại hiệu suất cao, góp phần làm phong phú thêm nguồn giống vi sinh vật có khả năng sản xuất nhựa PHB cao trong nền công nghiệp nhựa sinh học thay thế.

**NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Nguyên liệu**

Vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 được sử dụng trong nghiên cứu mang gen *phbC*-mã hóa enzyme tổng hợp nhựa PHB được gây đột biến bằng tia UV trong 40 phút từ nghiên cứu của Nguyễn Thành Luân và đồng tác giả (2019). Quá trình tăng sinh vi khuẩn *R. gallicum* M40.1. được thực hiện trên môi trường YEM cải tiến trong 24 giờ ở 28°C, 150 vòng/phút để thu nhận mật độ tế bào khoảng 10<sup>9</sup> CFU/mL. Vi khuẩn *E. coli* DH5α được dùng làm tế bào chủ, cho các quy trình tạo dòng gen *phbC*, được tăng sinh trên môi trường LB (Luria Bertani Broth, Himedia, Ấn Độ) trong 24 giờ ở 37°C, 120-150 vòng/phút. Hai plasmid pBR322 và pBluescript (Thermo fisher, Mỹ) làm vector chuyển gen. Enzyme cắt giới hạn sử dụng trong quá trình cắt plasmid, lựa chọn dựa trên bản đồ trình tự plasmid pBR322 và Bluescript là *EcoRI* (10U) và *HindIII* (10U) (Bioline, Đức). Cặp mồi dùng để khuếch đại gen *phbC* từ vi khuẩn *R. gallicum* được thiết kế dựa trên trình tự bảo tồn genome vi khuẩn *R. gallicum* (GI: CP006877) chứa gen *phbC* dựa trên việc sử dụng công cụ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), công cụ Primer Blast được dùng để thiết kế primer dựa trên trình tự FASTA của gen *phbC* để khuếch đại chuyên biệt gen *phbC*. Bên cạnh đó, công cụ Oligo analyzer-IDT (www.idtdan.com) được dùng để kiểm tra các thông số của mồi. Cặp mồi thiết kế có trình tự nhận biết của enzyme *HindIII* tại đầu 5' của mỗi xuôi và *EcoRI* tại đầu 5' của mỗi ngược từ thiết kế trên NEBCutter (New England Biolabs, Anh) (Bảng 1). Plasmid vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 được tách chiết bằng phương pháp Jiang và đồng tác giả cải tiến từ phương pháp của Chen và Kuo năm 1993 (Jiang *et al.*, 2023) . Sau khi tách chiết, DNA được đo mật độ quang ở các bước sóng 260nm, 280nm và tính tỷ lệ OD<sub>260nm</sub>/ OD<sub>280nm</sub> để xác định độ tinh sạch. Nồng độ DNA được tính toán theo công thức: C<sub>DNA</sub>(μg/μL)=OD<sub>260nm</sub> x 50 x nồng độ pha loãng.

**Bảng 1. Trình tự cặp mồi F-phbC/R-phbC**

Vi khuẩn	Tên mồi	Gen	Trình tự Nucleotide (5' → 3')	Tm (°C)	Kích thước sản phẩm PCR	Nghiên cứu
<i>R.gallicum</i> M40.1	F- <i>phbC</i>	<i>phbC</i>	AAGCTTTTATGTCCGCTCCATGAC	63.5	1000 bp	Tự thiết kế theo Primer BLAST
	R- <i>phbC</i>		GAATTCGTGACCGACAGCAAGCAG	70.4		

**Phương pháp nghiên cứu**

**Biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn E. coli DH5α**

Phương pháp hóa biến nạp và phương pháp sốc nhiệt (Thapa *et al.*, 2018) được sử dụng để plasmid pBR322 và pBluescript vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5α được nuôi cấy lỏng lác qua đêm ở 37°C, 120-150 vòng/phút. Sinh khối được đo OD ở 600 nm đạt giá trị 0.4-0.6, sau đó tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút sau đó được bổ sung 1 mL CaCl<sub>2</sub> 100 mM và ủ trong đá -20°C 15 phút. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại tương tự với quy trình khảo sát ủ trên đá lần lượt ở 30 phút và 1 giờ. Lượng tủa thu nhận được hoà tan bằng 50 μL hỗn hợp Glycerol:CaCl<sub>2</sub> 100 mM lạnh theo tỷ lệ 1:4, tiếp tục làm lạnh nhanh tế bào khả biến bằng nitơ lỏng và bảo quản ở -80 °C. Dịch tế bào khả biến được đem rã đông và bổ sung vào 1μL plasmid pBR322/pBluescript. Hỗn hợp được mang đi ủ lạnh trong 2 phút kết hợp với ủ nhiệt nhanh ở 42°C trong 45 giây, sau đó lặp lại ủ lạnh nhanh tế bào trong 2 phút. Dịch tăng sinh thu được trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 1 giờ, sau đó trải dịch trên môi trường LB-agar chứa Ampicillin ở nồng độ 100 μg/mL. Khuẩn lạc biểu hiện mang gen biến nạp được đánh giá và kiểm tra sau 24 giờ trên môi trường.

**Tách chiết DNA plasmid của vi khuẩn E.coli và DNA vi khuẩn R. gallicum M40.1**

Phương pháp ALS (Jiang *et al.*, 2023) được sử dụng với quy trình tách chiết DNA từ vi khuẩn *E. coli* cải tiến (Jiang *et al.*, 2023) đã biến nạp được tăng sinh trong môi trường LB lỏng trong 24 giờ ở 37°C, nuôi cấy lỏng lác 120-150 vòng/phút. Sinh khối vi khuẩn sau tăng sinh được ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 2 phút ở 20°C nhằm thu nhận sinh khối. Sinh khối được bổ sung 150 μL ALS-I kết hợp vortex mẫu để cho sinh khối tan ra. Hỗn hợp mẫu được trộn đều 4-5 lần với 300 μL ALS-II, 225 μL ALS-III; sau đó hỗn hợp được đem đi ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 20°C thu dịch nổi. Dịch nổi được bổ sung thêm 300μL isopropanol và tiến hành ly tâm

13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 20°C thu vủa. Vủa đợc bổ sung thêm 700 µL Ethanol 70% lạnh và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C để thu vủa nhận plasmid và bảo quản với 50 µL nước cất vô trùng trong -20°C. Phương pháp SDS - kiểm cải tiến (Thapa *et al.*, 2018) đợc ứng dụng tương tự như phương pháp ALS tuy nhiên phương pháp này sử dụng thêm một số hóa chất như RNAase, phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1), chloroform/isoamylalcohol, isopropanol và thời gian ủ tách thực hiện kéo dài hơn. Mẫu DNA plasmid sau khi đợc tách bằng 2 phương pháp đem điện di ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút, gel agarose 1.5% với thang ladder 1k bp của IDT (Integrated DNA Technologies, Mỹ).

**Khuếch đại trình tự gen *phbC* bằng kỹ thuật PCR**

Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu đợc thử nghiệm khả năng khuếch đại vùng DNA khuôn bằng phản ứng PCR 35 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính ban đầu (95°C trong vòng 5 phút), giai đoạn khuếch đại 35 chu kỳ (gồm các bước biến tính: 95°C trong 1 phút, gắn mồi: 60°C trong 1 phút, kéo dài mồi: 72°C trong 2 phút), giai đoạn kéo dài cuối cùng (72°C trong 10 phút), ủ và bảo quản (ở điều kiện 4°C). Thành phần phản ứng PCR trong tổng thể tích 25 µL gồm: 12.5 µLPfu polymerase mix (2X), 1 µL F-*phbC* (25 pmol/µL), 1 µL R-*phbC* (25 pmol/µL), 5 µL DNA và 5.5 µL nước cất vô trùng. Sau đó sản phẩm PCR đợc điện di trên gel agarose 1.5%, hiệu điện thế 100V, trong 30 phút sử dụng thang chuẩn 1kbp của IDT (Integrated DNA Technologies, Mỹ). Điều kiện phản ứng PCR ở nhiệt độ từ 60°C đến 70°C theo nồng độ tăng dần cách nhau 1°C và nồng độ 15 pmol/µL đến 35 pmol/µL với 5 pmol/µL khác biệt đợc sử dụng để khảo sát các khoảng nhiệt độ bắt cặp và nồng độ mồi tối ưu cho phản ứng PCR. Bộ KIT Jeanta (Phù Sa BioChem, Việt Nam) đợc dùng để tinh sạch sản phẩm PCR để chuẩn bị cho thí nghiệm kiểm tra sản phẩm sau phản ứng.

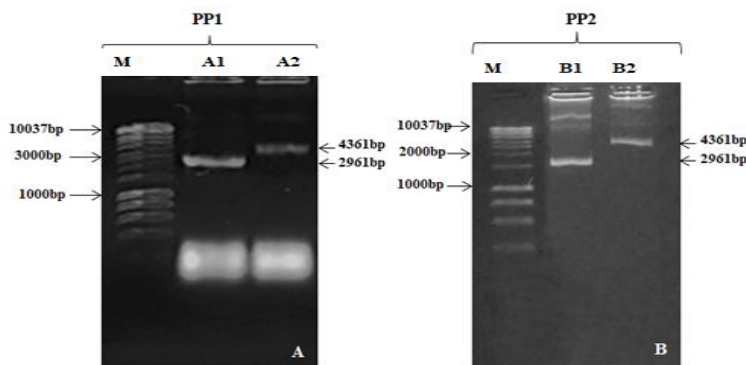
**Tạo vector tái tổ hợp**

Enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *HindIII* (Bioline, Đức) đợc sử dụng để cắt 2 plasmid với thành phần phản ứng cắt như sau: 7 µL plasmid pBluescript/pBR322/sản phẩm PCR, 1µL *EcoRI* (10U), 1 µL *HindIII* (10U), 4 µL Đệm 10X fast digest™ (10X), 7µL nước vô trùng, hỗn hợp trên đợc ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sản phẩm cắt sau đó đợc điện di và kiểm tra kết quả. Phản ứng nối plasmid với sản phẩm PCR gen *phbC* bao gồm 1 µL T4 reaction buffer (10X), 2 µL DNA từ sản phẩm PCR (100 ng/µL), 1 µL sản phẩm plasmid cắt (50 ng), 1U enzyme T4 ligase, 10 µL ddH<sub>2</sub>O. Vector mang gen đợc biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α. Các dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp đợc chọn lọc trên môi trường LB-agar có bổ sung Ampicillin/X-gal/IPT và tiến hành khảo sát khả năng mang gen *phbC* bằng phản ứng PCR khuẩn lạc để kiểm tra độ đặc hiệu.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Tạo dòng tế bào *E. coli* DH5α mang plasmid và khảo sát các phương pháp tách DNA plasmid**

Kết quả tách chiết DNA plasmid pBR322 và pBluescript bằng phương pháp ALS và phương pháp SDS-kiểm (Hình 1A, Hình 1B), sản phẩm tách chiết DNA plasmid pBR322 và pBluescript bằng phương pháp ALS cho sản phẩm tách chiết có nồng độ tương đối cao, band xuất hiện sáng, gọn, tuy nhiên cuối các band xuất hiện vệt sáng đây có thể là RNA hoặc các chất tạp nhiễm tại các giếng A1 và A2 (Hình 1). Sản phẩm tách chiết DNA plasmid pBR322 và pBluescript bằng phương pháp SDS-kiểm cho sản phẩm tách chiết có nồng độ cao, band xuất hiện sáng, gọn, các band chỉ có plasmid không xuất hiện RNA hay các chất tạp nhiễm tại các giếng B1 và B2 (Hình 1). Từ 2 phương pháp tách chiết DNA plasmid trên, phương pháp SDS-kiểm đợc đánh giá thu nhận nồng độ DNA cao hơn, không còn RNA trong sản phẩm tách chiết. Do đó, phương pháp này để tách chiết plasmid để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

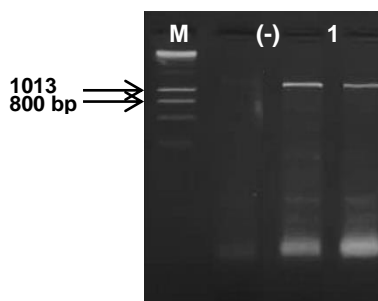


**Hình 1. Kết quả điện di tách plasmid bằng phương pháp ALS (A) và SDS-kiểm (B)**

Trong đó: M là ladder; giếng A1, A2: Lần lượt là plasmid pBluescript/pBR322 tách bằng phương pháp ALS; giếng B1, B2: Lần lượt là plasmid pBluescript/pBR322 tách bằng phương pháp SDS-kiểm.

### Khuếch đại trình tự gen *phbC* bằng kỹ thuật PCR

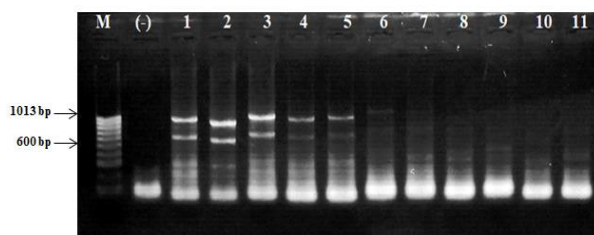
Qua quan sát kết quả chạy điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen *phbC* với cặp mồi thiết kế F-*phbC*/R-*phbC*, các giếng 1, 2 đều có vạch sáng với kích thước đúng như thiết kế ban đầu (Hình 2). Đối với giếng ĐC(-) vì không cho kết quả chứng tỏ phản ứng diễn ra bình thường. Ngoài ra, cuối band điện di còn xuất hiện vết sáng nhỏ hơn 50 bp đây có thể là mồi dư, mồi bắt cặp chéo tạo dimer primer. Kết quả thử nghiệm cho thấy mồi F-*phbC*2/R-*phbC*2 thiết kế được sử dụng trong nghiên cứu này có khả năng khuếch đại gen *phbC* với kích thước 1000 bp.



**Hình 2.** Sản phẩm PCR với mồi F- *phbC*2/ R- *phbC*2 khuếch đại gen *phbC*

Trong đó: Giếng M là ladder 100bp, giếng (-): Đối chứng âm, giếng 1,2 : Sản phẩm PCR.

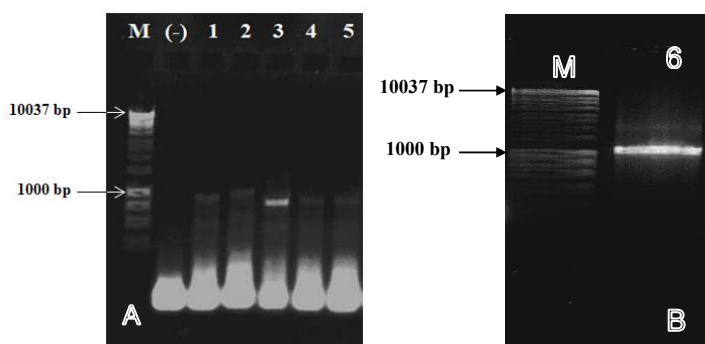
Nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi F-*phbC*/R-*phbC* được khảo sát trong khoảng từ 60-70°C, sản phẩm PCR chỉ xuất hiện các nhiệt độ từ 60°C- 65°C, đặc biệt ở nhiệt độ 62°C cho kết quả sản phẩm PCR sáng rõ nhất (Hình 3). Do đó, ngưỡng nhiệt độ được chọn lọc cho tối ưu phản ứng PCR khuếch đại trình tự gen *phbC* ở 62°C được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 3.** Kết quả khảo sát phản ứng PCR với nhiệt độ bắt cặp mồi F-*phbC*2/R-*phbC*2

Trong đó: M là ladder 100bp; Giếng (-): Giếng đối chứng âm; Giếng 1 -> 11: Mẫu PCR khuếch đại ở nhiệt độ gắn mồi từ 60-70°C.

Sản phẩm PCR đơn mồi khuếch đại DNA vi khuẩn *R. gallicum* ở nồng độ mồi khác nhau (Hình 4). Các giếng từ 1-5 đều xuất hiện band có kích thước khoảng 1000bp, phù hợp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến. Các nồng độ bắt cặp 15 pmol/μL, 20 pmol/μL, 25 pmol/μL, 30 pmol/μL, 35 pmol/μL đều cho kết quả phù hợp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến. Trong đó nồng độ 25 pmol/μL cho kết quả tốt nhất. Trong đó, giếng 3 tương ứng với nồng độ 25 pmol/μL xuất hiện vạch band sáng nhất, các giếng còn lại các band xuất hiện mờ hơn. Do đó nồng độ 25 pmol/μL được chọn là nồng độ mồi tối ưu cho những phản ứng PCR tiếp theo chọn lọc DNA và vector cho phản ứng tái tổ hợp (Hình 4).



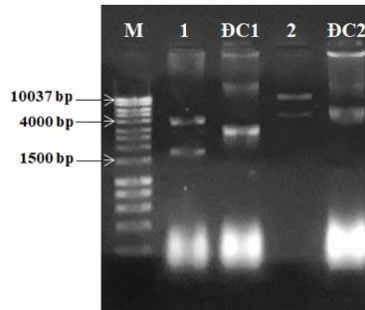
**Hình 4.** Kết quả điện di khảo sát nồng độ mồi F-*phbC*/R-*phbC* cho phản ứng PCR và kết quả tinh sạch PCR

Trong đó: Giếng M: Thang 1k bp; Giếng (-): Đối chứng; Giếng 1 - 5 tương ứng nồng độ 15 pmol/μL, 20 pmol/μL, 25 pmol/μL, 30 pmol/μL, 35 pmol/μL (A); Giếng 6: Kết quả khuếch đại PCR sản phẩm từ khuẩn lạc *E.coli* (B).

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch xuất hiện band có kích thước khoảng 1000 bp phù hợp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến (Hình 5). Các band xuất hiện sáng, rõ nét, không còn tạp chất, dimer- primer dưới band chứng tỏ sản phẩm PCR đã được tinh sạch hoàn toàn từ kết quả có thể nhận thấy đã khuếch đại thành công sản phẩm vector với primer đặc hiệu. Mỗi thiết kế được kiểm nghiệm cho những nghiên cứu về vector trong tương lai.

### Tạo vector tái tổ hợp

Thí nghiệm này thực hiện phản ứng cắt kết hợp cùng một lúc 2 vị trí cắt là *Hind*III và *Eco*RI nên sản phẩm tạo ra có 2 mảnh phân cắt. Kết quả điện di cho thấy plasmid đã cắt hoàn toàn, plasmid đã được mở vòng thành 2 mạch thẳng tương ứng 2 mảnh DNA mở vòng ở kích thước 4000 bp và 1500 bp (Giếng 1) và hơn 4000 bp cùng 8000 bp (giếng 2). Plasmid pBR322 và pBluescript được cắt thành công bằng *Hind*III và *Eco*RI (Hình 5). Tuy nhiên, để đánh giá trình tự của đoạn DNA plasmid được cắt thành công hay không cần phải được đánh giá qua kết quả của giải trình tự sinh học và phân tích trình tự của vector. Kết quả so với đối chứng (ĐC1 và ĐC2) cho thấy việc cắt bằng 2 enzyme *Eco*RI và *Hind*III có hiệu quả ở pBluescript và pBR322 thành 2 mảnh riêng biệt.

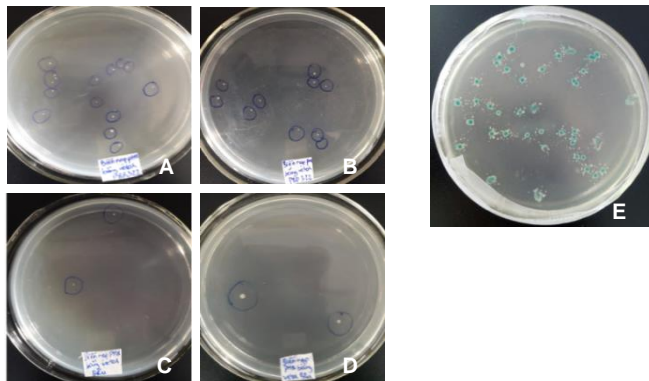


Hình 5. Kết quả phản ứng cắt 2 plasmid pBR322 và pBluescript

Trong đó: Giếng M: Thang 1kbp, giếng 1: Sản phẩm cắt của plasmid pBluescript, giếng ĐC 1: Plasmid pBluescript, giếng 2: Sản phẩm cắt của pBR322, giếng ĐC 2: Plasmid pBR322.

### Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α

Biến nạp vector pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* vào vi khuẩn *E.coli* DH5α khả biến được thực hiện tương tự với plasmid chưa tái tổ hợp làm đối chứng. Kết quả vi khuẩn *E.coli* chứa 2 vector pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* đều cho toàn khuẩn lạc trắng khác biệt về màu sắc trên môi trường LB-agar/Ampicillin/X-gal/IPTG chứng tỏ các khuẩn lạc đều mang plasmid tái tổ hợp so với chủng đối chứng với plasmid chưa tái tổ hợp có khuẩn lạc màu xanh đặc trưng trên môi trường cảm biến (Hình 7).

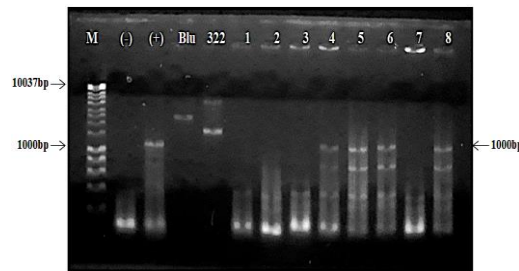


Hình 6. Hình vi khuẩn *E. coli* biến nạp vector pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* trên môi trường chứa Ampicillin/X-gal/IPTG

Trong đó: Hình A, B: Khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* biến nạp vector pBR322-*phbC*, hình C, D: Khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* biến nạp vector pBluescript-*phbC*, hình ĐC: Khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* biến nạp plasmid chưa tái tổ hợp.

Sản phẩm PCR khuẩn lạc biến nạp vector pBluescript-*phbC* (giếng 5-8) ở giếng 5, 6, 8 xuất hiện sản phẩm PCR, kích thước khoảng 1000 bp phù hợp với kích thước gen *phbC* cần được phân tích trình tự qua giải mã trình tự sản phẩm khuếch đại sau đó (Hình 7). Việc biến nạp được kiểm tra lặp lại với các khuẩn lạc đơn lẻ trên môi trường kiểm định chứa Ampicillin/X-Gal/IPTG cho thấy việc thu nhận chủng biến nạp với 2 vector pBluescript và pBR322 không cho hiệu quả đặc hiệu ở phản ứng này so với đối chứng dương (được chứng minh có hiệu quả với 2 vector này trên vi khuẩn *E.coli* DH5α). Kết quả trên các giếng thực tế cho thấy biểu hiện quá trình bất cặp của gen so với ĐC (+) cho kết quả khả quan trên các khuẩn lạc nuôi cấy nghi ngờ có mang plasmid pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* (Giếng 4, 5, 6 và 8). Việc nghiên cứu các vector đặc hiệu hơn cũng như tìm những enzyme

cắt giới hạn hiệu quả hơn được xem xét cho những nghiên cứu tiếp theo. Vi khuẩn *E.coli* DH5 $\alpha$  có nhiều tiềm năng trong việc nghiên cứu lưu giữ các loại gen quý về di truyền với đặc tính vượt trội.



**Hình 7. Sản phẩm PCR khuẩn lạc biến nạp vector pBR322-phbC và pBluescript-phbC**

**Trong đó:** Giếng M: Ladder 1kbp, giếng (-): Đối chứng âm, giếng (+): Đối chứng dương, giếng Blu: Giếng đối chứng dương plasmid pBluescript, giếng 322: Giếng đối chứng dương plasmid pBR322, giếng 1, 2, 3, 4: Sản phẩm PCR khuẩn lạc mang vector pBR322-phbC, giếng 5, 6, 7, 8: Sản phẩm PCR khuẩn lạc mang vector pBluescript-phbC.

## KẾT LUẬN

Vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  ban đầu được chứng minh mang gen biến nạp ở các khuẩn lạc mang plasmid pBR322 và pBluescript từ vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 được chọn lọc trên môi trường LB chứa kháng sinh Ampicillin (100  $\mu$ g/mL) nhưng chưa biểu hiện ở đoạn DNA đặc hiệu. DNA tái tổ hợp từ vi khuẩn tạo dòng có hiện diện của gen *phbC* trong vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp, các gen này chưa được biểu hiện ở tế bào vật chủ. Nghiên cứu đã đánh giá với cặp môi tự thiết kế F-*phbC*/R-*phbC* có hiệu quả ở nhiệt độ 60-65 $^{\circ}$ C với 62 $^{\circ}$ C có biểu hiện tốt nhất, nồng độ môi tối ưu ở 25 pmol/ $\mu$ L và enzyme đặc hiệu với *Eco*RI và *Hind*III có khả năng cắt giới hạn phân cắt thành 2 đoạn riêng biệt như mong muốn. Nghiên cứu đã lựa chọn được quy trình tách chiết plasmid là phương pháp SDS - kiểm theo quy trình của Thapa và đồng tác giả (2018). Gen *phbC* được khuếch đại và xác định thành công với kích thước khoảng 1000 bp bởi cặp môi F-*phbC*/R-*phbC* bằng phương pháp PCR nhận biết vector tái tổ hợp đã biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$ . Ngoài ra nghiên cứu cần tăng sinh vi khuẩn *E. coli* mang vector tái tổ hợp để tách plasmid, enzyme cắt giới hạn và khuếch đại bằng PCR lặp lại nhiều lần để kiểm tra thêm nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả. Việc đánh giá khả năng tạo nhựa PHB cần được đánh giá ở mức độ tế bào đối với chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* DH5 $\alpha$  nhằm mở ra hướng đi cho những hiệu quả ở quy mô công nghiệp tiếp theo.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Thanh Hà, Trần Đình Mẫn & Tokiwa, Y (2008). Tạo đột biến nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp poly-  $\beta$ - hydroxybutyrate của vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6 (4) 489-496.
- Lathwal P, Nehra KM, Singn M & Rana JS (2018). Characterization of Novel and Efficient Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria Isolated from Rhizospheric Soils. *J Polym Environ* 26 3437 - 3450.
- Đỗ Thị Thanh Huyền, Trần Thị Thùy Anh, Nguyễn Thị Hồng Vân, Nguyễn Quang Huy & Nguyễn Văn Sáng (2017). Tách dòng, biểu hiện và tinh sạch nhân tố phiên mã NF- $\kappa$ B p50 của người trong tế bào vật chủ *E. coli*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 33 (1) 299-304.
- Hungund BS, Umloti SG, Upadhyaya KP, Manjanna J, Yallappa S & Ayachit NH (2018). Development and characterization of polyhydroxybutyrate biocomposites and their application in the removal of heavy metals. *Materials Today Proceedings*. 5 (10) 21023 - 21029. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.06.495>.
- Jiang N, Wang M, Song L, Yu D, Zhou S, Li Y, Li H & Han X (2023). Polyhydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* based on genes related to synthesis pathway of PHB from *Massilia* sp. UMI-21. *Microb Cell Fact* 22, 129. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02142-x>.
- Nguyễn Thành Luân, Nguyễn Minh Chánh, Nguyễn Thị Liên Thương & Nguyễn Thị Quỳnh Mai (2018). Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) từ đất và thực vật tại tỉnh Bình Dương. *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm* 14 (1) 12-19. <https://vjol.info.vn/index.php/hufi/article/view/44844/36228>.
- Nguyễn Thành Luân, Trần Mỹ Hiếu (2019). Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon và nitrogen khác nhau ở mô hình in vitro lên khả năng tổng hợp nhựa sinh học Poly- $\beta$ - hydroxybutyrate (PHB) của dòng vi khuẩn *R. gallicum* M40.1. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 19(1) 50-58.
- Osterbaan LJ, Schmitt-Keichinger C, Vigne E & Fuchs M (2018). Optimal systemic grapevine fanleaf virus infection in *Nicotiana benthamiana* following agroinoculation. *Journal of Virological Methods* 257 16-21.
- Đoàn Văn Thược, Lưu Thị Hồi (2015). Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp Poly (3-Hydroxybutyrate) của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 31 (2) 67-74.
- Thapa C, Shakya P, Shrestha R, Pal S & Manandhar P (2018). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. *Nepal Journal of Biotechnology* 6 (1) 62-68.

## CLONING OF *phbC* GENE FROM *Rhizobium gallicum* M40.1 MUTANT IN *Escherichia coli* FOR POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION

Nguyen Thanh Luan<sup>\*</sup>, Huynh Thi My Trang, Phan Thi Nguyet Anh, Ton Trinh Trinh, Le Thi My Le

Ho Chi Minh City University Of Industry and Trade

### SUMMARY

Poly- $\beta$  hydroxybutyrate (PHB) is a bioplastic belonging to the Poly hydroxyalkanoates (PHAs) group and is stored in bacterial cells in the form of polyester. This study aims to create *Escherichia coli* strain containing *phbC* gene - capable of biosynthesis of PHB from *R. gallicum* M40.1 mutant. The results have been evaluated that F-*phbC*/R-*phbC* primer was designed to amplify *phbC* gene in PCR reaction with the size of 1000 bp. The optimal annealing temperature and concentration of F-*phbC*/R-*phbC* primers in PCR reaction were 62°C and 25 pmol/ $\mu$ L, respectively. The recombinant DNA vector pBR322-*phbC*/pBluescript-*phbC* were successfully transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  bacteria cells, selected transformed positive bacteria on LB medium containing Ampicillin (100  $\mu$ g/mL)/IPTG/X-gal by colony PCR. This research opened the potential of PHB bioplastic production from recombinant genes of microorganisms for synthesizing plastics. Recombinant bacterial strains with PHB synthetic gene create a high capacity and effective potential of research on PHB large scale in new replacable material industry.

**Keywords:** *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , bioplastic, Poly- $\beta$  hydroxybutyrate, PHB, *Rhizobium gallicum*.

---

<sup>\*</sup> Author for correspondence: Tel: 0917577828; Email: luannt@huit.edu.vn



# TỐI ƯU HÓA PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG SINH KHỐI NẤM DỰA TRÊN ERGOSTEROL TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN Ở TRẠNG THÁI RẮN

Dương Hiếu Linh<sup>1</sup>, Dietmar Schlosser<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Đại học Việt Đức (VGU), đường Vành đai 4, khu phố 4, phường Thới Hòa, thành phố Bến Cát, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Sinh thái Vi sinh vật Ứng dụng, Trung tâm Nghiên cứu môi trường Helmholtz - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Đức

## TÓM TẮT

Một thách thức lớn trong các quá trình lên men ở trạng thái rắn có liên quan đến sự phát triển/lớn lên không đồng nhất của vi sinh vật trên chất nền rắn, dẫn đến những khó khăn đáng kể trong việc kiểm soát và tối ưu hóa quá trình. Một trở ngại khác là do nấm liên kết chặt chẽ với chất nền và sợi nấm xâm nhập vào vật liệu rắn nên chúng không thể được cân độc lập với chất nền, khiến cho việc xác định trực tiếp trọng lượng khô của sinh khối nấm gần như không thể. Vì việc sử dụng kỹ thuật trực tiếp là không thực tế nên việc sử dụng kỹ thuật ước lượng gián tiếp là lựa chọn thay thế duy nhất. Trong số các kỹ thuật ước lượng gián tiếp, ergosterol đã được chứng minh là một chỉ số phù hợp và nhạy cảm để định lượng sinh khối của nấm sợi. Quá trình phân tích ergosterol được thực hiện theo ba bước: (I) thủy phân và xà phòng hóa mẫu để giải phóng ergosterol khỏi màng huyết tương, (II) chiết xuất ergosterol, và (III) định lượng ergosterol. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kiểm nghiệm các thông số cần thiết trong quá trình chiết xuất ergosterol cho việc định lượng sinh khối nấm trong quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm *Stachybotrys chlorohalonata* (ascomycete). Các thông số khảo sát bao gồm thể tích toluene cần cho việc chiết xuất và số lần chiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng 100 mg mẫu rắn (khô) được chiết xuất với 2 mL toluene (có chứa thêm 125  $\mu$ M phenanthrene (nồng độ cuối cùng) làm chất chuẩn nội) là đủ cho việc định lượng sinh khối nấm. Sinh khối nấm có thể cung cấp những thông tin giá trị cho các nghiên cứu công nghệ sinh học cũng như nghiên cứu sinh thái khi được kết hợp với các thông số khác.

**Từ khóa:** Định lượng sinh khối nấm, ergosterol, kiểm soát và tối ưu hóa quá trình, kỹ thuật ước lượng gián tiếp, lên men ở trạng thái rắn

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm có thể chuyển đổi trực tiếp chất thải từ nông nghiệp và lâm nghiệp thành các hóa chất hữu ích, chất hoạt động bề mặt sinh học, vật liệu composite, và năng lượng sinh học trong khuôn khổ ứng dụng tinh chế sinh học hoặc đơn giản được sử dụng để sản xuất nấm (Duong, 2024). Mặc dù quá trình này mang lại những lợi ích lớn nhưng nó vẫn đặt ra những thách thức đáng kể về mặt giám sát và kiểm soát quá trình (Mondala, 2015; Steudler and Bley, 2015a). Một thách thức lớn trong các quá trình lên men ở trạng thái rắn có liên quan đến sự phát triển/lớn lên không đồng nhất của vi sinh vật trên chất nền rắn, dẫn đến những khó khăn đáng kể trong việc kiểm soát và tối ưu hóa quá trình (Mondala, 2015; Raimbault, 1998; Steudler and Bley, 2015a). Một thách thức khác là do sự gia tăng nhiệt độ cục bộ, gây phá hủy các sản phẩm nhạy cảm với nhiệt như enzyme do biến tính nhiệt (Altwasser *et al.*, 2017; Muller dos Santos *et al.*, 2004). Do đó, những thách thức đòi hỏi phải phát triển các chiến lược kiểm soát phù hợp, lý tưởng nhất là chỉ dựa trên một hoặc một vài tham số, cho phép mô tả đầy đủ đặc tính của quy trình tổng thể trong thời gian ngắn hợp lý (Raimbault, 1998; Steudler and Bley, 2015a). Hơn nữa, dựa trên đặc tính đã biết của quy trình tổng thể, có thể đưa ra các biện pháp thích hợp liên quan đến thiết kế lò phản ứng và các thông số vận hành (Altwasser *et al.*, 2017).

Một trở ngại khác là do nấm liên kết chặt chẽ với chất nền và sợi nấm xâm nhập vào vật liệu rắn khiến cho việc xác định trực tiếp trọng lượng khô của sinh khối nấm gần như không thể (Mitchell *et al.*, 2004). Vì việc sử dụng kỹ thuật trực tiếp là không thực tế nên việc sử dụng kỹ thuật ước lượng gián tiếp là lựa chọn thay thế duy nhất. Nhiều kỹ thuật ước tính gián tiếp đầy hứa hẹn đã có sẵn, ví dụ như dựa trên định lượng các thành phần đặc hiệu tế bào được tìm thấy trong nấm (ergosterol, glucosamine, chitin, axit nucleic, protein, bào tử) (Steudler and Bley, 2015b). Trong số các kỹ thuật này, ergosterol đã được chứng minh là một chỉ số phù hợp và nhạy cảm để định lượng sinh khối của nấm sợi, đặc biệt là nấm basidiomycetes (Steudler and Bley, 2015a). Ergosterol là sterol có nhiều nhất trong màng sinh chất của sợi nấm và có thể chiếm từ 0,7 đến 1% chất khô của nấm (Steudler and Bley, 2015a). Ergosterol không được tìm thấy trong thực vật, động vật hoặc sinh vật khác và chỉ được tìm thấy với lượng tối thiểu ở một số vi khuẩn, động vật nguyên sinh, vi khuẩn lam và các vi tảo khác (Steudler and Bley, 2015a). Quá trình phân tích ergosterol được thực hiện theo ba bước: (I) thủy phân và xà phòng hóa mẫu để giải phóng ergosterol khỏi màng huyết tương, (II) chiết xuất ergosterol, và (III) định lượng ergosterol (Steudler and Bley, 2015a). Mặc dù ergosterol đã được chứng minh là một chỉ số phù hợp và nhạy cảm để định lượng sinh khối của nấm sợi, các thông số trong quá trình phân tích, đặc biệt là bước chiết xuất ergosterol, vẫn cần được nghiên cứu và kiểm nghiệm để đảm bảo tính chính xác của phương pháp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi kiểm nghiệm các thông số cần thiết trong quá trình chiết xuất ergosterol cho việc định lượng sinh khối nấm trong quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm *Stachybotrys chlorohalonata* (ascomycete). Các thông số khảo sát bao gồm thể tích toluene cần cho việc chiết xuất và số lần chiết. *S. chlorohalonata* là một loại nấm mốc phổ biến trong môi trường với khả năng sản sinh ra các enzyme phân hủy cellulose, trước đây đã được chứng minh là làm giảm hàm lượng lignin trong rơm lúa mì ở một mức độ nào đó bất chấp các hoạt động không thể phát hiện được của các enzyme biến đổi lignin ngoại bào điển hình (Duong, 2024). Loại nấm này là loài phát triển nhanh và liên quan đến các tòa nhà ẩm ướt, thích các chất nền giàu cellulose (ví dụ: giấy dán tường hoặc ván dăm), và thuộc nhóm nấm mốc đen có khả năng sinh độc tố (Duong, 2024). Ngoài ra, tiền xử lý rơm lúa mì hiệu quả bằng *Stachybotrys* sp. đã được quan sát (Singh *et al.*, 2014).

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Tất cả các hóa chất đều thuộc loại dùng cho phân tích (cấp gradient trong trường hợp dung môi sắc ký). Tất cả các hóa chất được mua từ Merck, Sigma-Aldrich và Th. Geyer GmbH (Renningen, Đức).

#### Nuôi cấy nấm trên rơm lúa mì

*Stachybotrys chlorohalonata* A-2008-2 (DSM 27588) là loài nấm được dùng cho nghiên cứu, thu được từ bộ sưu tập của Khoa Sinh thái Vi sinh vật Ứng dụng tại Trung tâm Nghiên cứu Môi trường Helmholtz - UFZ (Leipzig, Đức). Chủng nấm này cũng có sẵn tại Bộ sưu tập Vi sinh vật và Nuôi cấy Tế bào Đức (DSMZ; Braunschweig, Đức). Chủng nấm được duy trì trên đĩa thạch chiết xuất mạch nha 2% (w/v) (thạch 1,5%; pH 5,7) ở 28°C trong bóng tối. Nuôi cấy nấm trên rơm lúa mì đã được mô tả chi tiết trong luận án của Duong (2024). Tóm lại, thí nghiệm được thực hiện trong lọ polypropylene. Các lọ được trang bị nắp vặn màng thông hơi (màng PTFE có đường kính 25 mm và độ xốp 0,2 µm, Whatman/GE Healthcare, Đức). Để cấy nấm, các phần thạch (được lấy từ các cạnh của cụm nấm mọc trên đĩa thạch mạch nha) được đồng nhất hóa trong môi trường chiết xuất mạch nha 2% (một phần thạch trên 1 mL môi trường chiết xuất mạch nha) với sự trợ giúp của Ultra-Turrax (Staufen, Đức). Sau đó, 0,5 mL huyền phù nấm thu được được sử dụng để cấy vào 0,5 g rơm lúa mì đã được cắt nhỏ và hấp khử trùng. Rơm lúa mì (đã được cắt nhỏ) không được xử lý bằng bất cứ phương pháp nào được dùng làm đối chứng. Tất cả các mẫu được thực hiện ba lần và ủ ở 28 °C trong 14 ngày. Mẫu sau khi ủ đã được lưu trữ ở -20 °C, sau đó được làm sạch bằng 0,1 M McIlvaine buffer (pH 7,0). Phần chất rắn sau đó được làm khô ở 50 °C trong 48 giờ.

#### Xác định sinh khối nấm dựa trên hàm lượng ergosterol

Phần chất rắn sau khi được làm khô ở trên được đồng nhất bằng máy nghiền bi (Pulverisiette 23; Fritsch, Idar-Oberstein, Đức) ở tốc độ 50 oscillations mỗi giây trong 5 phút và được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong điều kiện khô ráo trong bóng tối cho đến khi phân tích sâu hơn về hàm lượng ergosterol (dấu ấn sinh học để xác định sinh khối nấm).

Để xác định hàm lượng ergosterol của nấm, các mẫu đồng nhất rắn (100 mg) được trộn với 1 mL nước khử ion (Q-Gard 2, Millipore, Schwalbach, Đức), 0,5 g KOH, 5 mL methanol, và 1,25 mL ethanol trong ống ly tâm 50-mL (VWR International, Darmstadt, Đức). Sau đó, các ống này được ủ trong điều kiện lắc nhẹ liên tục trong bể nước ở nhiệt độ 70 °C trong 30 phút. Sau khi làm nguội và lắng chất rắn, 4 mL chất nổi phía trên được chuyển tương ứng vào ống ly tâm 15 mL (VWR International). Các ống 15 mL được bổ sung toluene (độ tinh khiết cấp HPLC/UPLC), có chứa thêm 125 µM phenanthrene (nồng độ cuối cùng) làm chất chuẩn nội để cho phép hiệu chỉnh dữ liệu về sự bay hơi dung môi. Quá trình chiết ergosterol được thực hiện trong điều kiện lắc ở tốc độ 150 nhịp/phút trong 1 giờ, sử dụng máy lắc ngang GFL 3018 (Burgwedel, Đức). Sau khi lắc, các ống được để yên cho đến khi đạt được sự tách pha đủ. Sau đó, pha trên (toluene) được chuyển vào lọ UPLC và được bảo quản ở -20 °C cho đến khi thực hiện phân tích sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) bằng hệ thống UPLC. Hai trường hợp thí nghiệm sau đây đã được kiểm nghiệm:

- Trường hợp 1: Trích xuất lần một với 1 mL toluene, sau đó trích xuất thêm lần hai với 1 mL toluene.
- Trường hợp 2: Trích xuất lần một với 2 mL toluene, sau đó trích xuất thêm lần hai với 1 mL toluene.

Để phân tích UPLC về ergosterol, các mẫu (3,3 µL) được đưa vào hệ thống Acquity™ UPLC được trang bị cột Acquity™ UPLC BEH C18 (cỡ hạt 1,7 µm; 2,1 x 50 mm; Waters, Eschborn, Đức) (nhiệt độ cột 40 °C). Dung dịch rửa giải A bao gồm 10% (v/v) methanol (loại gradient; Roth, Đức) trong nước khử ion (Q-Gard 2) và dung dịch rửa giải B là methanol. Cấu hình rửa giải sau đây đã được áp dụng: rửa giải đẳng cấp ở 30% B trong 0,14 phút, tăng tuyến tính lên 99,9% B cho đến 2,6 phút, rửa giải đẳng cấp ở 99,9% B cho đến 3,3 phút, giảm tuyến tính xuống 30% B cho đến 3,35 phút và rửa giải đẳng cấp ở mức 30% B cho đến 4 phút (tốc độ dòng 0,5 mL/phút). Bước sóng phát hiện được đặt tại 278 nm. Việc hiệu chuẩn phương pháp được thực hiện bằng cách sử dụng external ergosterol (thời gian lưu khoảng 3,59 phút) và chất chuẩn phenanthrene (thời gian lưu khoảng 2,67 phút).

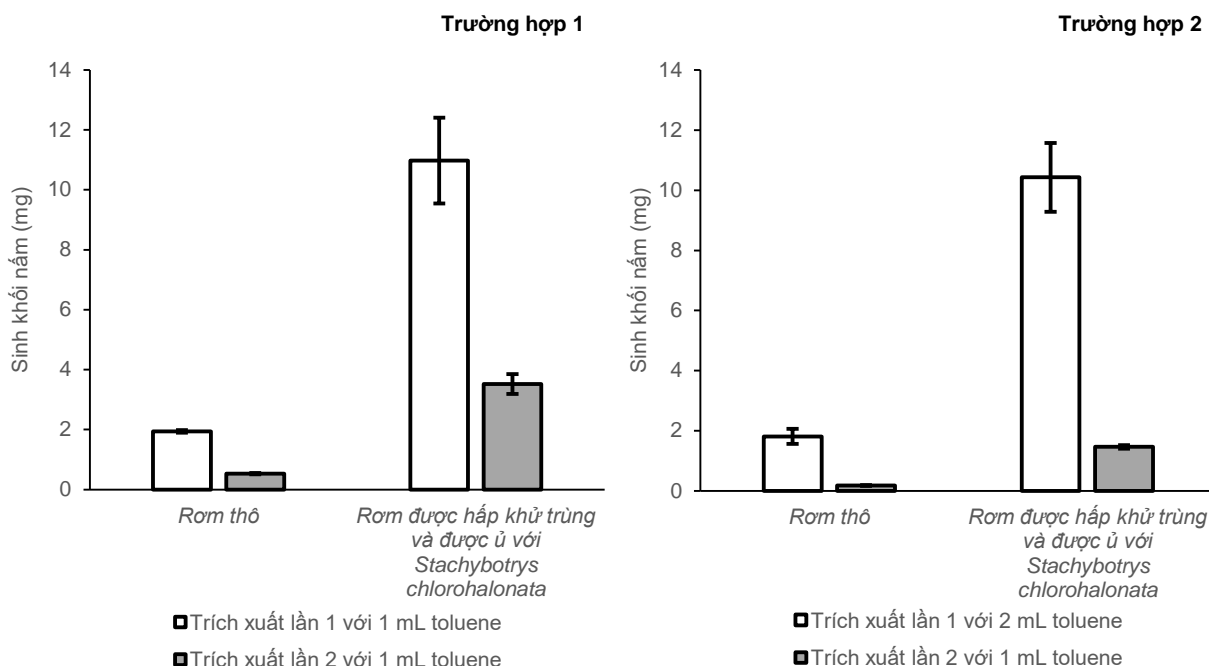
Sinh khối khô của nấm được tính toán dựa trên giá trị được báo cáo là 5,4 mg ergosterol trên g sinh khối khô của nấm (Klamer, Baaht, 2004).

**Phân tích thống kê**

Các ngoại lệ (outlier) trong số các bộ dữ liệu ba lần được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Dean-Dixon. Bài kiểm tra f-tests và Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 (phiên bản 15.0.5327.1000).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Hình 1 và Bảng 1 trình bày sinh khối nấm (mg) được tính toán dựa trên ergosterol và được trích xuất từ 100 mg trọng lượng khô của rơm thô (không được xử lý bằng bất cứ phương pháp nào) hoặc rơm được hấp khử trùng và được ủ với *S. chlorohalonata* cho hai trường hợp được kiểm nghiệm. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng lượng sinh khối nấm trích xuất từ lần hai luôn thấp hơn so với lượng sinh khối được chiết xuất ở lần một, và sinh khối nấm của rơm được ủ với *S. chlorohalonata* luôn cao hơn so với rơm thô.



**Hình 1. Sinh khối nấm (mg) được tính toán dựa trên ergosterol cho hai trường hợp thí nghiệm**

**Bảng 1. Sinh khối nấm (mg) được tính toán dựa trên ergosterol cho hai trường hợp thí nghiệm**

		Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trường hợp 1	Trích xuất lần một với 1 mL toluene	1,9 ± 0,04	11,0 ± 1,43
	Trích xuất lần hai với 1 mL toluene	0,5 ± 0,02	3,5 ± 0,33
Trường hợp 2	Trích xuất lần một với 2 mL toluene	1,8 ± 0,25	10,4 ± 1,15
	Trích xuất lần hai với 1 mL toluene	0,2 ± 0,01	1,5 ± 0,06

Kết quả f-tests (Bảng 2) cho thấy Student's t-tests với phương sai bằng nhau nên được áp dụng ( $P > 0,05$ ). Kết quả Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi (Bảng 3) cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa việc trích xuất lần một với 1 mL toluene (trường hợp 1) hay 2 mL toluene (trường hợp 2) ( $P > 0,05$ ). Tuy nhiên, ở lần trích xuất thứ hai, sinh khối nấm thu được đã có sự khác biệt đáng kể giữa hai trường hợp ( $P < 0,05$ ). Ngoài ra, trường hợp 1 cho thấy rằng lượng sinh khối thu được ở lần trích xuất thứ hai khoảng từ 27,4 đến 32,1% so với lần trích đầu tiên, trong khi đó lượng sinh khối ở lần trích xuất thứ hai của trường hợp 2 chỉ dao động từ 10,0 đến 14,1% so với lần đầu (Bảng 4). Kết quả này cho thấy rằng chỉ với một lần trích xuất với 2 mL toluene (trường hợp 2), hầu hết lượng ergosterol có thể được thu thập. Do đó, các thông số của trường hợp 2 được đề xuất sử dụng cho nghiên cứu trong tương lai.

Phương pháp xác định hàm lượng ergosterol đã được chứng minh là rất chính xác và có thể lặp lại nhưng cũng rất tốn thời gian và công sức (Matcham *et al.*, 1985; Steudler and Bley, 2015a). Steudler and Bley (2015b) đã so sánh các phương pháp khác nhau trong quá trình lên men ở trạng thái rắn của *Trametes hirsute* (basidiomycete) để tìm ra phương pháp phù hợp và chính xác để định lượng sinh khối nấm. Các phép đo hàm lượng ergosterol, số lượng hạt nhân, và hô hấp cho thấy ước tính sinh khối đáng tin cậy nhất (Steudler and Bley, 2015b). Trong

nghiên cứu này, chúng tôi kiểm nghiệm các thông số cần thiết trong quá trình chiết ergosterol cho việc định lượng ergosterol trong quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm *S. chlorohalonata* (ascomycete). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng 100 mg mẫu rắn (khô) được chiết xuất với 2 mL toluene là đủ cho việc định lượng sinh khối nấm. Kết quả của nghiên cứu này cũng hỗ trợ cho các phát hiện trước đây được trình bày bởi Reeslev và đồng tác giả (Reeslev *et al.*, 2003).

Kết quả của nghiên cứu sẽ góp phần vào những nghiên cứu trong tương lai, khi kết hợp với các chỉ số khác (như là dữ liệu đo nhiệt lượng sinh học). Sinh khối nấm đã được chứng minh có sự tương quan chặt chẽ với dữ liệu đo nhiệt lượng sinh học, và chỉ số  $Y_{Q/X}$  (nhiệt trao đổi chất được giải phóng trên mỗi đơn vị sinh khối nấm) có thể được dùng để định lượng sinh khối nấm cho các quá trình lên men ở trạng thái rắn cho đơn loài (Duong, 2024). Xa hơn nữa, chỉ số  $Y_{Q/X}$  có thể được dùng cho các nghiên cứu sinh thái nấm và cho các mục đích công nghệ sinh học (Duong, 2024).

**Bảng 2. Kết quả kiểm tra f-tests được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 khi so sánh kết quả của trường hợp 1 và trường hợp 2**

	Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trích xuất lần một	0,06	0,78
Trích xuất lần hai	0,64	0,06

**Bảng 3. Kết quả kiểm tra Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 khi so sánh kết quả của trường hợp 1 và trường hợp 2**

	Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trích xuất lần một	0,44	0,64
Trích xuất lần hai	0,00001	0,00044

**Bảng 4. Phần trăm trích xuất của lần trích thứ hai so với lần trích đầu tiên. Dữ liệu tính toán được lấy từ Bảng 1. Độ lệch chuẩn được tính toán dựa trên quy tắc lan truyền lỗi Gaussian**

	Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trường hợp 1	27,4 ± 1,10	32,1 ± 5,15
Trường hợp 2	10,0 ± 1,53	14,1 ± 1,64

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã kiểm nghiệm các thông số của quá trình chiết ergosterol, bao gồm số lần chiết và thể tích toluene cần cho quá trình chiết, từ đó có thể định lượng sinh khối nấm trong các quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm. Dựa trên các kết quả kiểm nghiệm, chúng tôi đưa ra kết luận rằng 100 mg mẫu rắn (khô) được chiết xuất với 2 mL toluene (có chứa thêm 125 µM phenanthrene (nồng độ cuối cùng) làm chất chuẩn nội) là đủ cho việc định lượng sinh khối nấm. Kết quả của nghiên cứu sẽ góp phần vào những nghiên cứu trong tương lai và sinh khối nấm có thể cung cấp những thông tin giá trị cho các nghiên cứu công nghệ sinh học cũng như nghiên cứu sinh thái khi được kết hợp với các thông số khác.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin cảm ơn Hauke Harms, Thomas Maskow, Sven Paufler, Madlen Schubert, Stefanie Loth, Claudia Heber, Martina Kolbe, Katrin Lübke, Chau Nguyen, Quynh Nguyen, và Han Nguyen vì sự hỗ trợ tuyệt vời về thực nghiệm và kỹ thuật cũng như hỗ trợ về mặt phương pháp. Chúng tôi cũng chân thành cảm ơn sự tài trợ từ Đề án Đào tạo giảng viên có trình độ tiến sĩ cho các trường đại học, cao đẳng giai đoạn 2010-2020 (Đề án 911) của Chính phủ Việt Nam cho học bổng Tiến sĩ của Dương Hiếu Linh tại Đức. Công trình này được hỗ trợ bởi Hiệp hội các Trung tâm Nghiên cứu Đức Helmholtz trong khuôn khổ Nền tảng Tích hợp "Tapping nature's potential for sustainable production and a healthy environment" tại UFZ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altwaser V, Pätz RR, Lemke T, Paufler S, Maskow T (2017). A simple method for the measurement of metabolic heat production rates during solid-state fermentations using β-carotene production with *Blakeslea trispora* as a model system. *Eng Life Sci* 17, 620–628. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600208>
- Duong HL (2024). Fungal Decomposition of Lignocellulosic Solid Substrates: Applicability and Information Value of Biocalorimetry for Ecological and Biotechnological Research. *PhD dissertation. Faculty of Life Sciences, University of Leipzig, Germany*. Available at: <https://phucvu.thuvientphcm.gov.vn/Viewer/EBook/794048>
- Klamer M, Bååth E (2004). Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2ω6,9. *Soil Biol Biochem* 36, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.019>
- Matcham SE, Jordan BR, Wood DA (1985). Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 21, 108–112. <https://doi.org/10.1007/BF00252371>

- Mitchell DA, Von Meien OF, Krieger N, Dalsenter FDH (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 17, 15–26. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00120-7)
- Mondala AH (2015). Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42, 487–506. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1575-4>
- Muller dos Santos M, Souza Da Rosa A, Dal'Boit S, Mitchell DA, Krieger N (2004). Thermal denaturation: Is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresour Technol* 93, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.007>
- Raimbault M (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechnol* 1, 174–188. <https://doi.org/10.2225/vol1-issue3-fulltext-9>
- Reeslev M, Miller M, Nielsen KF (2003). Quantifying mold biomass on gypsum board: Comparison of ergosterol and beta-N-acetylhexosaminidase as mold biomass parameters. *Appl Environ Microbiol* 69, 3996–3998. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3996-3998.2003>
- Singh S, Harms H, Schlosser D (2014). Screening of ecologically diverse fungi for their potential to pretreat lignocellulosic bioenergy feedstock. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 3355–3370. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5563-4>
- Stuedler S, Bley T (2015a). Better one-eyed than blind—Challenges and opportunities of biomass measurement during solid-state fermentation of basidiomycetes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 149, 223–252. [https://doi.org/10.1007/10\\_2014\\_300](https://doi.org/10.1007/10_2014_300)
- Stuedler S, Bley T (2015b). Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. *Bioprocess Biosyst Eng* 38, 1313–1323. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1372-0>

## OPTIMIZATION OF A METHODOLOGY FOR THE QUANTIFICATION OF FUNGAL BIOMASS BASED ON ERGOSTEROL IN SOLID-STATE FERMENTATION PROCESSES

Duong Hieu Linh<sup>1\*</sup>, Dietmar Schlosser<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vietnamese-German University (VGU), Ring Road 4, Quarter 4, Thoi Hoa Ward, Ben Cat City, Binh Duong Province, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Applied Microbial Ecology, Helmholtz-Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany

### SUMMARY

A major challenge in solid-state fermentation processes is related to the inhomogeneous microbial growth on solid substrates, leading to significant difficulties in process control and optimization. Another obstacle is that because fungi bind tightly to the substrate and mycelia penetrate into the solid material, they cannot be weighed independently of the residual substrate, making it almost impossible to determine directly the dry weight of fungal biomass. Since the use of a direct techniques is impractical, the use of an indirect estimation technique is the only alternative. Among the indirect estimation techniques, ergosterol has been shown to be a suitable and sensitive indicator for quantifying the biomass of filamentous fungi. Ergosterol analysis is performed in three steps: (I) hydrolysis and saponification of the sample to release ergosterol from the plasma membrane, (II) ergosterol extraction, and (III) ergosterol quantification. In this study, we test the necessary parameters in the ergosterol extraction step for the quantification of fungal biomass in solid-state fermentation using the ascomycete *Stachybotrys chlorohalonata*. The parameters include the volume of toluene needed for extraction and the number of extraction times. The results of the study show that 100 mg of solid (dry) sample extracted with 2 mL of toluene (containing an addition of 125 µM phenanthrene (final concentration) as internal standard) is sufficient for the quantification of fungal biomass. Fungal biomass may provide valuable information for biotechnological research as well as ecological research when combined with other parameters.

**Keywords:** Ergosterol, indirect estimation techniques, process control and optimization, quantification of fungal biomass, solid-state fermentation.

\* Author for correspondence: Tel: 0906464666; Email: linh.duong@vgu.edu.vn

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG ENZYME TRONG TÁCH CHIẾT CÁC HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ TRÁI THANH LONG

Nguyễn Phạm Hương Huyền, Phạm Minh Tuấn

Khoa Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Khảo sát ban đầu xây dựng được quy trình trích ly betacyanin từ vỏ thanh long ruột đỏ sử dụng enzyme cellulase và tạo dịch quả giàu lycopene sử dụng enzyme pectinase. Các thông số phù hợp để thu được sản phẩm giàu các chất này được xác định bao gồm: nhiệt độ là 30°C (vỏ) và 50°C (ruột); tỷ lệ enzyme phù hợp là 0,7% w/w (vỏ) và 0,5% w/w (ruột); thời gian ủ là 90 phút (vỏ) và 60 phút (ruột); pH là 6 (vỏ) và 4 (ruột).

*Từ khóa:* Betacyanin, cellulase, lycopene, pectinase, thanh long.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản lượng thanh long những năm gần đây ở Việt Nam đang tăng lên đáng kể. Các giống thanh long mà nước ta đang canh tác hiện nay như thanh long ruột trắng và ruột đỏ. Ở các tỉnh Nam Trung Bộ và Nam Bộ, thanh long ruột trắng được trồng phổ biến, nổi tiếng nhất là ở Bình Thuận – địa phương có diện tích thanh long lớn nhất cả nước.

Thanh long có tên khoa học là *Hylocereus* spp., thuộc họ Xương rồng (*Cactaceae*). Việt Nam là một trong những nước có diện tích và sản lượng thanh long lớn nhất châu Á và cũng là nước xuất khẩu thanh long hàng đầu thế giới. Theo Hiệp hội Rau quả Việt Nam, hiện nay nước ta có 35,665 ha diện tích trồng thanh long với tổng sản lượng đạt khoảng 614,246 tấn (Ánh Dương, 2023). Thanh long ruột đỏ chứa nhiều vitamin C, carbohydrate, chất xơ, betacyanin và polyphenol tốt cho sức khỏe, hạn chế quá trình oxy hóa. Thanh long ruột đỏ được tiêu thụ chủ yếu ở dạng tươi. Chế biến đa dạng hóa sản phẩm giúp nâng cao giá trị kinh tế trái thanh long là điều cần được quan tâm. Tuy nhiên, quá trình thương mại hóa các sản phẩm này gặp nhiều khó khăn do giá thành, chất lượng sản phẩm...

Có các nghiên cứu trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học từ trái thanh long, tập trung nhiều nhất là hai hợp chất betacyanin và lycopene. Betacyanin được tách chiết bằng cách sử dụng dung môi ethanol (Vũ Thị Thanh Đào *et al.*, 2017), phương pháp vi sóng (Đào Thị Mỹ Linh *et al.*, 2020), phương pháp siêu âm kết hợp với enzyme pectinase (Thanh Thị Ha Le *et al.*, 2020). Lycopene được tách chiết trong dịch quả thanh long bằng cách kết hợp nước và hexane (Charoensiri và *et al.*, 2009). Đến giờ, chưa có nghiên cứu nào đánh giá toàn diện hiệu quả sử dụng enzyme trong tách chiết các hợp chất này từ vỏ và ruột thanh long.

Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích ứng dụng enzyme pectinase và cellulase trong quá trình xử lý vỏ và ruột thanh long để tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học như betacyanin và lycopene.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Thanh long ruột đỏ được mua ở siêu thị Big C Trường Chinh (Thành phố Hồ Chí Minh) với đặc điểm là ruột đỏ, chín đều, trọng lượng mỗi trái đạt 500-600g. Đầu tiên, thanh long tươi được rửa sạch, phần thịt quả và vỏ được tách riêng và sử dụng cho hai khảo sát khác nhau.

Pectinase được mua từ công ty TNHH CFOOD Việt Nam. Cellulase được mua từ công ty TNHH TM Việt Hoàng Long. Thông số của hai enzyme này được tổng hợp trong Bảng 1.

**Bảng 1. Thông tin về hoạt tính enzyme pectinase và enzyme cellulase**

Loại enzyme	Nguồn vi sinh vật	Hoạt tính	Nhiệt độ tối ưu	pH tối ưu
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	60.000 UI/g	40-55°C	3,5-4
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	10.000 UI/g	50°C	4 - 5

Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu được mua từ công ty Xilong Scientific Co., Ltd (Trung Quốc).

## Phương pháp nghiên cứu

### **Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch chiết giàu betacyanin từ vỏ thanh long**

Đối với thí nghiệm khảo sát chọn cách xử lý nguyên liệu thì vỏ thanh long được xử lý theo hai cách khác nhau. Xử lý ướt thì vỏ tươi đã loại tai xanh được xay nhuyễn hoàn toàn. Còn xử lý khô thì phần vỏ đã loại tai xanh, cắt nhỏ 3 × 3 cm, sau đó được sấy khô ở 70°C trong 6 giờ. Vỏ khô được xay bằng máy xay bột khô và rây qua kích thước lỗ 0,3 mm. Bột thu được bảo quản trong túi zip ở 4°C trong suốt thời gian tiến hành nghiên cứu. Nguyên liệu, enzyme (pectinase và cellulase), nước cất được trộn đều với tỷ lệ 1:1:25 (w/w/v), ủ ở nhiệt độ 50°C trong 60 phút. Sau đó, bất hoạt enzyme ở 0°C trong 5 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 45 phút, thu dịch nổi và xác định hàm lượng betacyanin thu được để chọn loại enzyme phù hợp cho các khảo sát tiếp theo.

Dựa trên đặc tính của enzyme được sử dụng, các yếu tố được khảo sát bao gồm nhiệt độ (40, 50, 60°C), tỷ lệ enzyme/dung môi (0,1%; 0,3%; 0,5%, 0,7% w/v), pH (3, 4, 5, 6) và thời gian (30, 60, 90, 120 phút). Sau đó, hỗn hợp được bất hoạt enzyme ở 0°C trong 5 phút, lọc thô qua rây 0,4 mm, dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi chứa betacyanin được thu nhận và hàm lượng betacyanin được xác định như mô tả ở phương pháp phân tích.

### **Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch quả giàu lycopene từ thịt quả thanh long**

Thanh long sau khi rửa sạch, lột vỏ được đem cân định lượng 50 g mỗi mẫu và xay nhuyễn bằng máy xay sinh tố để thu puree. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với hỗn hợp 50 g puree thanh long trộn với 50 ml nước cất (pH của hỗn hợp xấp xỉ bằng 4).

Dựa trên đặc tính của enzyme được sử dụng, các yếu tố được khảo sát bao gồm tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4% w/w), nhiệt độ (30°C, 40°C, 50°C, 60°C), pH (3; 3,5; 4; 4,5). Sau đó, hỗn hợp được bất hoạt enzyme ở 0°C trong 5 phút, lọc thô qua rây 0,4 mm, dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi chứa lycopene được thu nhận, hiệu suất thu hồi dịch và hàm lượng lycopene trong dịch quả được xác định như mô tả ở phương pháp phân tích (Wayne và *et al.*, 2002).

### **Phương pháp phân tích**

Hàm lượng betacyanin được xác định thông qua phương pháp đo mật độ quang. Công thức xác định hàm lượng betacyanin (mg/100 chất khô) như sau (Ramli *et al.*, 2014).

$$BC = \frac{A_{538} \times V \times DF \times M \times 100}{\epsilon \times L \times W}$$

Trong đó:  $A_{538}$ : Độ hấp thụ ở bước sóng 538 nm; L: Chiều dài đường truyền 1,0 cm; DF: Hệ số pha loãng (5 lần); V: Thể tích dung dịch mẫu (1 ml);  $\epsilon$ : Hệ số mol của betacyanin (60000 L/mol.cm); M: Khối lượng phân tử của betacyanin (550 g/mol).

Hàm lượng lycopene trong mẫu được xác định theo phương pháp của Wayne và đồng tác giả (2002). Đầu tiên, lấy 0,6 g mẫu đã nghiền và được đồng nhất cho vào bình tam giác 100 ml. Bổ sung 5ml BHT (BHT 0,05% trong acetone), 5 ml ethanol 95%, 10 ml hexan. Bịt kín mẫu thí nghiệm bằng màng PE và bọc giấy bạc. Lắc ở nhiệt độ phòng 130 vòng/phút trong 15 phút. Sau đó bổ sung thêm 3 ml nước khử ion và lắc tiếp 5 phút. Mẫu được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để tách pha, thu lấy pha dung môi phía trên và tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 503 nm. Hàm lượng lycopene (mg/kg thịt quả) trong mẫu được tính theo công thức sau.

$$H = \frac{A_{503} \times 31,2}{g \text{ thịt quả}}$$

Trong đó:  $A_{503}$ : Độ hấp thụ ở bước sóng 503 nm.

Hàm lượng acid tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ NaOH 0,1N theo TCVN 4589:1988. Hàm lượng vitamin C được xác định thông qua phản ứng khử iod. Hàm lượng nitơ amin được xác định bằng cách sử dụng formaldehyt và NaOH.

Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần. Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 365 và Statgraphics centurion XVI.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### **Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch chiết giàu betacyanin từ vỏ thanh long**

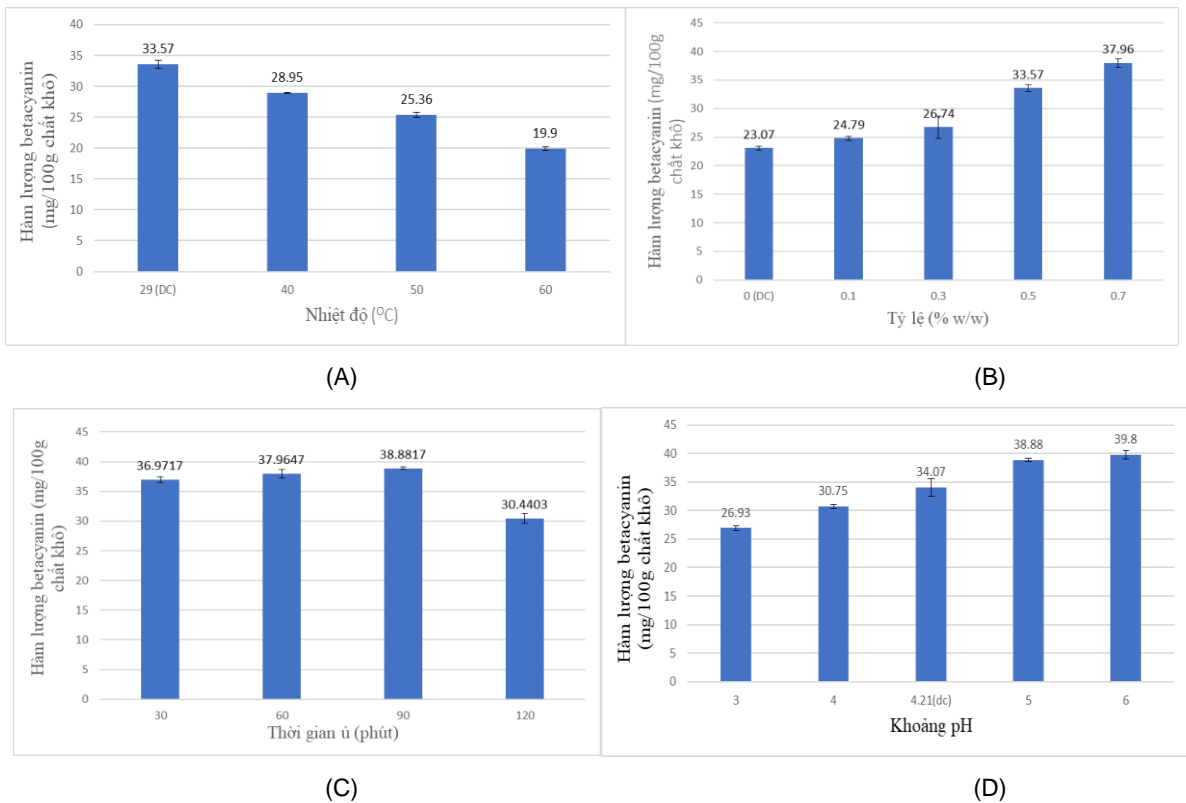
Hàm lượng betacyanin của vỏ thanh long xử lý ướt và khô được tổng hợp trong Bảng 2.

**Bảng 2. Hàm lượng betacyanin thu được khi xử lý với các enzyme khác nhau**

Enzyme	Nguyên liệu	Hàm lượng betacyanin (mg/100g chất khô)
Pectinase	Tươi	12.07 <sup>a</sup> ±0.74
	Khô	21.66 <sup>b</sup> ±0.30
Cellulase	Tươi	17.34 <sup>a</sup> ±0.06
	Khô	25.36 <sup>b</sup> ±0.37

Nguyên liệu khô (sấy) có hàm lượng betacyanin cao nhất là 21,66 mg/100g chất khô đối với enzyme pectinase và 25,36 mg/100 g chất khô đối với enzyme cellulase. Điều này có thể giải thích do thành phần của vỏ thanh long có hàm lượng chất xơ cao (69,30 g/100 g). Cellulase phản ứng với cellulose có trong thành tế bào phá vỡ cấu trúc màng tế bào giải phóng betacyanin. Nguyên liệu ở trạng thái khô và enzyme cellulase được chọn để khảo sát các thông số tiếp theo.

Hàm lượng betacyanin của vỏ thanh long thu được dưới các điều kiện khác nhau được tổng hợp và minh họa trong các hình dưới đây.



**Hình 1. Ảnh hưởng của các thông số nhiệt độ (A), tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (B), thời gian ủ (C) và giá trị pH (D) đến hàm lượng betacyanin thu được**

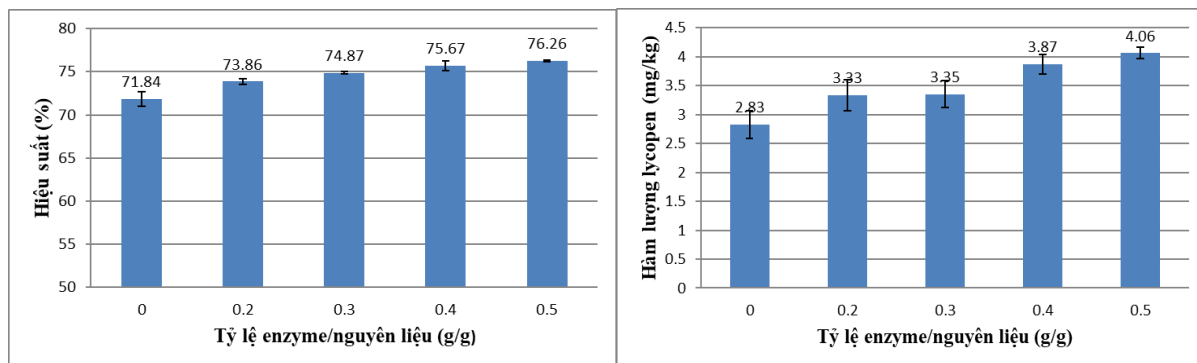
Chọn nhiệt độ phòng ở 29°C là đối chứng âm vì ở nhiệt độ này hàm lượng betacyanin thu được cao nhất là 33,57 mg/100 g chất khô. Khi tăng nhiệt độ lên cao thì hàm lượng betacyanin sẽ càng giảm vì betalain thường được biết đến như các chất màu không ổn định nhiệt, tốc độ phân hủy tăng nhanh cùng với sự gia tăng nhiệt độ và thời gian gia nhiệt (Harivaindaran *et al.*, 2008).

Chọn tỷ lệ enzyme 0,7% vì ở tỷ lệ này hàm lượng betacyanin đạt cao nhất trong các công thức thí nghiệm với 37,96 mg/100 g chất khô. Ta có thể thấy khi tỷ lệ enzyme tỷ lệ thuận với hàm lượng betacyanin thu được, với tỷ lệ enzyme càng cao thì hàm lượng betacyanin càng cao. Ở các mốc thời gian ủ khác nhau trong khoảng 30-90 phút, hàm lượng betacyanin thu được tăng dần và đạt giá trị cao nhất là 38,88 mg/100g chất khô, nhưng khi tăng thời gian ủ lên 120 phút thì hàm lượng betacyanin thu được giảm xuống chỉ còn khoảng 30,33 mg/100g. Thời gian ủ 90 phút được chọn cho thí nghiệm tiếp theo. Dựa vào hình 1(D), ta thấy pH tỷ lệ thuận với hàm lượng betacyanin. Chọn pH bằng 6 vì ở pH này, hàm lượng betacyanin đạt cao nhất là 39,80 mg/100 g chất khô.

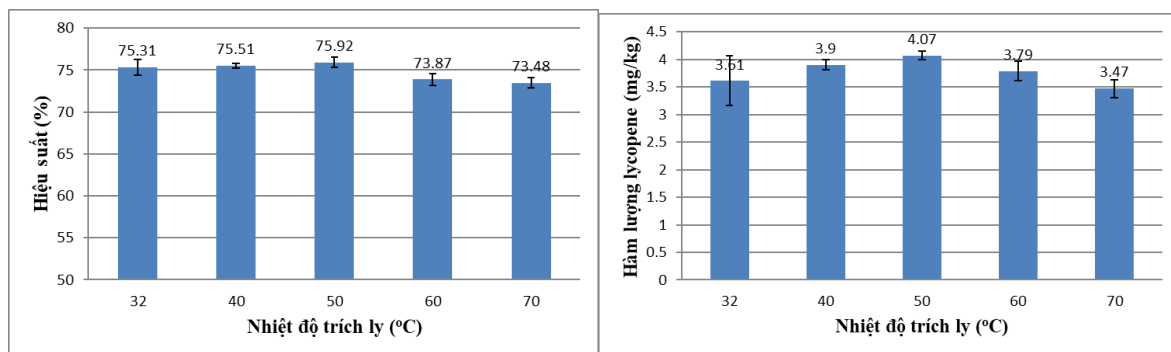


**Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch quả giàu lycopene từ thịt quả thanh long**

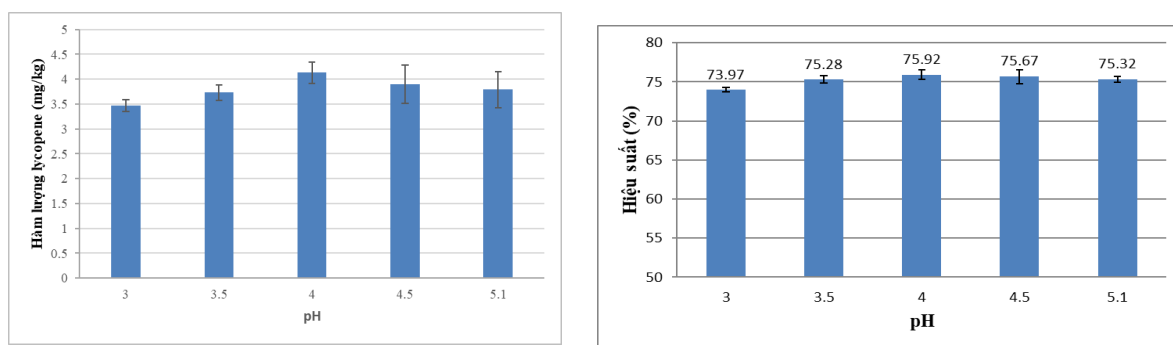
Quan sát hình 2A, khi lượng enzyme càng tăng thì lượng dịch quả và hàm lượng lycopene thu được cũng tăng. Đối với mẫu không xử lý enzyme, hiệu suất thu hồi dịch quả (71,84%) và hàm lượng lycopene (2,83 mg/kg) thấp hơn các mẫu có xử lý. Khi tăng tỷ lệ enzyme từ 0,2% w/w lên 0,5% w/w, hiệu suất thu hồi dịch tăng từ 73,86% lên 76,26%; hàm lượng lycopene tăng từ 3,33 mg/kg lên 4,06 mg/kg. Vì vậy, chọn tỷ lệ enzyme 0,5% là thích hợp cho các thí nghiệm tiếp theo.



(A)



(B)



(C)

**Hình 2. Ảnh hưởng của các thông số tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (A), nhiệt độ (B), pH (C) đến hiệu suất thu hồi dịch quả và hàm lượng lycopene thu được**

Khi nhiệt độ tăng từ 32°C đến 50°C thì hiệu suất của dịch thanh long thu được cũng tăng tương ứng từ 75,31% đến 75,92% (nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê); hàm lượng lycopene cũng tăng từ 3,61mg/kg đến 4,07 mg/kg. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên 60°C-70°C thì hiệu suất thu hồi dịch quả và hàm lượng lycopene thu được giảm, nhưng không có sự chênh lệch lớn giữa 2 nhiệt độ này. Có thể giải thích điều này là do nhiệt độ cao sẽ làm cho hoạt tính enzyme giảm, trong khi đó ở nhiệt độ thấp, enzyme chưa được hoạt động tối ưu dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 50°C đạt hiệu suất và hàm lượng lycopene cao nhất, tương ứng 75,92% và 4,07 mg/kg. Nhiệt độ thủy phân 50°C là nhiệt độ tối ưu của enzyme pectinase. Các phân tử enzyme

có động năng lớn, tăng phản ứng giữa enzyme và cơ chất, nhiệt độ tăng làm giảm độ nhớt dịch quả, tăng khả năng phân tán của enzyme trong dịch quả, từ đó tăng cơ hội tiếp xúc giữa enzyme với cơ chất.

Giá trị pH ảnh hưởng khá rõ đến hiệu suất dịch quả thu được sau quá trình thủy phân, hiệu suất dịch quả thu hồi cao nhất khi khảo sát ở giá trị pH 4, giá trị tối ưu của enzyme pectinase. Khi tăng pH dịch quả 4,5; hiệu suất thu hồi dịch và hàm lượng lycopene giảm nhẹ. Hiệu suất thu hồi dịch quả và hàm lượng lycopene thu được thấp nhất ở pH 3. Như vậy pH 4 là tối ưu cho quá trình thủy phân với hiệu suất dịch quả thu hồi cao nhất (75,97%), hàm lượng lycopene cao nhất (4,13 mg/kg).

Kết quả đánh giá phân tích các thành phần dịch quả thanh long cho thấy: nồng độ acid tổng là 0,256% g/L, hàm lượng vitamin C là 52,8 mg/l; nồng độ nitơ amin là 0,287 g/L; độ brix là 6%, giá trị pH là 4,07.

## KẾT LUẬN

Khảo sát ban đầu xây dựng quy trình thu nhận các sản phẩm giàu hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ trái thanh long. Dịch vỏ quả chứa 39,8 mg betacyanin/100g chất khô thu được khi sử dụng enzyme cellulase tách chiết ở 30°C, pH bằng 6, tỷ lệ enzyme/nguyên liệu là 0,7% w/v, 90 phút. Đối với dịch quả thì thông số phù hợp nhất khi sử dụng enzyme pectinase là tỷ lệ enzyme/nguyên liệu là 0,5% w/w, pH là 4, 50 phút, 50°C. Ở điều kiện này thì hiệu suất trích ly dịch quả tăng 4,13% và hàm lượng lycopene tăng gần 50% so với đối chứng. Kết quả của nghiên cứu có thể được sử dụng nhằm phát triển quy trình sản xuất các sản phẩm giàu các chất có hoạt tính sinh học từ trái thanh long tại Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn các bạn Phan Thị Mỹ Kim và Nguyễn Thị Luận đã hỗ trợ cho quá trình thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ánh Dương (2023) Tìm hướng đi cho xuất khẩu thanh long vào thị trường EU (<https://tuyengiao.vn/tim-huong-di-cho-xuat-khau-thanh-long-vao-thi-truong-eu-151892>).
- Charoensiri R, Kongkachuichai R, Suknicom S, and Sungpuag P (2009). Beta-carotene, lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. *Food Chem*, 113(1): 202-207.
- Đào Thị Mỹ Linh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, and Phạm Thị Phương Thùy (2020). Tối ưu hóa quá trình tách chiết Betacyanin từ vỏ thanh long (*Hylocereus undatus*) bằng phương pháp vi sóng. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 129(1A): 11–20.
- Harivaindaran KV, Rebecca OP, and Chandran S (2008). Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(18): 2259-2263.
- Ramli NS, Ismail P and Rahmat A (2014). Influence of Conventional and Ultrasonic-Assisted Extraction on Phenolic Contents, Betacyanin Contents, and Antioxidant Capacity of Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *The Scientific World Journal*: 1–7.
- Thanh Thi Ha Le and Ngọc Lieu Le (2020). Antioxidant capacities and betacyanin lc-ms profile of red-fleshed dragon fruit juice (*Hylocereus polyrhizus*) extracted by ultrasound-assisted enzymatic treatment and optimized by response surface methodology. *J Food Process Pres* 45.3 (2021): e15217.
- Vũ Thị Thanh Đào (2017). Nghiên cứu khả năng trích ly và bảo quản chất màu tự nhiên từ vỏ quả thanh long ruột đỏ. *Tạp chí Khoa học* 27: 08-2017.

## EVALUATION OF ENZYME EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM RED DRAGON FRUIT

Nguyen Pham Huong Huyen\*, Pham Minh Tuan

*Faculty of Biology and Environment, Ho Chi Minh City University of Industry and Trade (Huit), Vietnam*

### SUMMARY

The initial investigations established an extraction process of betacyanin-rich product from red dragon fruit peel using cellulase enzyme and lycopene-rich fruit juice from red dragon flesh using pectinase enzyme. The appropriate parameters to obtain these products are determined as the temperature of 30°C (peel) and 50°C (flesh); the enzyme/material ratio of 0.7% w/w (peel) and 0.5% w/w (flesh); the incubation time of 90 minutes (peel) and 60 minutes (flesh); and the pH of 6 (peel) and 4 (flesh).

**Keywords:** Betacyanin, cellulase, lycopene, pectinase, dragon fruit.

\* Author for correspondence: Tel: 0988608939; Email: huyenph@huit.edu.vn

# EFFECTS OF YEAST EXTRACT AND $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ IONS ON THE GROWTH AND SPORULATION OF *BACILLUS COAGULANS*

Cao Xuan Bach, Nguyen Bao Chau, La Thi My Hanh, Do Thi Yen,  
Nguyen Van Tuan, Dinh Thi My Hang, Nguyen Thanh Thuy

Center for Industrial Microbiology, Food Industries Research Institute, 301-Nguyen Trai, Thanh Xuan, Ha Noi, Viet Nam

## SUMMARY

*Bacillus coagulans* is currently being studied due to its potential applications of its spores in probiotic products. In this study, the effects of yeast extract concentration and  $\text{Ca}^{2+}$  &  $\text{Fe}^{3+}$  ions on the growth and sporulation of *B. coagulans* VCIM5914 were investigated. The examination of 12 types of yeast extracts from suppliers revealed a significant dependency of growth and sporulation on the type of yeast extract. An appropriate concentration of yeast extracts effective for cell density increase was  $\geq 7.5$  g/L, and for spore density, it was  $\geq 12.5$  g/L. The presence of calcium ions at concentrations  $\geq 0.2$  g/L increased both cell and spore numbers. Although high concentrations of iron ions did not significantly increase cell density, they enhanced sporulation at concentrations  $\geq 0.2$  g/L. Fermentation using selected conditions on a fermenter resulted in a cell density of  $\sim 5 \times 10^8$  CFU/mL with a sporulation rate of 82% after 28 hours cultivation.

**Keywords:** *Bacillus coagulans*, calcium Ion, probiotic, sporulation, yeast extract.

## INTRODUCTION

*Bacillus* are applied in many industrial fields to produce fine chemicals, enzymes, probiotic, pharmaceutical ingredients and in agriculture. The *Bacillus* species that have been most extensively studied these are *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* and *B. licheniformis*. The abilities of some *Bacillus* strains to metabolize and transform complex organic compounds are of interest in both pharmaceutical production and agriculture. Thus, characterizing *Bacillus* species growth conditions especially sporulation is interest to optimize the condition to produce endospores (Ben Khedher *et al.*, 2011), (Cao *et al.*, 2020).

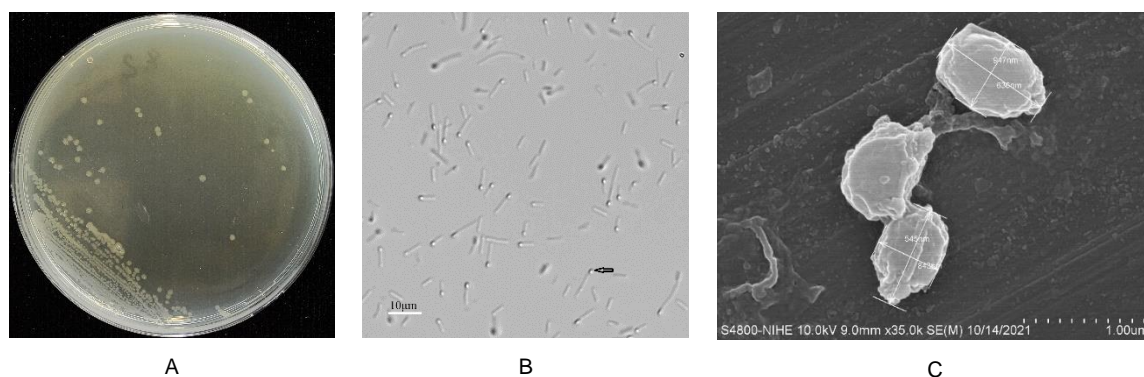
Despite the great diversity of genera, most *Bacillus* species can grow well on conventional media such as nutritional agar or trypticase soy agar, and blood agar. However, some isolates, especially those from poor nutrition environments, may grow poorly on these standard media and therefore require weaker formulations. Most species use glucose and/or other fermentable carbohydrates as sole sources of carbon and energy, but some species do not seem to use carbohydrates (Logan and De Vos 2009). *Bacillus* species can use inorganic and organic nitrogen sources. Little comprehensive information is available on the vitamin requirements of each *Bacillus* species. Many do not require such growth factors, but yeast extract will usually stimulate better growth (Poormontaseri *et al.*, 2017). The nutritional condition from rich to a poor growth medium or population density increases activate the forming of endospore at the end of the exponential growth phase. There are many factors affect endospore formation, including growth temperature, environmental pH, aeration, presence of certain minerals, and carbon, nitrogen and phosphorus sources and their concentrations (Logan and De Vos 2009). Manganese ions are essential for *B. subtilis* sporulation because they are needed for PGA-mutase, an enzyme that necessary for the balance of intracellular metabolites. Calcium and magnesium seem to be effect on spore formula of *B. coagulans* (Sinnelä *et al.*, 2019). De Vries (2004) report the role of calcium in spore germination, Calcium dipicolinate (CaDPA), while Keynan and Halvorson report the mechanism of Calcium ion and dipicolinic acid inter reaction with L-alanine induced germination (Keynan and Halvorson, 1962).

In this study, we focused on investigating the effects of yeast extract, as well as the influence of calcium and iron ions, on the growth and sporulation. Additionally, cultivation in bioreactor was carried out using a 2 L bioreactor to select preliminary conditions for the cultivation of *Bacillus coagulans* VCIM5914, with the aim of maximizing spore production.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

*Bacillus coagulans* VCIM5914 was isolated from a commercial probiotic product (BioSpring Jsc., Vietnam) which is identification 99,90% similar with *B. coagulans* strain S-lac (GenBank: CP011939) by using rpoB gene, encoding the beta-subunit of RNA polymerase. The morphology of *B. coagulans* VCIM5914 on plate count agar (PCA) medium and spore under microscope and Scanning electron microscope (SEM) as in Fig.1.



**Figure 1. *Bacillus coagulans* morphology: (A) colony on PCA; (B) cells with endospore (arrow); (C) SEM spore image**

Yeast extracts are provided Procelys by Lesaffre® (Procelys, Singapore). Twelve yeast extract samples received from Lesaffre Singapore, B.U. from Singapore were used in this study. Procelys kept the composition and recipe for yeast extracts proprietary and under continuous research.

## Methods

**Cultivation medium:** The MRS agar medium (M6411-HiMedia®, India) was used as the medium for activate cell (include for 1 L: 5.0 g yeast extract; 8.0 g meat extract; 10.0 g peptone from casein; 2.0 g  $K_2HPO_4$ , 0.1 g  $MgSO_4$ , 0.05 g  $MnSO_4$ , 2.0 g  $(NH_4)_3 C_6H_5O_7$ ; 5.0 g  $CH_3COONa.3H_2O$ ; 20.0 g glucose, 1 mL Tween 80, and 15 g agar). The cultivation medium modified from sporulation medium described by Cazemier *et al.*, (2001) containing ingredients: 5 g/L Yeast extract, 0.5 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.25 g.L<sup>-1</sup>  $MgSO_4$ , 0.1 g/L KCl, 0.025 g/L  $MnSO_4$ , adjusted pH to 6.0 and was sterilized at 121°C for 15 minutes.

**Effect of yeast extract nutrient:** The liquid broth as describe above with different concentration of yeast extract: 0.0, 5.0 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, and 20 g/L was cultivation total 20 mL in 100 mL flask, shaking 150 rpm at 37°C for 48 hours. Samples were measured turbidity, plate count agar. All experiments were duplicated.

**Effect of calcium chloride concentration:** Calcium were be add into medium cultivation with range from 0 to 1.0 g/L (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L) volume in total is 20 mL in 100 mL flask, shaking 150 rpm at 37°C for 48 hours. Samples were measured turbidity, plate counting. All experiments were duplicated.

**Temperature:** Two different temperature conditions, 37°C and 40°C, were selected to examine cultivation and sporulation capabilities. A volume of 20 mL of medium was incubated with shaking at 150 rpm in a 100 mL Erlenmeyer flask for 48 hours. Samples were measured turbidity, plate count agar. All experiments were duplicated.

**Turbidity measure (OD<sub>600</sub>):** The turbidity was measured at wavelength of 600nm in 24-wells microplate (1 mL/well) by BioTek spectrophotometry (BioTek Instruments, Inc.).

**Plate counting:** For cells counting, one milliliter of each sample was diluted with 9 mL sterile salinity salt to 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup> dilution. Amount of 100 μL of 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup> solution was spread out using a sterile glass rod. All the plates were incubating at 37°C for 24h then counting the colony forming. For spores, samples were heating up 75°C for 15 minutes to kill vegetative cells before dilution. The colony forming unit (CFU) was calculated by multiplying the number of colony with the dilution per milliliter (CFU/mL).

**Bioreactor cultivation:** *B. coagulans* VCIM5914 were cultivate in bioreactor 2 L Jupiter Solaris using 1 L medium include 10 g/L Yeast extract, 0.5 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.25 g/L  $MgSO_4$ , 0.1 g/L KCl, 0.025 g/L  $MnSO_4$ , add 0.4 g/L  $CaCl_2$ , pH adjusted to 6.0, inoculum 10% v/v with preculture. The temperature is 40°C, dissolve oxygen remains 30% control by stirring (150-300 rpm) and air flow (0.2-0.4 lpm), cultivation time for 28h. Samples were measured turbidity and colony counting.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Screening yeast extract for cultivation

Twelve yeast extract test samples received from Procelys by Lesaffre were screened to select the optimal yeast extract source. The composition and recipe for yeast extracts proprietary and under continuous research. However, some samples included crude extracts containing whole yeast cells (YE9, YE10, YE11), making it difficult to observe results using turbidity absorption at a wavelength of 600nm. The results of plate counting as show in Figure 2.

The number of cells ranged from  $2 \times 10^8$  to  $8 \times 10^8$  CFU/mL, commonly falling within  $2-3 \times 10^8$  CFU/mL, while high spore densities only reached  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL. Some yeast extract samples that yielded high cell densities included YE1, YE4, YE2, and YE6. However, it is well-known that bacterial sporulation is often induced under stressful conditions rather than favorable growth conditions. Consequently, samples that produced high spore densities were YE6, YE10, and YE11. Based on these results, YE6, which achieved high spore density while maintaining an average cell count, was selected as the optimal yeast extract for subsequent experiments.

The results demonstrated a variation in the impact of various yeast extract samples on the cells and spores, suggesting that it is one of the primary factors influencing cells and spores yield.

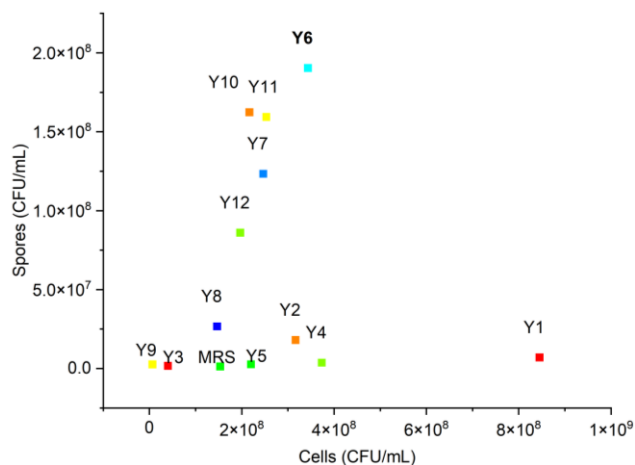


Figure 2. Screening different types of yeast extract nutrient

### Yeast extract concentration

The concentration of yeast extract (YE6) was investigated in range from 0 to 20 g/L (0-5-10-15-20 g/L) in a 48 hours cultivation period. The plate counting of cells and spores results are shown in Figure 3. As expected, the increase of YE concentration resulted in increasing of cells and spores.

In the range of yeast extract concentration from 5 to 12.5 g/L, the cell count increase from  $5 \times 10^8$  CFU/mL to  $4.84 \times 10^9$  CFU/mL. At 15 g/L, the cell count reached its highest value of  $7.7 \times 10^9$  CFU/mL, but at 20 g/L it only reached  $6.14 \times 10^9$  CFU/mL. For spores, in the range of yeast extract from 5 to 10 g/L, the count remained constant at  $1 \times 10^8$  to  $2 \times 10^8$  CFU/mL. From 12.5 to 20 g/L, the number of spores increased: at 12.5 g/L, it reached approximately  $1 \times 10^9$  CFU/mL and reach the highest spore count was observed at 20 g/L with  $2.48 \times 10^9$  CFU/mL.

Overall, the increase of spores and cells can be observed depending on the increase of yeast extract concentration, however in practical applications, the selection material for production must also consider the sporulation rate and the growth efficiency per unit of raw material. Thus, we selected the amount of 10 g/L yeast extract for further experiment to increase the number of spores in cultivation.

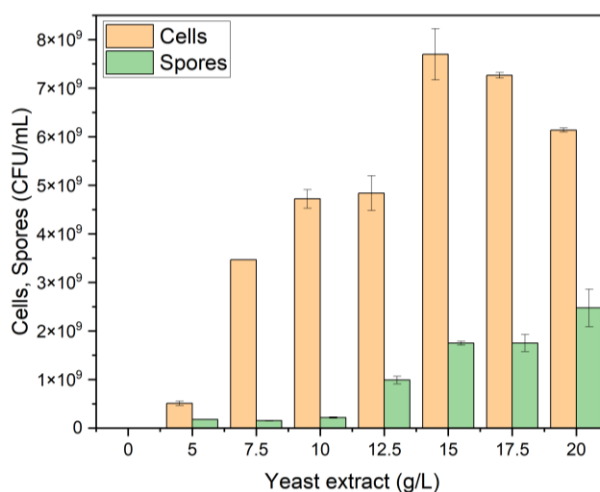


Figure 3. Effect of yeast extract concentration on cells and spores

### Effect of calcium and Iron ions

In the present study, the effect of calcium ion concentration on accumulation of cells biomass and spore rate were investigated. The results as shown in Fig. 4.

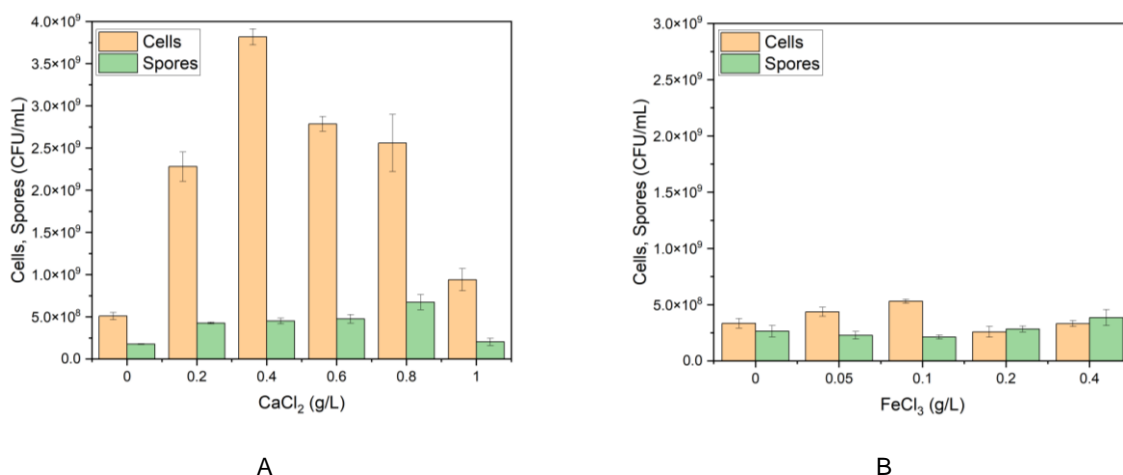


Figure 4. Effect of calcium and iron ion concentration on cells and spores

(A: Calcium chloride, B: Iron (III) chloride)

Supplementing with CaCl<sub>2</sub> in concentrations ranging from 0.2 to 0.8 g/L increased cell density from approximately 2.25 × 10<sup>9</sup> to 3.5 × 10<sup>9</sup> CFU/mL and 1 × 10<sup>9</sup> CFU/mL at the concentration of 1 g/L compared to the control (5 × 10<sup>8</sup> CFU/mL). This indicated that the addition of CaCl<sub>2</sub> positively affects the growth of the strains, enhancing its growth capacity. Spore density also increased from approximately 4 × 10<sup>8</sup> CFU/mL to 6 × 10<sup>8</sup> CFU/mL as calcium concentration increased from 0.2 to 0.8 g/L, compared to only 1.7 × 10<sup>8</sup> CFU/mL without supplementation.

For FeCl<sub>2</sub>, an increasing trend in cell density from 3 × 10<sup>8</sup> CFU/mL (0 g/L) to 4-5 × 10<sup>8</sup> CFU/mL also observed, with a maximum cell density achieved at a concentration of 0.1 g/L. However, the change in spore density was not significant. These results indicate that the effect of FeCl<sub>3</sub> is minimal compared to the control.

In both experiments, despite the increase in cell density in the samples with CaCl<sub>2</sub>, there was surprisingly no noticeable increase in spore density, which remained around 3 × 10<sup>8</sup> CFU/mL. While CaCl<sub>2</sub> supplementation increased cell density, it did not affect spore formation capacity, resulting in a spore formation rate of less than 40%.

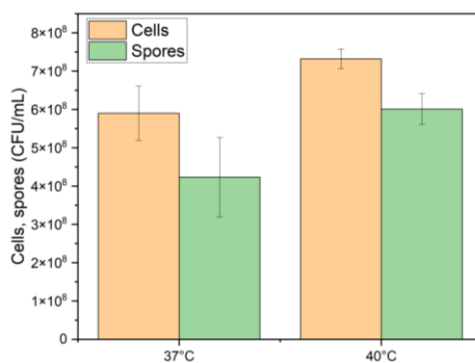
The sporulation of *Bacillus* was known for the formation of endospore with three main stages: firstly, asymmetric cell division: the mother cell and the forespore; secondly, engulfment: the mother cell covers the forespore with a spore coat, and finally, late sporulation: coat assembly of four layer: (i) inner forespore membrane, (ii) cortex, (iii) outer forespore membrane, and (iv): coat. Then the mother cell lyses to release a mature spore into the environment. During this process, the involvement of Ca<sup>2+</sup>-dipicolinic acid in replacing water during the late stage of the spore formation process is crucial. The absence of this factor prevents the spores from surviving in dry conditions (Kamat, Lewis, and Pradhan 1985), (McKenney *et al.*, 2013). This may explain the increase in spore density with Ca<sup>2+</sup> concentration, even when the cell count was not change, as show in the results in Fig. 4A.

Additionally, the homeostatic roles of Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> are closely related to each other through the coordination of three metal-regulating protein: the Fe<sup>2+</sup> sensor Fur, the Mn<sup>2+</sup> sensor MntR and the oxidative stress response regulator PerR, which functions with either Fe<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup>. The homeostatic of Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> in *Bacillus* is a complex mechanism involving oxidative stress response (Steingard *et al.*, 2023). This explains the high spore ratio observed in high Fe<sup>2+</sup> concentration in Fig. 4B.

It suggests that an optimum sporulation condition can be archived with separate stages for optimal cell formation and stress-induced sporulation may be more effective than one stage with all components from the start of batch. However, the essential balance during the sporulation stage between manganese, iron, and oxidative stress in *Bacillus* could be resolved through genetic and metabolic analysis.

### Temperature

The common cultivation temperature for *Bacillus* in the industry are 30°C, 37°C, and 40°C (Biermann and Beutel 2023). Particularly, studies about the lactic acid producing from *Bacillus coagulans* cultivated at 45°C (Tolieng *et al.*, 2018), (Marshall and Beers 1967). Therefore, two temperatures are 37°C, and 40°C were investigated in this study, the results as showed in Fig.5.

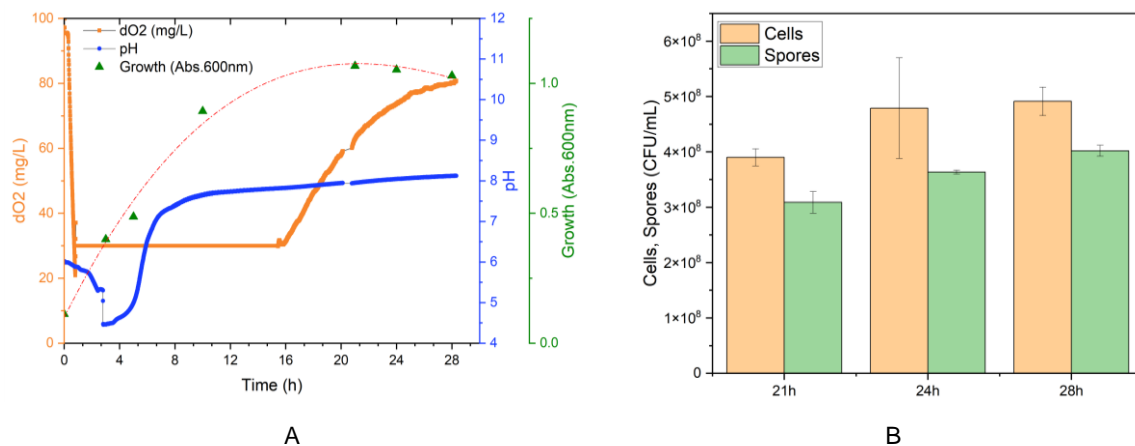


**Figure 5. *B. coagulans* cells and spores comparison cultivation at 37°C and 40°C**

Comparison of the cultivation at temperatures 37°C and 40°C, it is evident that at 40°C, both cell density and spore ratio were better than at 37°C. Some previous studies have also indicated that the optimal cultivation temperature for this strain is between 40-45°C, although the exact optimal temperature is not clearly reported (Xu *et al.*, 2023). The spore ratio also improved, though not significantly, by about 10%, increasing from 72% to 82% (spore count increased from 4.23 to 6.01 × 10<sup>8</sup> CFU/mL) (Fig.5). Therefore, a cultivation temperature of 40°C will be used for fermentation conditions in bioreactor.

### Cultivation in bioreactor

Aiming to apply in bioreactor scale, cultivation 1L medium was experiment in 2L Jupiter Solaris bioreactor was conducted for scale up. The fermentation parameters controled include temperature: 40°C, dissolve oxygen remain ≥ 30% control by stirring (150-300rpm) and air flow (0.2-0.4 lpm). Yeast extract has used 10 g/L with addition 0.4 g/L CaCl<sub>2</sub>. The change of pH and oxygen demand were recorded to evaluate the relative with sporulation process.



**Figure 6. Cultivation in bioreactor (A) pH, oxygen dissolvent, and OD600, (B) Cells and spore at 21, 24, and 28h**

The growth rate by OD600nm measurement show the cells growth curve reaches highest after 16-20h cultivation (Fig. 6A). The pH tends to decrease from 6 to 4.5 during 3 first hours then increase from this point to pH 7.5 at about 8h cultivation. From this point pH slightly increases up to 8.0 until the end of fermentation (28h). The most consumption oxygen also occurred during the first 16h. The oxygen drastically falls from 100% to nearly 10% during the first 4<sup>th</sup> hours cultivation. Then the dissolve oxygen was constantly controlled at value of 30% by stirring speed and air flow 0.02 lpm to 0.04 lpm (the fluctuate of stirring and dissolve oxygen). At 16h time point, the cells growth reaches the highest value then the demand of oxygen slowly down, leading to the increase of dissolve oxygen from 30 up to 80% at the end of cultivation (28h) (Fig. 3C). The oxygen consumption was highest from 2 to 12h cultivation in which is in accordance to report by Li *et al.*, showing the dissolved oxygen was below 20% after 2h cultivation. The spore does not observe at first 10h cultivation (data not show) then quickly reaches 3 × 10<sup>8</sup> at 21h to 4 × 10<sup>8</sup> CFU/mL at 28h cultivation, similar with study of Li *et al.*, (2022). The spore rate slightly increases from 79% (at 21h) to 82% (at 24h) and 83% (at 28h) (Fig.6B). The spore yield indicated that under aerated and stirred fermentation conditions, the spore collection time could be more than 24 hours.

Multiple strategies to optimize of endospore were studied, including medium and parameter cultivate condition, in both solid-state and submerge fermentation. The variety of process parameters and media composition reflects

the diversity of the *Bacillus* spp. group (Biermann and Beutel 2023). These results contributed the initial study on optimization to improve cell and spore production, aiming for further application in pilot-scale fermentation in the industry.

## CONCLUSION

The composition of medium for *B. coagulans* cultivation was experiment with different yeast extract nutrient and addition of different calcium ion. The result shows the high biomass can reach at 24h but the spore rate seems to be needed more optimization condition. The increase of nutrient and calcium have significant effect higher number of cell and spore rate. In addition, cultivation condition in bioreactor was experiment with control of oxygen, temperature, and stirring. The trend of oxygen demand and pH were observed. The log phase happened during the first 12h cultivation then the stationary phase can be predicted from 12h – 24h, the sporulation phase happened during this phase and extend longer. This study showed the enhance effect of yeast extract nutrient and calcium ion on *B. coagulans* cell and sporulation. Nevertheless, the medium composition and the optimization experiment is necessary for sporulation target, and the optimization media composition for spore/ biomass still is an interesting question to be investigate in further study.

**Acknowledgement:** This study was funding by Lesaffre Singapore, B.U. Procelys and all experiment has done at Food Industries Research Institute, Hanoi, Vietnam.

## REFERENCES

- Ben Khedher S, Kamoun A, Jaoua S, & Zouari N (2011). Improvement of Bacillus Thuringiensis Bioinsecticide Production by Sporeless and Sporulating Strains Using Response Surface Methodology. *New Biotechnol* 28 (6): 705–12. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.01.008>.
- Biermann R, and Beutel S (2023). Endospore Production of Bacillus Spp. for Industrial Use. *Engineering in Life Sciences* 23 (11): e2300013. <https://doi.org/10.1002/elsc.202300013>.
- Cao J, Yu Z, Liu W, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, and Chen W. (2020). Probiotic Characteristics of Bacillus Coagulans and Associated Implications for Human Health and Diseases. *J Funct Foods* 64 (January):103643. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103643>.
- Cazemier AE, Wagenaars SF, ter Steeg PF.. (2001). Effect of Sporulation and Recovery Medium on the Heat Resistance and Amount of Injury of Spores from Spoilage Bacilli. *J Appl Microbiol* 90 (5): 761–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01302.x>.
- Kamat AS, Lewis NF, & Pradhan DS (1985). Mechanism of Ca<sup>2+</sup> and Dipicolinic Acid Requirement for L-Alanine Induced Germination of Bacillus Cereus BIS-59 Spores. *Microbios* 44 (177): 33–44.
- Keynan A, and Halvorson HO (1962). CALCIUM DIPICOLINIC ACID-INDUCED GERMINATION OF BACILLUS CEREUS SPORES. *J Bacteriol* 83 (1): 100–105.
- Li Y, Wang Y, Liu Y, Li X, Feng L, Li K (2022). Optimization of an Economical Medium Composition for the Coculture of Clostridium Butyricum and Bacillus Coagulans. *AMB Express* 12 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01354-5>.
- Logan NA, and De Vos P (2009). Genus I. Bacillus Cohn 1872, 174AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes* 3 (January):31–34.
- Marshall R, Beers RJ (1967). Growth of *Bacillus Coagulans* in Chemically Defined Media. *J Bacteriol* 94 (3): 517–21. <https://doi.org/10.1128/jb.94.3.517-521.1967>.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P (2013). The Bacillus Subtilis Endospore: Assembly and Functions of the Multilayered Coat. *Nat Rev Microbiol* 11 (1): 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>.
- Poormontaseri M, Ostovan R, Berizi E, and Hosseinzadeh S (2017). Growth Rates of Bacillus Species Probiotics Using Various Enrichment Media. *International Journal of Nutrition Sciences* 2 (1): 39–42.
- Sinnelä MT, Park YK, Lee JH, Jeong KC, Kim YW, Hwang HJ, & Mah JH (2019). Effects of Calcium and Manganese on Sporulation of Bacillus Species Involved in Food Poisoning and Spoilage. *Foods (Basel, Switzerland)* 8 (4). <https://doi.org/10.3390/foods8040119>.
- Steingard CH, Pinochet-Barros A, Wendel BM, Helmann JD (2023). Iron Homeostasis in Bacillus Subtilis Relies on Three Differentially Expressed Efflux Systems. *Microbiology* 169 (1): 001289. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001289>.
- Tolieng V, Nuhwa R, Thongchul N, and Tanasupawat S (2018). Characterization of Lactic Acid Producing Bacillus Coagulans Strains with Their Antibacterial Activity and L-Lactic Acid Production. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 42 (January):138–45. <https://doi.org/10.56808/3027-7922.2378>.
- De Vries YP. (2004). The Role of Calcium in Bacterial Spore Germination. *Microbes Environ.* 19. 199-202. [10.1264/jsme2.19.199](https://doi.org/10.1264/jsme2.19.199).
- Xu L, Zhan ZC, Du S, Wang S, Zhang Q, Wang C, Yang W, Deng X, Zhan Z, Li Y, Zhou Y, Chen X. (2023). Isolation, Functional Evaluation, and Fermentation Process Optimization of Probiotic Bacillus Coagulans. *PLoS One* 18 (11): e0286944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286944>.



## TÁC ĐỘNG CỦA CAO NẤM MEN VÀ ION $Ca^{2+}$ , $Fe^{3+}$ TỚI SỰ PHÁT TRIỂN VÀ TẠO BÀO TỬ CỦA *BACILLUS COAGULANS*

Cao Xuân Bách, Nguyễn Bảo Châu, Lã Thị Mỹ Hạnh, Đỗ Thị Yên,  
Nguyễn Văn Tuấn, Đinh Thị Mỹ Hằng, Nguyễn Thanh Thủy

Trung tâm Vi sinh vật Công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm, 301-Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

### TÓM TẮT

*Bacillus coagulans* đang được quan tâm nghiên cứu do có nhiều tiềm năng ứng dụng bào tử trong các sản phẩm probiotic. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men và ion  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  tới khả năng sinh trưởng và tạo bào tử của chủng *B. coagulans* VCIM5914 đã được quan tâm nghiên cứu. Mười hai mẫu cao nấm men từ nhà cung cấp đã được khảo sát cho thấy sự phụ thuộc lớn vào loại cao nấm men đến khả năng sinh trưởng và tạo bào tử. Nồng độ cao nấm men phù hợp có hiệu quả tới tự gia tăng của mật độ tế bào là  $\geq 7.5$  g/L, mật độ bào tử là  $\geq 12.5$  g/L. Sự có mặt của ion canxi  $\geq 0.2$  g/L làm tăng lên về số lượng tế bào và bào tử. Nồng độ ion sắt không làm tăng lên đáng kể về mật độ tế bào nhưng góp phần tăng tỷ lệ tạo bào tử ở nồng độ  $\geq 0.2$  g/L. Lên men trên thiết bị lên men với các điều kiện lên men đã lựa chọn cho mật độ tế bào  $\sim 5 \times 10^8$  CFU/mL với tỷ lệ 82% bào tử sau 28h nuôi cấy.

*Từ khóa:* *Bacillus coagulans*, ion canxi, lợi khuẩn, tạo bào tử, cao nấm men.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0904091093; Email: thuynt@firi.vn

## CỐ ĐỊNH KIM LOẠI NẶNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH VẬT TẠO KẾT TỦA CARBONATE BỞI *Priestia megaterium* ND22

Nguyễn Thị Hiền Trang\*, Nguyễn Thị Thảo, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Lê Thanh Hoàng, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Vũ Thanh Tùng, Đỗ Thị Tuyên

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Ô nhiễm kim loại nặng đang trở thành một vấn đề môi trường nghiêm trọng gây ra do sự phát triển nhanh chóng của nền công nghiệp. Các nhà khoa học đã sử dụng vi sinh vật để loại bỏ kim loại nặng thông qua thúc đẩy quá trình tạo kết tủa carbonate với kim loại. Kết tủa carbonate bởi vi sinh vật (Microbially induced carbonate precipitation - MICP) là một kỹ thuật thân thiện với môi trường và tiết kiệm năng lượng, một phương pháp đầy hứa hẹn cho các vấn đề ô nhiễm kim loại nặng. Vi khuẩn được sử dụng trong MICP thường là các vi khuẩn có khả năng thủy phân urea. Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá tiềm năng xử lý ô nhiễm kim loại nặng bằng MICP của chủng vi khuẩn thủy phân urea *Priestia megaterium* ND22 - đã được chúng tôi phân lập ở Việt Nam. Chủng *P. megaterium* ND22 đã được nuôi cấy với các kim loại nặng Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> cho thấy khả năng chống chịu được nồng độ kim loại từ 0,05-1 mg/ml. Đồng thời nghiên cứu cũng chứng minh *P. megaterium* ND22 có khả năng tạo kết tủa với các ion kim loại nghiên cứu với khối lượng kết tủa đạt từ 0,2-3,45 mg/ml phản ứng. Từ đó cho thấy tiềm năng của *P. megaterium* ND22 trong xử lý ô nhiễm kim loại nặng.

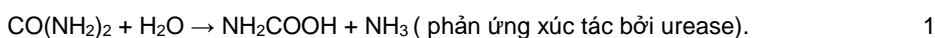
*Từ khóa:* MICP, urease, kim loại nặng, kết tủa carbonat, vi khuẩn thủy phân urea.

### MỞ ĐẦU

Kim loại nặng đã được hầu hết các cơ quan bảo vệ môi trường trên thế giới phân loại là chất ô nhiễm ưu tiên hàng đầu. Ô nhiễm kim loại nặng đang là mối đe dọa với môi trường và sức khỏe con người: làm tổn hại đến sức khỏe con người, làm giảm đa dạng sinh học, ảnh hưởng tới vi sinh vật biển và giảm hoạt động của vi sinh vật trong đất, gây độc cho cây trồng và động vật, ngoài ra còn làm giảm khả năng sinh sản của động vật. Các công nghệ hóa học và sinh học đã được sử dụng để giảm bớt ô nhiễm kim loại nặng trong đất và nước như: kết tủa hóa học, đông tụ, keo tụ, lọc, thẩm thấu ngược, trao đổi ion, hấp thụ sinh học hiếu khí và phân hủy vi sinh vật kỵ khí. Trong đó quá trình hấp thụ sinh học nhận được sự chú ý đặc biệt vì hiệu quả của nó trong việc loại bỏ kim loại từ các môi trường khác nhau với chi phí thấp và thân thiện với môi trường. Cơ chế của kết tủa kim loại nặng do vi sinh vật chính là quá trình tạo kết tủa canxit bởi vi sinh vật (Microbially induced carbonate precipitation - MICP). Quá trình này nhận được rất nhiều sự quan tâm từ cả lý thuyết và quan điểm thực tế, kim loại nặng sẽ được loại bỏ bằng cách đưa chúng vào các khoáng chất carbonate kết tủa nhờ sự can thiệp của vi sinh vật.

Kết tủa carbonate do vi sinh vật (Microbially induced carbonate precipitation – MICP) đã được áp dụng thành công trong việc khử ô nhiễm chất thải mỏ, cô lập và thụ động hóa các kim loại nặng vào mạng canxit. MICP cũng đã được sử dụng để xử lý các kim loại nặng hòa tan chứa kim loại nặng gây ô nhiễm nước ngầm và đất nông nghiệp bằng cách giảm các kim loại nặng hòa tan ngăn chặn việc chuyển kim loại từ bùn sang đất (Zeng *et al.*, 2023). Peng và đồng tác giả cũng đã chứng minh tính hiệu quả của MICP đối với khử nhiễm kim loại nặng trong đất và nước (Peng *et al.*, 2020). Cô lập bền vững các kim loại độc hại bằng đồng kết tủa carbonate là phương pháp tiềm năng hiệu quả và thân thiện với môi trường.

Nguyên tắc cơ bản của việc áp dụng MICP cho cố định kim loại nặng là sử dụng vi khuẩn thủy phân urea xúc tác cho quá trình thủy phân urea giải phóng ra hydroxide và ammonium. Khi urea được đưa vào dung dịch vi khuẩn, ammonium và carbon hữu cơ hòa tan được giải phóng xung quanh vi khuẩn tạo ra môi trường kiềm và quá bão hòa cục bộ xung quanh tế bào dựa trên phương trình hóa học được trình bày (phương trình 1-5. Cùng với sự hiện diện của các ion kim loại tích điện dương (cation) bị hút vào thành tế bào vi khuẩn tích điện âm dẫn đến kết tủa carbonate kim loại (MCO<sub>3</sub>) thành dạng rắn (phương trình 6-7).





### Phương trình kết tủa của ion kim loại nặng ( $\text{M}^{2+}$ : cation kim loại)

Kết tủa kim loại nặng là kết quả của nhiều cơ chế, trải dài từ các phản ứng hóa học thuần túy đến một quá trình trung gian bởi các vi sinh vật (Llera *et al.*, 2021). Wang và đồng tác giả tổng hợp các nghiên cứu về kết tủa carbonate kim loại nặng do vi sinh vật và đề xuất để các nghiên cứu có thể áp dụng vào thực tế, điểm quan trọng nhất cần xem xét vẫn là lựa chọn được một vi sinh vật phù hợp có khả năng tạo ra một lượng lớn kết tủa carbonate kim loại nặng (Wang *et al.*, 2018).

Trong các nghiên cứu trước chúng tôi đã lựa chọn ra được một số chủng có hoạt tính urease trong đó có chủng *Priestia megaterium* ND22 có tiềm năng tạo kết tủa carbonate kim loại nặng (Nguyễn Thị Hiền Trang *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá hiệu quả xử lý 5 loại kim loại nặng Ni, Cu, Fe, Zn, Pb bằng vi khuẩn *Priestia megaterium* ND22.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng giống: Chủng *Priestia megaterium* ND22 có khả năng thủy phân urea lưu trữ ở Phòng Công nghệ sinh học Enzyme - Viện Công nghệ sinh học.

Hóa chất: Thuốc thử Nessler và Urea từ Sigma. Cao nấm men, cao thịt, Pepton từ Biobasic. Một số muối kim loại nặng  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  tinh khiết từ Trung Quốc.

Môi trường LB: 1% w/v Pepton, 1% w/v NaCl, 0,5% w/v cao nấm men.

### Nuôi cấy vi sinh vật

Chủng *P. megaterium* ND22 bảo quản ở  $-84^\circ\text{C}$  được ria hoạt hóa trên đĩa môi trường LB agar và ủ qua đêm ở  $37^\circ\text{C}$ . Khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa được tiếp tục hoạt hóa nuôi trong môi trường LB, lắc 200 rpm/phút ở  $37^\circ\text{C}$  để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

### Xác định hoạt tính urease

Theo phương pháp của (Nakano *et al.*, 1984) cải tiến được tiến hành như sau: hỗn hợp phản ứng gồm dung dịch 100  $\mu\text{l}$  enzyme và dung dịch cơ chất (250  $\mu\text{l}$  chứa 500 mM urea trong 20 mM đệm Tris (pH 7,5); bổ sung 20 mM đệm Tris (pH 7,5) đến thể tích cuối cùng là 500  $\mu\text{l}$  và ủ 10 phút ở  $37^\circ\text{C}$ . Phản ứng được kết thúc bằng cách thêm 50  $\mu\text{l}$  5% TCA. Sản phẩm ammonia tạo ra được xác định bằng thuốc thử của Nessler, phản ứng màu gồm 0,2 ml dịch phản ứng + 0,7 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1ml thuốc thử Nessler ( $\text{K}_2\text{HgI}_4$ ) được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và đo ở bước sóng 480 nm. Hàm lượng ammonia được xác định dựa vào đường chuẩn được xây dựng bằng cách pha dung dịch muối ammonia sulphate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  trong nước cất với nồng độ chuẩn khác nhau (1mol  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tương ứng với 2 mol  $\text{NH}_3$ ). Phản ứng màu được thực hiện như bước 2 của xác định hoạt độ, sau đó đo độ hấp phụ tại bước sóng 480 nm. Mối tương quan giữa độ hấp phụ quang và nồng độ ammonia chuẩn được xây dựng bằng chương trình Excel.

Theo phương pháp này urease thủy phân urea thành carbon dioxide và ammonia. Một đơn vị hoạt độ của enzyme được xác định là một lượng thủy phân tạo ra  $1\mu\text{mol}$  của ammonia mỗi phút trong điều kiện thí nghiệm.

$$\text{Hoạt tính urease (U/ml)} = \mu\text{mol của ammonia} / t \text{ phản ứng (phút)}$$

### Xác định khả năng kháng kim loại nặng

Các ion kim loại nặng  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ muối kim loại ( $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) tăng dần từ 0,001-5 mg/mL. Chủng vi khuẩn được nuôi lắc trong các môi trường này ở  $37^\circ\text{C}$  trong 24h và quan sát khả năng sinh trưởng của vi khuẩn.

### Phản ứng tạo kết tủa với ion kim loại

Phản ứng tạo kết tủa và kiểm tra lượng kết tủa được tạo thành được tiến hành tương tự như mô tả của (Jalilvand *et al.*, 2019). Chủng vi khuẩn khảo sát cùng với chủng đối chứng âm *E. coli* (không có hoạt tính urease) được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung cơ chất urea (2 g/L), sau 48h nuôi lắc dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển sang ống eppendorf (2 ml dịch nuôi/ 1 ống) để tiến hành phản ứng kết tủa với kim loại: ống thí nghiệm (TN) và đối chứng (ĐC) được bổ sung 0,5-5 mg/mL các muối kim loại khảo sát (tương đương với nồng độ 0,004-0,4 M  $\text{NiCl}_2$ ; 0,003-0,03 M  $\text{FeCl}_3$ ;  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  và 0,0015-0,015 M  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). Phản ứng diễn ra trong 24h ở  $37^\circ\text{C}$ , sau đó các ống được ly tâm tốc độ cao 12500 vòng/phút trong 15 phút loại dịch thu cạn, cạn chứa kết tủa được sấy khô ở  $37^\circ\text{C}$  trong 48 h và được cân kiểm tra. Khối lượng kết tủa kim loại thu được do vi khuẩn thủy phân urea sẽ được tính sau khi trừ đi khối lượng đối chứng âm ở điều kiện tương đương. ( $M_{\text{kết tủa}} = M_{\text{TN}} - M_{\text{ĐC}}$ )

**Chụp ảnh kết tủa tạo thành bằng kính hiển vi quét**

Kết tủa thu được từ phản ứng của dịch nuôi cấy vi khuẩn với kim loại nặng được phơi khô ở tủ ẩm 37°C, sau đó được chụp và phân tích bằng kính hiển vi quét Quanta 450 tại trường Đại học Mở địa chất-Hà Nội.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Nuôi cấy và kiểm tra hoạt tính thủy phân urea của *Priestia megaterium* ND22**

Chủng *Priestia megaterium* ND22 bảo quản ở -84°C sau khi hoạt hóa được nuôi cấy trong môi trường LB thu tế bào để kiểm tra hoạt tính thủy phân urea theo phương pháp đã mô tả ở trên. Kết quả cho thấy hoạt tính urease đạt  $21,99 \pm 0,66$  U/ml, với hàm lượng protein tổng số đạt  $0,913 \pm 0,026$  mg/ml. Hoạt tính urease thu được từ *P. megaterium* ND22 tương đương với hoạt tính urease của *S. pasteurii* (20,7 U/ml) một chủng vi khuẩn đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu MICP (Lapierre & Huber, 2024), cao hơn so với *Staphylococcus xylosus* (2,36 U/ml) sau khi đã tối ưu (He *et al.*, 2022).

Urease là enzyme chìa khóa cho sự tạo thành kết tủa carbonate. Các nghiên cứu trước đó đã chỉ ra tốc độ phản ứng và hiệu suất kết tủa được quyết định bởi hoạt tính urease (Konstantinou *et al.*, 2021). Do đó với hoạt tính urease cao, *P. megaterium* ND22 được đánh giá là chủng có tiềm năng trong cảm ứng quá trình kết tủa kim loại.

**Đánh giá khả năng kháng kim loại nặng**

**Bảng 1. Khả năng *P. megaterium* ND22 chống chịu với kim loại nặng**

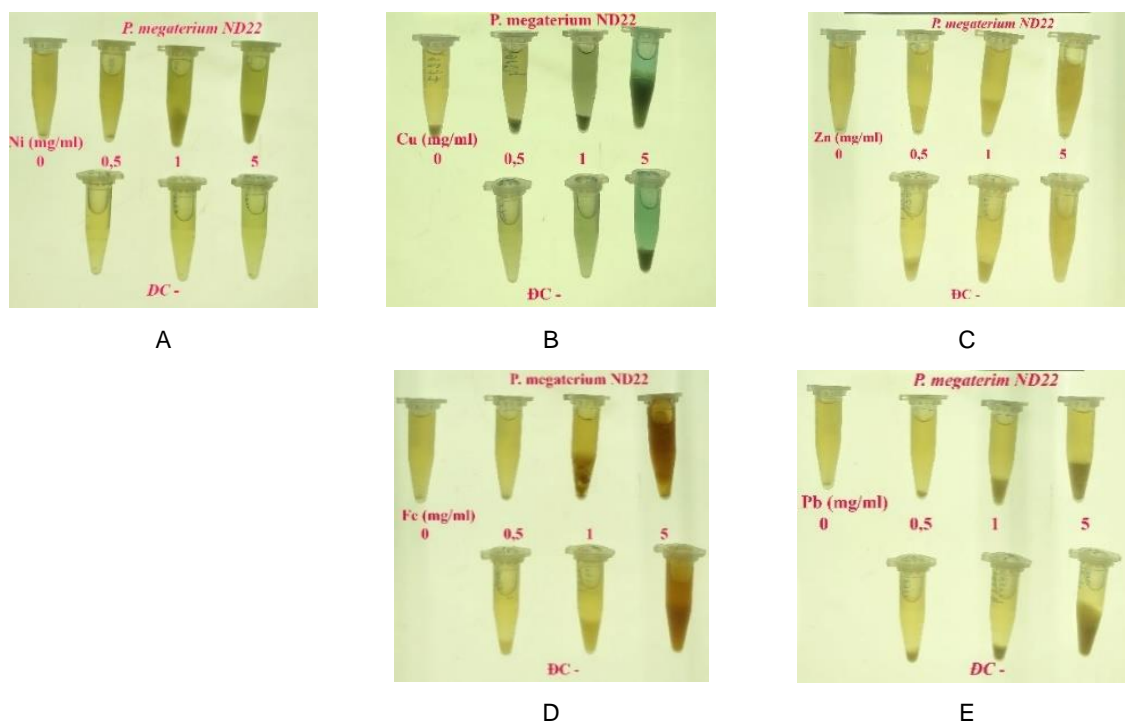
Kim loại	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>
Nồng độ kim loại (mg/ml)					
0,001	+	+	+	+	+
0,002	+	+	+	+	+
0,005	+	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+	+
0,1	+	+	-	-	+
0,2	+	+	-	-	+
0,5	-	+	-	-	+
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-

Có sinh trưởng +;  
Không sinh trưởng -

Sự tồn tại và hoạt động của vi khuẩn trong quá trình MICP bị ảnh hưởng bởi độc tính của kim loại nặng, việc sử dụng các chủng có khả năng chống chịu với các kim loại độc là cần thiết để tăng hiệu quả của quá trình khoáng hóa sinh học ở các vị trí bị ô nhiễm. Do đó chủng ND22 được đánh giá khả năng kháng một số ion kim loại Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> bằng cách bổ sung muối kim loại với nồng độ tăng dần từ 0,001- 5 mg/mL vào môi trường nuôi cấy, kết quả cho thấy *P. megaterium* ND22 có khả năng sinh trưởng tốt với cả 5 kim loại ở nồng độ ≤ 0,05 mg/mL, không sinh trưởng được ở nồng độ từ 0,1 mg/mL Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>; 0,5 mg/mL Ni<sup>2+</sup>, 1 mg/mL Cu<sup>2+</sup>, 2 mg/mL Fe<sup>2+</sup>. Như vậy *P. megaterium* ND22 có khả năng chống chịu với cả 5 kim loại nặng nghiên cứu trong đó kháng tốt nhất với Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> và Ni<sup>2+</sup> (Bảng 1).

**Đánh giá khả năng tạo kết tủa**

Phản ứng tạo kết tủa bằng MICP được thực hiện như đã mô tả ở phần phương pháp. Sau 1 ngày ủ phản ứng ở nhiệt độ phòng có thể quan sát được hiện tượng kết tủa ở tất cả 5 kim loại nghiên cứu (Hình 1). Ở nồng độ kim loại cao hơn, lượng kết tủa hình thành nhiều hơn. Bên cạnh sự kết tủa carbonate do MICP, còn có hiện tượng kết tủa hóa học thông thường do kim loại phản ứng với một số thành phần trong môi trường được quan sát thấy ở đối chứng âm.



Hình 1. Phản ứng tạo kết tủa giữa dịch nuôi cấy *P. megaterium* ND22; *E coli* (ĐC-) và các muối kim loại (A: Ni<sup>2+</sup>; B: Cu<sup>2+</sup>; C: Zn<sup>2+</sup>; D: Fe<sup>3+</sup>; E: Pb<sup>2+</sup>)

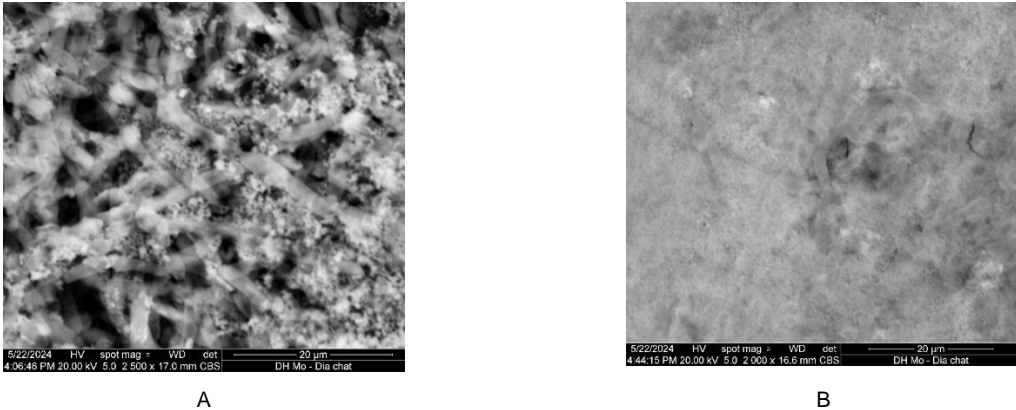
Sau 24h phản ứng, kết tủa thu được sẽ được làm khô và cân bằng cân phân tích và được tính như đã mô tả ở phần phương pháp. Khối lượng kết tủa thu được do phản ứng MICP được thể hiện ở Bảng 2 cho thấy *P. megaterium* ND22 có khả năng thúc đẩy quá trình tạo kết tủa với cả 5 kim loại nghiên cứu, hiệu quả nhất với Cu và Ni. Ở nồng độ kim loại thấp (0,5-1 mg/ml) với lượng kết tủa tạo thành thấp cần thiết bị có độ nhạy cao hơn để xác định. Kết quả này cũng tương đối khả quan khi so sánh với nghiên cứu của Wu và đồng tác giả kết tủa sắt bằng MIP bởi *Sporosarcina pasteurii* thu được 1,17 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> từ 2 ml phản ứng. (Wu *et al.*, 2021).

Bảng 2. Khối lượng kết tủa thu được do phản ứng MICP của *P. megaterium* ND22 với ion kim loại nặng

Kim loại	Nồng độ kim loại		Khối lượng kết tủa (mg/1 ml phản ứng)
	mg/ml	M	
Ni <sup>2+</sup>	0,5	0,004	0
	1	0,008	0
	5	0,039	1,55±0,07
Cu <sup>2+</sup>	0,5	0,003	0
	1	0,006	0,75±0,07
	5	0,031	3,45±0,21
Zn <sup>2+</sup>	0,5	0,003	0
	1	0,006	0
	5	0,03	1
Pb <sup>2+</sup>	0,5	0,0015	0
	1	0,003	0
	5	0,015	0,2
Fe <sup>2+</sup>	0,5	0,003	0
	1	0,006	0
	5	0,03	0,9±0,14

Phản ứng với hai kim loại  $Ni^{2+}$  và  $Cu^{2+}$  có khối lượng kết tủa cao nhất được gửi đi phân tích bằng kính hiển vi quét (SEM). Hình ảnh chụp SEM đã cho thấy đám kết tủa kim loại được hình thành bao quanh tế bào vi khuẩn (Hình 2). Như vậy vi khuẩn đã cố định kim loại thành khoáng chất carbonated, chuyển kim loại từ dạng hòa tan sang dạng không hòa tan, giảm khả năng di chuyển của chúng trong môi trường đó đó giảm dần độc tính của chúng.

*P. megaterium* (*B. megaterium*) đã được báo cáo có khả năng làm bền vật liệu xây dựng thông qua quá trình MICP (Dhami *et al.*, 2014). Bên cạnh đó *P. megaterium* cũng được công bố là chủng có khả năng chống chịu hấp thụ tốt các kim loại  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $As^{2+}$  (Guzman-Moreno *et al.*, 2022). Điều này là cơ sở cho thấy tiềm năng của *P. megaterium* ND22 trong ứng dụng kết tủa kim loại bằng MICP.



Hình 2. Hình ảnh kết tủa kim loại (A: Ni; B: Cu) do phản ứng MICP của *P. megaterium* ND22 với ion kim loại

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá khả năng chống chịu cũng như khả năng tạo kết tủa với các kim loại  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  của chủng ureolytic *P. megaterium* ND22 phân lập tại Việt Nam. *P. megaterium* ND22 có khả năng chống chịu với cả 5 kim loại nghiên cứu ở nồng độ 0,1-1 mg/mL, cũng như có khả năng thúc đẩy quá trình MICP tạo kết tủa với cả 5 kim loại với mức độ khác nhau tốt nhất với  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ . Kết quả bước đầu cho thấy tính khả thi của việc xử lý sinh học ô nhiễm kim loại nặng bằng MICP cũng như tiềm năng ứng dụng của *P. megaterium* ND22. Tuy nhiên cần thêm nhiều nghiên cứu tối ưu quá trình sinh học và hóa học trong tạo kết tủa nâng cao hiệu suất trong ứng dụng.

**Lời cảm ơn:** Đề tài thuộc “Nhiệm vụ khoa học công nghệ cho cán bộ công đoàn viên Viện Công nghệ sinh học” Nhóm đề tài xin được cảm ơn Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Phòng Công nghệ sinh học Enzyme đã hỗ trợ về kinh phí và trang thiết bị.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dhami NK, Reddy MS, & Mukherjee A (2014). Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. *Front Microbiol* 5: 304.
- Guzman-Moreno J, Garcia-Ortega LF, Torres-Saucedo L, Rivas-Noriega P, Ramirez-Santoyo RM, Sanchez-Calderon L, *et al.* (2022). *Bacillus megaterium* HgT21: a promising metal multiresistant plant growth-promoting bacteria for soil bioremediation. *Microbiol Spectr* 10: e0065622.
- He Y, Zhao Y, Zhang W, Zhang Y, & Zou Y (2022). Optimization of urease production capacity of a novel salt-tolerant *Staphylococcus xylosus* strain through response surface modeling. *Sustainability* 14: 13623.
- Jalilvand N, Akhgar A, Alikhani HA, Rahmani HA, & Rejali F (2019). Removal of heavy metals zinc, lead, and cadmium by biomineralization of urease producing bacteria isolated from Iranian mine calcareous soils. *J Soil Sci Plant Nutr* 20: 206-219.
- Konstantinou C, YuzeWang, Biscontin G, & Soga K (2021). The role of bacterial urease activity on the uniformity of carbonate precipitation profiles of bio-treated coarse sand specimens. *Scientific Reports* 11:6161.
- Lapierre FM, & Huber R (2024). Feeding strategies for *Sporosarcina pasteurii* cultivation unlock more efficient production of ureolytic biomass for MICP. *Biotechnol J* 19: e2300466.
- Llera AR, Jimenez A, & Fernández-Díaz L (2021). Removal of Pb from water: The effectiveness of gypsum and calcite mixtures. *Mineral* 11: 66.
- Nakano H, Takenishi S, & Watanabe Y (1984). Purification and properties of urease from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agric Bio Chem* 48: 1495-1502.
- Nguyễn Thị Hiền Trang, Nguyễn Thị Thảo, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Lê Thanh Hoàng, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Vũ Thanh Tùng và cộng sự. Phân lập vi khuẩn thủy phân urea tạo kết tủa carbonate có tiềm năng xử lý kim loại nặng. Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2023:253-258.

Peng D, Qiao S, Luo Y, Ma H, Zhang L, Hou S, *et al.* (2020). Performance of microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Cd in water and soil. *J Hazard Mater* 400: 123116.

Wang M, Wu S, Yang Y, & Chen F (2018). Microbial induced carbonate precipitation and its application for immobilization of heavy metals: a review. *Res Environ Sci* 31: 206–214.

Wu Y, Zhao G, & Qi H (2021). Precipitation of magnetic iron oxide induced by *Sporosarcina pasteurii* cells. *Microorganisms* 9.

Zeng Y, Chen Z, Lyu Q, Cheng Y, Huan C, Jiang X, *et al.* (2023). Microbiologically induced calcite precipitation for in situ stabilization of heavy metals contributes to land application of sewage sludge. *J Hazard Mater* 441: 129866.

## IMMOBILIZATION OF HEAVY METALS VIA MICROBIAL INDUCED CARBONATE PRECIPITATION BY *Priestia megaterium* ND22

**Nguyen Thi Hien Trang\***, Nguyen Thi Thao, Nguyen Thi Anh Tuyet, Le Thanh Hoang, Nguyen Sy Le Thanh, Vu Thanh Tung, Do Thi Tuyen

*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Heavy metals contamination is a serious environmental problem that has increased because of rapid industrial development. Scientists have been using microorganisms to remove heavy metals from contaminated environments through a process called microbially induced calcite precipitation. Microbially induced carbonate precipitation (MICP) is an environmental-friendly and energy-saving technique, and can provide a promising solution to heavy metal pollution issues. The ureolytic bacteria are commonly used for MICP. In this study, we evaluate the potential to treat heavy metal pollution by MICP using *Priestia megaterium* ND22 - a ureolytic bacterial strain isolated in Vietnam. The *P. megaterium* ND22 strain was cultured with heavy metals and could withstand heavy metals Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ranging from 0.05-1 mg/ml. Moreover, the study also demonstrated that *P. megaterium* ND22 can precipitate heavy metal ions, with dry weights of Ni, Cu, Zn, Pb, and Fe precipitation attached from 0.2 to 3.45 mg/ 1ml reaction solution. From the study, it was concluded that *P. megaterium* ND22 shows relatively high potential for the treatment of heavy metal contamination.

**Keywords:** MICP, urease, heavy metal, carbonate precipitation, ureolytic bacteria.

---

\* Author for correspondence: Tel: 02437568260; Email: nthientrang@ibt.ac.vn

# NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY HAI PHA CHO SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY CAO ASTAXANTHIN TỪ VI TẢO LỤC *Haematococcus pluvialis* HB THEO ĐỊNH HƯỚNG LÀM THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE CHO NGƯỜI

Nguyễn Cẩm Hà<sup>1</sup>, Lê Thị Thơm<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Đạt<sup>1,3</sup>,  
Lê Anh Huy<sup>1</sup>, Ngô Thị Hoài Thu<sup>1</sup>, Đặng Diễm Hồng<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

## TÓM TẮT

Vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* là nguồn cung cấp astaxanthin tự nhiên có giá trị cao. Astaxanthin đang được sử dụng như một thành phần dinh dưỡng, phụ gia thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm trên toàn cầu. Việc nuôi trồng vi tảo lục *H. pluvialis* giàu astaxanthin được tiến hành theo quy trình nuôi cấy hai pha. Pha một, tảo được nuôi ở điều kiện thích hợp cho quá trình sinh trưởng và pha hai, tảo được chuyển vào nuôi ở các điều kiện bất lợi (thiếu về dinh dưỡng, ánh sáng cao, nhiệt độ cao v.v) để cho tích lũy astaxanthin. Trong bài báo này, kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố nuôi cấy khác nhau lên sinh trưởng của chủng *H. pluvialis* HB trong bình nhựa 10 L để đạt được mật độ tế bào cao nhất ở pha một, tích lũy astaxanthin cao ở pha hai và tách chiết astaxanthin bằng dầu thực vật sẽ được trình bày. Ở pha một, mật độ tế bào đạt cao nhất là  $4,14 \times 10^6$  TB/mL ở ngày nuôi thứ 20 với điều kiện chiếu sáng là 16: 8 giờ (sáng: tối) với 10 giờ ở cường độ ánh sáng cao  $85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  và 6 giờ kết hợp cường độ ánh sáng cao và tia cực tím ( $30 \mu\text{mol} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) cùng với phương thức nuôi cấy perfusion. Khi chuyển giai đoạn sang pha hai, dưới điều kiện bổ sung 100 mM bicarbonate, chủng HB chuyển giai đoạn từ tế bào sinh dưỡng sang tế bào cyst trong 5 ngày và hàm lượng astaxanthin tích lũy đạt 39,6 mg/g sinh khối khô. Ngoài ra, astaxanthin tách chiết từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB có hoạt tính chống oxy hóa cao với giá trị  $\text{IC}_{50}$  đạt 4,09 mg/ mL, đáp ứng tiêu chuẩn là nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

**Từ khóa:** Astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, hai giai đoạn, nuôi cấy perfusion, vi tảo lục.

## MỞ ĐẦU

Astaxanthin là một xanthophyll có sắc tố màu đỏ cam có tính chất hóa học độc đáo dựa trên cấu trúc phân tử của nó với hai nhóm hydroxyl và 11 liên kết đôi liên hợp trong chuỗi polyene (An *et al.*, 2024). Thị trường astaxanthin trên toàn cầu là 1,0 tỷ USD vào năm 2019 và dự đoán sẽ tăng với tốc độ tăng trưởng kép lên 3,4 tỷ USD vào năm 2027. Astaxanthin tự nhiên có đặc tính chống oxy hóa rất mạnh và được ứng dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Khả năng chống oxy hóa của astaxanthin tự nhiên lần lượt lớn hơn 500 lần và 38 lần so với vitamin E và  $\beta$ -carotene (An *et al.*, 2024). Astaxanthin tự nhiên có nguồn gốc từ vi khuẩn biển, nấm men, thực vật bậc cao và vi tảo, trong đó vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* là nguồn astaxanthin tự nhiên dồi dào nhất. Tế bào *H. pluvialis* có dạng hình cầu, chứa lục lạp, có hai roi nên chúng có khả năng di chuyển trong giai đoạn tế bào sinh dưỡng (An *et al.*, 2024). Trong giai đoạn đầu tiên, các tế bào liên tục phân chia vì vậy cần nhiều dinh dưỡng, các tác nhân như cường độ ánh sáng, nhiệt độ và pH đều có ảnh hưởng tới sinh trưởng của tảo. Rizzo và đồng tác giả (2022) đã thông báo về quy trình nuôi cấy hai giai đoạn nhằm đạt được sinh trưởng cao nhất (pha 1) và tích lũy astaxanthin cao nhất (pha 2) đối với chủng *H. pluvialis* CCAP 34/1D. Ở pha 1, urê là nguồn nitơ cho chủng CCAP 34/1D sinh trưởng cao nhất đạt  $4,98 \times 10^5$  TB/ mL. Ở pha 2, cảm ứng tích lũy astaxanthin đạt được cao nhất là  $0,711 \pm 0,143$  mg/g sinh khối khô (SKK) dưới điều kiện bất lợi về ánh sáng cao, hạn chế nitơ và có mặt natri axetat với nồng độ 0,25% (Rizzo *et al.*, 2022). Pereira và Otero (2020) đã công bố sự tích lũy astaxanthin liên quan đến sự phá vỡ cân bằng nội môi, khiến các tế bào phải tự bảo vệ chống lại các điều kiện bất lợi do suy giảm khả năng quang hợp của tế bào.

Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để tìm ra phương pháp tối ưu cho nuôi trồng vi tảo *H. pluvialis* với hàm lượng astaxanthin cao như phương thức nuôi quang tự dưỡng và dị dưỡng. Kết quả cho thấy khi nuôi dị dưỡng (sử dụng acetate như nguồn C), hàm lượng astaxanthin thấp 3-4 lần khi so với nuôi cấy quang tự dưỡng trong môi trường thiếu nitơ được bổ sung bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) hoặc  $\text{CO}_2$  liên tục và chiếu ánh sáng ở cường độ cao (Lưu Thị Tâm *et al.*, 2012). Hiện nay nuôi trồng *H. pluvialis* theo quy trình nuôi cấy 2 pha đã thu được nhiều kết quả nổi bật. Ở Việt Nam, một số công bố về *H. pluvialis* như tối ưu điều kiện nuôi trồng và tích lũy astaxanthin (ở môi trường có nồng độ nitrate cao và kết hợp với việc điều chỉnh chế độ chiếu sáng, làm mới môi trường đã được chứng minh là phương pháp hiệu quả cho mật độ tế bào (MĐTĐ) đạt cực đại là  $3,2 \times 10^6$  TB/mL sau



22 ngày nuôi ở môi trường RM-4X (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2012). Trong hệ thống bể phản ứng quang sinh (Photobioreactors-PBRs), sinh trưởng *H. pluvialis* đạt tối đa 40,74 g/m<sup>2</sup> và hàm lượng astaxanthin đạt 1,3% (w/w) sau 10 ngày nuôi cấy với ánh sáng từ đèn LED đỏ hoặc xanh (Do *et al.*, 2021). Các hệ thống PBRs có gắn màng sinh học ở quy mô nhỏ (0,05 m<sup>2</sup>) và quy mô lớn (2 m<sup>2</sup>) đã được thiết kế thành công để nuôi cấy *H. pluvialis* với năng suất SKK đạt 12 g/m<sup>2</sup>/ngày (có hàm lượng 3% astaxanthin) và 11,25 g/m<sup>2</sup>/ ngày (2,8% astaxanthin) sau 10 ngày nuôi cấy (Tran *et al.*, 2019). Trong quy trình nuôi cấy hai pha, việc tăng MĐTB tảo ở pha 1 và tìm ra yếu tố chính gây tích lũy astaxanthin ở pha cảm ứng là rất quan trọng để nâng cao hiệu quả sản xuất astaxanthin trong thời gian ngắn ở *H. pluvialis*. Vì vậy, trong bài báo này, kết quả nghiên cứu tối ưu điều kiện nuôi cấy hai pha để tích lũy astaxanthin cao và bước đầu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin tách chiết từ sinh khối vi tảo lục *H. pluvialis* HB sẽ được trình bày.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Vật liệu:** Chủng *Haematococcus pluvialis* HB được phân lập từ các hồ nước ngọt của tỉnh Hoà Bình, Việt Nam năm 2008 và được lưu giữ tại phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng này được nuôi cấy trên môi trường C dưới điều kiện nhiệt độ 25 °C, cường độ chiếu sáng 40 μmol/m<sup>2</sup>s, quang chu kỳ sáng:tối là 12:12 giờ, lắc bằng tay 2 lần/ngày.

### Phương pháp

**Xác định sinh trưởng của tảo:** Sinh trưởng của tảo được đánh giá thông qua MĐTB, SKK được xác định theo mô tả của Đặng Diễm Hồng (2019).

**Phương pháp tách chiết astaxanthin:** Sinh khối tảo khô được nghiền với cát thủy tinh nhằm phá vỡ tế bào theo phương pháp cơ học. Sau đó bột tảo được chiết với acetone 90% theo tỉ lệ 5 mg sinh khối: 10 mL dung môi, quá trình này được lặp lại 2 lần để chiết được astaxanthin lớn nhất, dịch chiết được đưa vào - 4°C hoặc giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, dịch chiết được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 5 phút bằng máy ly tâm Sorvall Legen RT 1900W (Kendro, Germany) và đo OD (mật độ quang) ở bước sóng 480 nm sau 24 hoặc 48 giờ tách chiết trên máy quang phổ UV-1601 (Shimadzu, Nhật Bản) để có hiệu suất tách chiết astaxanthin cao nhất. Hàm lượng sắc tố astaxanthin được xác định theo công bố của Strickland và Parson (1972).

**Lựa chọn môi trường thích hợp cho sinh trưởng của *Haematococcus pluvialis*.** Các môi trường được sử dụng trong thí nghiệm gồm RM, C, OHM, BG-11 cải tiến. **Thành phần môi trường RM** gồm (g/L): NaNO<sub>3</sub> - 300,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 80,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 20,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 10,0; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O - 58,5; EDTA - 7,5; NaCl - 20; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,3; MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O - 1,5; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,1; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. 4H<sub>2</sub>O - 0,3; CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O - 0,008; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O - 0,26; FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O - 17. **Thành phần môi trường C** gồm (mg/L): Trisaminomethane - 500,0; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> - 150,0; KNO<sub>3</sub> - 100,0; β-Na<sub>2</sub>glycerolphosphate - 50,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 40; EDTA-Na<sub>2</sub> - 2,71; MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O - 0,108; FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O - 5,888; Vitamin B<sub>12</sub> - 0,0001; Biotin - 0,0001; Thiamine-HCl - 0,01; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - 0,066; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O - 0,0075; CoCl. 6H<sub>2</sub>O - 0,012. **Thành phần môi trường OHM** (mg/L): KNO<sub>3</sub> - 410,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 30,0; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - 246,0; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O - 110,0; Vitamin B<sub>12</sub> - 0,0150; Biotin - 0,025; Thiamine - 0,0175; MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O - 0,98; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O - 0,12; CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O - 0,012; CoCl. 6H<sub>2</sub>O - 0,011; Fe (III)citrate H<sub>2</sub>O - 2,62; Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - 0,075; SeO<sub>2</sub> - 0,005. **Thành phần môi trường BG-11** gồm (mg/L): NaNO<sub>3</sub> - 1500,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 320; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - 200,0; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O - 36,0; axit citric - 6,0; ammonium ferric citrate - 6,0; EDTA-Na<sub>2</sub> - 1,0; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 100; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 2,86; MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O - 1,81; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,22; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O - 0,39; CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O - 0,08; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O - 0,05. Nuôi cấy tảo ở các bình tam giác 250 mL có chứa 150 mL môi trường, chiếu sáng 40 μmol/m<sup>2</sup>s, quang chu kỳ sáng: tối là 12:12 giờ, ở 28 °C, không sục khí và lắc bằng tay 2 lần/ngày. MĐTB nuôi cấy ban đầu là 6 x 10<sup>4</sup> TB/mL. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại ba lần. Lấy mẫu hai ngày một lần để xác định MĐTB và hàm lượng sắc tố.

**Ảnh hưởng kết hợp của chế độ chiếu sáng, nồng độ nitrat lên sinh trưởng *H. pluvialis* HB ở pha 1:** Thí nghiệm được thực hiện trong bình nhựa 10 L chứa 4 L môi trường RM. MĐTB ban đầu là 0,5 x 10<sup>6</sup> TB/mL, sục khí liên tục, ở 25 ± 0,5 °C. Có 3 công thức thí nghiệm là: (1) Đối chứng: Vi tảo được nuôi cấy trên môi trường RM - 4X (chứa nồng độ nitrat cao gấp 4 lần môi trường cơ bản RM) chiếu ánh sáng 50 μmol/m<sup>2</sup>s có chu kỳ sáng: tối là 12:12 giờ; (2) Thí nghiệm 1 (TN): Nuôi cấy tảo trong môi trường RM - 4X chiếu ánh sáng 85 μmol/m<sup>2</sup>s có chu kỳ sáng: tối là 16:8 giờ; (3) Thí nghiệm 2 (TN + UV): Vi tảo được chiếu ánh sáng cao 85 μmol/m<sup>2</sup>s kết hợp với tia cực tím (UV; cường độ 30 μmol/m<sup>2</sup>s) với chu kỳ sáng: tối là 16: 8 giờ. Thứ tự chế độ chiếu sáng là 5 giờ ánh sáng trắng cao, 6 giờ ánh sáng trắng kết hợp tia UV và cuối cùng là 5 giờ ánh sáng trắng cao. Khi thể tích dịch nuôi đã đạt tối đa (5 L) so với bình nuôi, tiến hành kỹ thuật nuôi perfusion, trong điều kiện sục khí liên tục (tốc độ sục khí là 0,5 L/phút). Trong 7 ngày nuôi cấy đầu tiên, nuôi cấy perfusion được tiến hành như sau: 300 mL môi trường RM - 4X được bổ sung hàng ngày vào môi trường nuôi cấy ở tất cả các công thức. Sau đó, tế bào tảo của 300 mL dịch nuôi cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 5.000 vòng/ phút trong 5 phút. Sau đó, giữ lại tế bào và đưa chúng trở lại bình nhựa nuôi cấy bằng cách bổ sung 500 mL môi trường RM - 4X mới. Quá trình này được lặp lại cho đến khi MĐTB nuôi cấy không thay đổi (pha tĩnh trên đường cong sinh trưởng của vi tảo), nồng độ tế bào đạt cao mà không có sự thay đổi về hình thái, nhưng từ ngày nuôi thứ 16 tiến hành thu 1/3 thể tích môi trường nuôi cấy và ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, tế bào được giữ lại và sinh khối thu được hòa tan trở lại vào chai nhựa nuôi cấy. Để tiếp tục duy trì tế bào ở dạng sinh dưỡng với MĐTB cao và hình

thái tế bào không thay đổi, bổ sung 500 mL môi trường RM - 4X có nồng độ gấp 10 lần và hỗn hợp các vitamin như vitamin B1, vitamin H và vitamin B12 ở nồng độ 0,026; 1,0 và 0,02 mg/L, tương ứng, cho đến khi thể tích nuôi cấy cuối cùng bằng thể tích ban đầu.

**Ảnh hưởng của nồng độ bicacbonat lên khả năng tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* HB ở pha 2:** Các tế bào sinh dưỡng của *H. pluvialis* HB trong giai đoạn sinh trưởng được cô đặc bằng lắng tự nhiên nhằm tạo ra sự tích lũy astaxanthin. Sau khi kết thúc pha 1, MĐTB đạt được cao nhất, các tế bào được giữ trong điều kiện lạnh (5-10°C) trong 2-3 tuần nhằm làm cạn kiệt dinh dưỡng trước khi bắt đầu chế độ cảm ứng astaxanthin. Ở pha 2, dịch tảo được pha loãng bằng nước máy tỷ lệ 1:6 (v:v) và bổ sung dung dịch muối natribicarbonate để đạt được nồng độ cuối cùng trong môi trường nuôi là 60, 80, 100, 120 và 160 mM. Ở pha này, tảo được nuôi cấy trong điều kiện sục khí liên tục (0,5 L/ phút) và chiếu sáng cao (85 μmol/m<sup>2</sup>s), chu kỳ sáng: tối là 16: 8 giờ trong 5 ngày. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

**Lựa chọn dung môi thích hợp cho tách chiết astaxanthin từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB:** Nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi đến quá trình tách chiết astaxanthin bao gồm: dầu neptune, oliu, palm (dầu cọ), soy bean (dầu đậu tương) và acetone 90%. Thí nghiệm được tiến hành tách chiết với 0,5 g sinh khối khô. Mỗi công việc lặp lại 3 lần. Hàm lượng astaxanthin được xác định theo phương pháp HPLC có dùng chất chuẩn tại Trung tâm Tiêu chuẩn đo lường chất lượng, Bộ Khoa học và công nghệ (Luu TT *et al.*, 2021).

**Xác định hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin bằng phương pháp DPPH:** Phân tích DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, purity 95%, Alfa Aesar, Japan) được thực hiện theo công bố của Dang và đồng tác giả (2023). Hỗn hợp phản ứng gồm 100 μL dung dịch DPPH 0,2 mM trong methanol và 100 μL astaxanthin (nồng độ 10-500 mg/L). Axit ascorbic (ở nồng độ 4, 20 và 100 μg/mL) được sử dụng làm đối chứng dương. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút; sau đó, độ hấp thụ của DPPH được đo ở bước sóng 517 nm để xác định khả năng khử gốc DPPH của chất chống oxy hóa. Mỗi thí nghiệm được tiến hành ba lần. Khả năng trung hoà gốc tự do (Scavenging – SA) sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\% SA = (OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) * 100 / OD_{\text{đối chứng}} (\%)$$

Trong đó: *OD*<sub>đối chứng</sub>: Độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử; *OD*<sub>mẫu thử</sub>: Độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử.

Giá trị IC<sub>50</sub> (Half maximal Inhibitory Concentration) được tính dựa vào đường chuẩn  $y = ax + b$ . Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu càng cao, thể hiện qua giá trị IC<sub>50</sub> loại bỏ gốc tự do càng nhỏ.

### Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA một thành phần ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$  bằng phần mềm SPSS 16.0.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

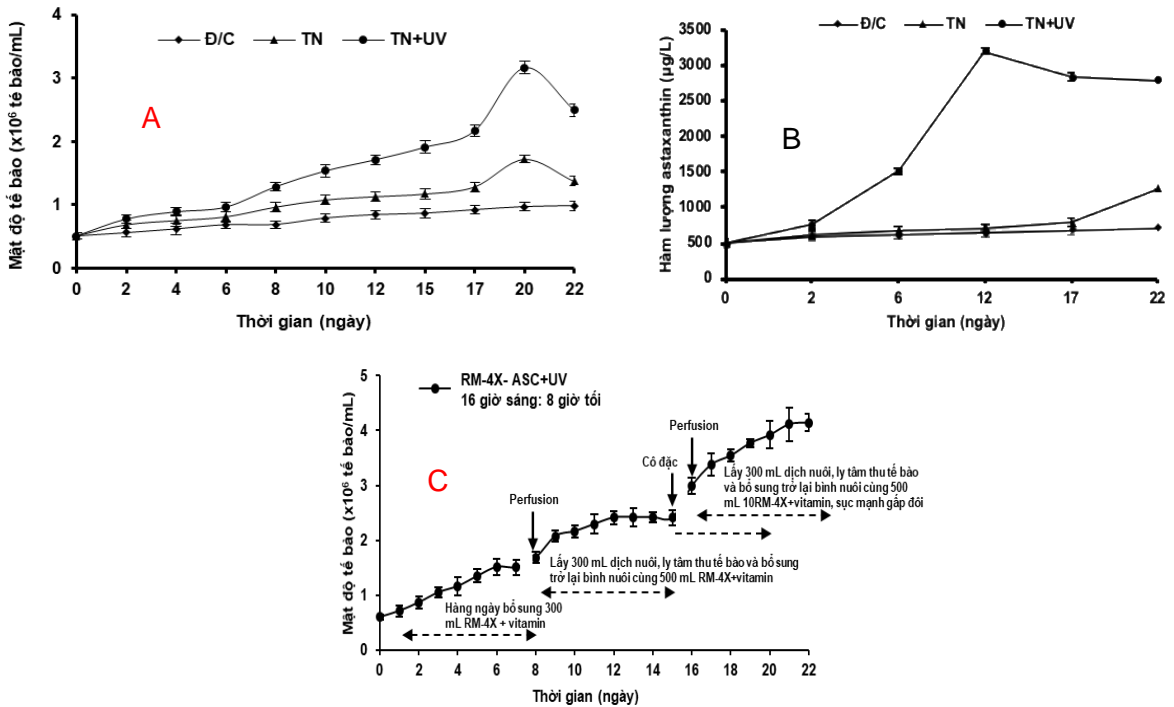
**Lựa chọn môi trường tối ưu cho nuôi trồng chủng HB:** Kế thừa các nghiên cứu trước về điều kiện nuôi trồng tối ưu của chủng HB là nhiệt độ 25°C, cường độ ánh sáng 2-5 klux và pH 7-9 (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2012; Lưu Thị Tâm *et al.*, 2012), chúng tôi tiếp tục khảo sát sinh trưởng của vi tảo ở 4 môi trường RM, C, OHM, BG-11 cho thấy chủng HB sinh trưởng tốt trong môi trường RM và C (Bảng 1). Kết quả Bảng 1 cho thấy sau 30 ngày nuôi cấy MĐTB, SKK, tốc độ sinh trưởng đặc trưng tối đa ở tảo đạt được là 51,286 x 10<sup>4</sup> TB/mL; 0,581 g/L và 0,071 μ/ngày. Ngoài ra, quá trình nuôi cấy từ ống nghiệm vào bình tam giác 250 mL bằng cách bổ sung 50% thể tích môi trường nuôi mới với tần suất 2 - 4 ngày/lần là cần thiết để duy trì tế bào phát triển ở pha sinh dưỡng trong thời gian dài. Môi trường C cũng là môi trường nuôi tốt cho sinh trưởng của loài tảo này tuy nhiên trong môi trường C có chứa β-Na<sub>2</sub>glycerolphosphate nên giá thành của môi trường này cao hơn khoảng 10 - 12 lần so với môi trường RM. Do vậy, khi tiến hành nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* HB trên các thể tích bình nuôi lớn hơn, môi trường RM vẫn là môi trường tối ưu nhằm giảm chi phí sản xuất sinh khối tảo giàu astaxanthin.

**Bảng 1. Sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* HB trong các môi trường nuôi khác nhau**

Môi trường	MĐTB ( x10 <sup>4</sup> TB/mL)	SKK (g/L)	Tốc độ sinh trưởng đặc trưng (μ/ngày)
RM	51,286± 2,867 <sup>a</sup>	0,581±0,004 <sup>a</sup>	0,071± 0,004 <sup>a</sup>
C	40,165± 3,752 <sup>b</sup>	0,455±0,008 <sup>b</sup>	0,031± 0,005 <sup>b</sup>
OHM	22,150± 2,712 <sup>c</sup>	0,251±0,005 <sup>c</sup>	0,049± 0,004 <sup>c</sup>
BG11 cải tiến	14,771± 3,210 <sup>c</sup>	0,136±0,002 <sup>c</sup>	0,037± 0,001 <sup>c</sup>

Ghi chú: Chữ cái a, b, c chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học giữa các công thức thí nghiệm ( $p < 0,05$ ). Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD (n = 3).

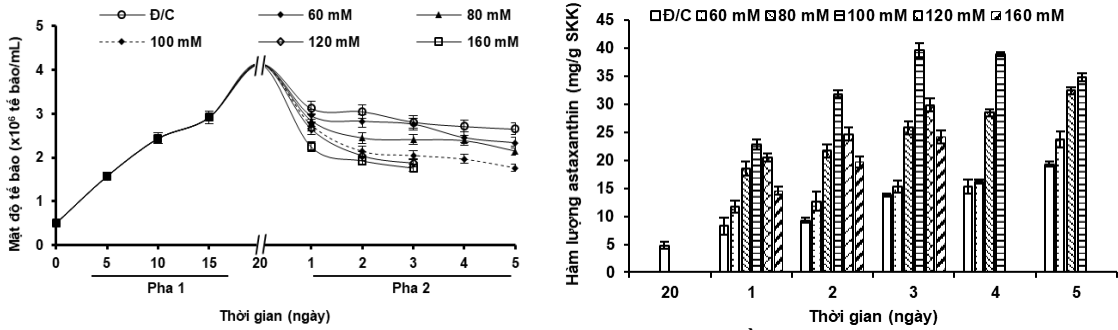
**Ảnh hưởng kết hợp chế độ chiếu sáng, nồng độ nitrate lên sinh trưởng của *H. pluvialis*:** Wong và đồng tác giả (2016) đã chỉ ra rằng chế độ và chất lượng chiếu sáng rất quan trọng cho sinh trưởng của tảo *H. pluvialis*. Kết quả ở Hình 1 chỉ ra rằng trong giai đoạn sinh trưởng, sự kết hợp thay đổi nồng độ nitrate và chế độ chiếu sáng được coi là hiệu quả, giúp tăng MĐTB của chủng HB ở giai đoạn sinh dưỡng. MĐTB cao nhất đạt  $3,16 \times 10^6$  TB/mL ở ngày nuôi thứ 20 dưới điều kiện chiếu sáng với chu kỳ sáng: tối 16: 8 giờ trong đó thời gian sáng là 10 giờ đối với cường độ ánh sáng cao ( $85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) và 6 giờ cường độ ánh sáng cao kết hợp với chiếu tia UV ( $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Ở điều kiện này, hàm lượng astaxanthin cao nhất đạt  $3.201 \mu\text{g}/\text{L}$  ở ngày nuôi thứ 12. Để tăng MĐTB tảo ở giai đoạn sinh dưỡng, môi trường RM - 4X được bổ sung bằng phương pháp nuôi cấy perfusion sau ngày nuôi thứ 16. Kết quả cho thấy, MĐTB sinh dưỡng của chủng HB tăng lên đáng kể khi nuôi ở công thức thí nghiệm (TN + UV) so với đối chứng (môi trường RM - 4X) có nồng độ cao gấp 10 lần, trong đó có bổ sung hỗn hợp vitamin theo phương thức "perfusion" với MĐTB cao nhất đạt  $4,14 \times 10^6$  TB/mL sau 22 ngày nuôi cấy. Viñegla và đồng tác giả (2006) đã công bố sinh trưởng tảo bị ảnh hưởng đáng kể bởi tia UV, đặc biệt là UV-A (320-400 nm) và UV-B (280-315 nm). UV-A cần thiết để điều hoà quá trình quang hợp và các enzyme chính tham gia vào quá trình chuyển hóa C và N ở *Fucus spiralis* và *Ulva olivascens* như carbonic anhydrase và nitrat reductase ngay cả khi có mặt ánh sáng và tia UV-B. Do đó bức xạ tia cực tím có thể hỗ trợ thúc đẩy sự phát triển của tảo (Viñegla *et al.*, 2006). Tuy nhiên, theo báo cáo của Cabello-Pasini và đồng tác giả, nồng độ nitrat cao làm giảm tác động bất lợi của bức xạ tia cực tím và tăng khả năng phục hồi của các enzyme chuyển hóa quan trọng (Cabello-Pasini *et al.*, 2011). Như vậy, việc kết hợp nhiều yếu tố bao gồm việc tăng hàm lượng nitrate trong môi trường nuôi, thay đổi quang chu kì của tảo trong đó bao gồm cả cường độ chiếu sáng, chất lượng ánh sáng và áp dụng kĩ thuật làm mới một phần môi trường trong quá trình nuôi trồng đã làm tăng MĐTB tảo, góp phần quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả sản xuất astaxanthin trong quy trình nuôi cấy hai pha loài vi tảo *H.pluvialis* HB.



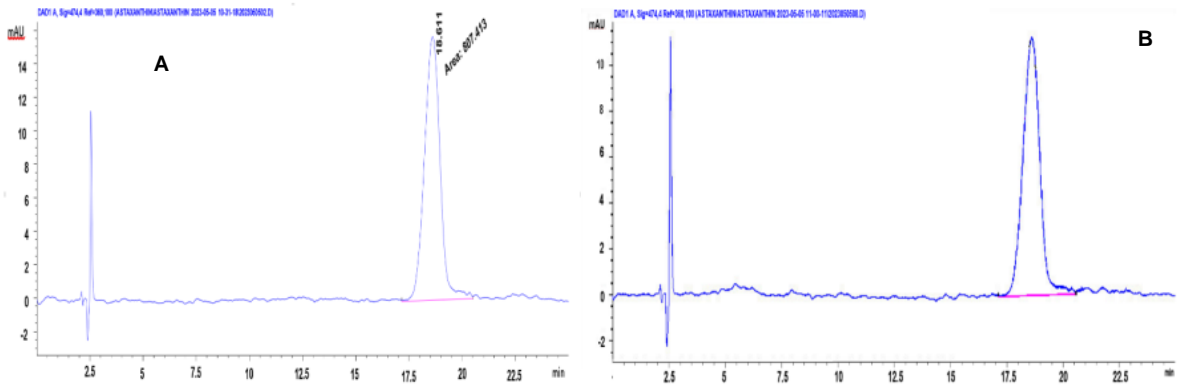
**Hình 1. Mật độ tế bào (A), hàm lượng astaxanthin (B) và mô hình nuôi cấy hai pha của *H. pluvialis* (C) dưới điều kiện kết hợp chế độ chiếu sáng, nồng độ nitrate và phương thức nuôi cấy perfusion**

**Ghi chú:** Đối chứng: *H. pluvialis* HB được nuôi cấy trong môi trường RM - 4X dưới ánh sáng  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  sáng: tối là 12:12 giờ; Thí nghiệm (TN): Nuôi cấy vi tảo trong môi trường RM - 4X dưới ánh sáng  $85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  có chu kỳ sáng: tối là 16: 8 giờ; (TN + UV): điều kiện chiếu sáng có cường độ  $85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  kết hợp tia cực tím (UV) ở cường độ  $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  với chu kỳ sáng: tối là 16:8 giờ.

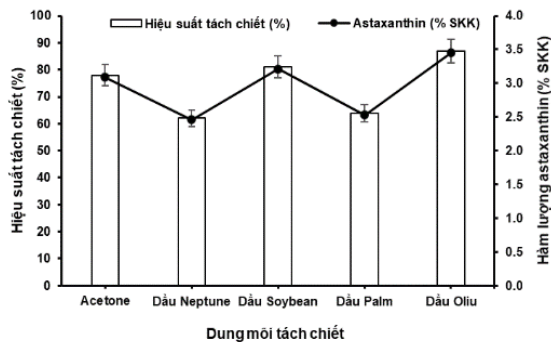
**Ảnh hưởng của nồng độ  $\text{HCO}_3^-$  đến sự tích lũy astaxanthin:** Tỷ lệ cacbon/nitơ (C/N) là một yếu tố quan trọng trong quá trình tích lũy astaxanthin ở *H. pluvialis*. Theo Erturk B và đồng tác giả (2019) chỉ ra rằng tăng tỷ lệ C/N bằng cách bổ sung bicarbonate vào môi trường nuôi giúp đẩy nhanh quá trình và tăng hiệu suất tích lũy astaxanthin. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm dùng bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) để cảm ứng mạnh sản xuất astaxanthin ở *H. pluvialis* HB kết hợp thiếu hụt chất dinh dưỡng. Ảnh hưởng của nồng độ bicarbonate trong môi trường nuôi cho thấy, tế bào tảo chủ yếu ở dạng cyst và tích lũy astaxanthin bên trong tế bào. Khi nồng độ bicarbonate tăng từ 0 lên 80 mM, hàm lượng astaxanthin trong tế bào cảm ứng tăng từ 4,76 lên 32,41 mg/g SKK và thời gian cảm ứng kéo dài là 5 ngày. Hàm lượng astaxanthin tối đa đạt được là 39,6 mg/g SKK khi bổ sung bicarbonate 100 mM. Khả năng tích lũy astaxanthin bị ức chế khi nồng độ bicarbonate lớn hơn 160 mM do dư thừa bicarbonate, độ kiềm của môi trường nuôi cao dẫn đến giảm sự phát triển của tảo cũng như sự tích lũy astaxanthin.



Hình 2. Sinh trưởng và tích lũy astaxanthin ở *H. pluvialis* HB dưới các nồng độ bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) khác nhau. Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD (n = 3).



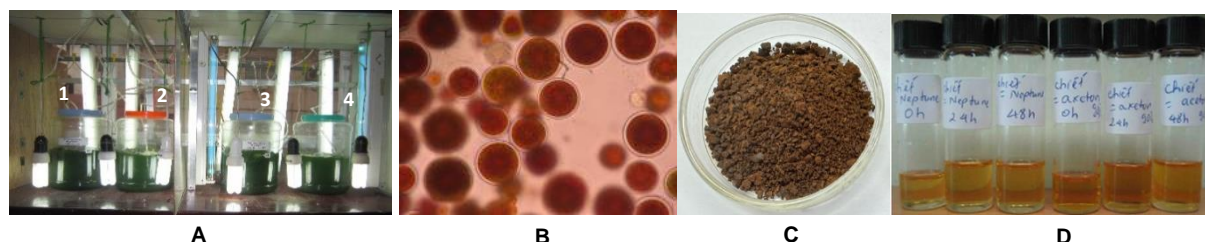
Hình 3. Sắc ký đồ astaxanthin chuẩn (A) và astaxanthin được tách từ sinh khối *H. pluvialis* HB (B)



Hình 4. Hiệu suất tách chiết và hàm lượng astaxanthin thu được từ sinh khối *H. pluvialis* HB ở các dung môi khác nhau

**Phân tích hàm lượng astaxanthin trong mẫu sinh khối *H. pluvialis* HB sau khi kết thúc pha hai:** Mẫu sinh khối chủng HB đã chuyển đồ được thu sinh khối và xác định hàm lượng astaxanthin đạt 3,96% SKK bằng phương pháp HPLC (Hình 3) có sử dụng astaxanthin chuẩn.

**Lựa chọn dung môi thích hợp cho tách chiết astaxanthin từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB:** Ảnh hưởng của các dung môi khác nhau (dầu neptune, oliu, palm (dầu cọ), soy bean (dầu đậu tương) và acetone 90%) đến quá trình tách chiết astaxanthin (Hình 4) đã cho thấy dầu oliu có hiệu suất tách astaxanthin là cao nhất (87%), tiếp đến là soy bean- dầu đậu tương (81%), acetone 90% (78%), palm- dầu cọ (64%) và cuối cùng là neptune (62%). Mẫu tảo có hàm lượng astaxanthin 3,96% SKK được xác định là 100%. Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Cũng theo công bố của Kang và Sim (2007) thì sử dụng các loại dầu thực vật thông thường thì astaxanthin tích lũy trong các tế bào nang hóa được chiết với hiệu suất thu hồi đạt trên 87,5 % (Kang và Sim, 2008). Đây được đánh giá là quy trình tối ưu để tách chiết astaxanthin trong ngành công nghiệp thực phẩm do sử dụng quy trình sinh học dung môi đơn giản do giảm bớt được giai đoạn thu hoạch tế bào. Tuy nhiên, giá thành của các loại dầu soy bean, dầu palm và dầu oliu cao hơn dầu neptune từ 1,2; 1,9 và 4,8 lần, tương ứng, và chúng thường khó mua tại thị trường Việt Nam. Chính vì vậy, sử dụng dầu neptune để tách chiết astaxanthin từ sinh khối chủng *H. pluvialis* HB sẽ có hiệu quả kinh tế hơn về giá thành khi tách chiết ở quy mô lớn.



**Hình 5. Ảnh minh họa nhân nuôi và tách chiết astaxanthin từ *H. pluvialis* HB**

Nhân nuôi tảo *H. pluvialis* HB ở pha 1 (A) (1 và 2: Bình thí nghiệm được chiếu ánh sáng cao, chu kì sáng: tối là 16: 8 giờ; 3 và 4: Bình thí nghiệm được chiếu ánh sáng cao và tia UV, chu kì sáng tối là 16:8 giờ); Nhân nuôi chủng HB ở pha 2 (B); Sinh khối tảo chủng HB ở pha 2 (C); Astaxanthin tách chiết bằng dầu thực vật từ sinh khối chủng HB (D).

**Hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin:** Việc sản xuất quá nhiều gốc tự do và giảm lượng chất chống oxy hóa trong cơ thể dẫn đến tăng nguy cơ tổn thương tế bào và là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh. Các hợp chất chống oxy hóa có trong vi tảo có thể ngăn chặn những tác dụng này (Dang *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này, astaxanthin được tách chiết từ sinh khối tảo chủng HB có hoạt tính chống oxy hóa cao, với giá trị  $IC_{50}$  đạt 4,09 mg/mL (Bảng 2). Theo AL-Tarifi và đồng tác giả, (2020) đã thông báo, astaxanthin tách từ *H. pluvialis* có khả năng chống oxy hóa thông qua phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH với  $IC_{50}$  đạt 12,9 mg/mL và hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin tách chiết phụ thuộc vào phương pháp tách chiết và dung môi tách. Kết quả thu được của chúng tôi cho thấy astaxanthin được tách chiết từ sinh khối chủng HB có hoạt tính chống oxy hóa tốt có thể là nguồn nguyên liệu làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

**Bảng 2. Hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin tách chiết từ sinh khối chủng *H. pluvialis* HB**

Astaxanthin		Ascorbic acid	
Nồng độ (mg/L)	Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH (%)	Nồng độ ( $\mu$ g/L)	Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH (%)
0,1	6,59 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	4	33,49 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>
0,4	11,73 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	20	62,24 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>
2	27,56 $\pm$ 0,44 <sup>c</sup>	100	92,41 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>
$IC_{50}$ (mg/ mL)	4,09 $\pm$ 0,25	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/ mL)	17,68 $\pm$ 0,84

Ghi chú: Ascorbic acid: Đối chứng dương, Astaxanthin tách chiết từ sinh khối chủng *H. pluvialis* HB. Hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin được xác định bằng phương pháp DPPH. Chữ cái a, b, c chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học giữa các công thức thí nghiệm ( $p < 0,05$ ). Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

## KẾT LUẬN

Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy hai pha của vi tảo lục *H. pluvialis* HB gồm pha một là môi trường RM có hàm lượng nitrate cao gấp 4 lần ( $NaNO_3$  là 1200 mg/L), quang chu kỳ chiếu sáng 16: 8 giờ (sáng: tối) với 10 giờ chiếu cường độ ánh sáng cao 85  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s và 6 giờ kết hợp cường độ ánh sáng cao và tia cực tím (30  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s) cùng với phương thức nuôi cấy perfusion, mật độ tế bào đạt cao nhất là 4,16 x 10<sup>6</sup> TB/mL ở ngày nuôi thứ 20; ở pha hai có bổ sung 100 mM bicarbonate, chủng HB chuyển giai đoạn từ tế bào sinh dưỡng sang tế bào cyst trong 5 ngày và hàm lượng astaxanthin tích lũy đạt 39,60 mg/g SKK. Ngoài ra, astaxanthin tách chiết từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao với giá trị  $IC_{50}$  đạt 4,09 mg/mL có thể là nguồn nguyên liệu để sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được hỗ trợ bởi đề tài “Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ thần kinh của astaxanthin được tách chiết từ sinh khối vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin trên dòng tế bào thần kinh đệm C6” mã số CSCLO8.07/23-24 (do TS. Nguyễn Cẩm Hà làm chủ nhiệm đề tài).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Tarifi BY, Mahmood A, Assaw S, Sheikh HI (2020). Comparison of Different Organic Solvents on Antioxidant Activity of Astaxanthin Extracted from *Hematococcus pluvialis* Using Colorimetric and Non-colorimetric Methods. *Oriental Journal of Chemistry* 36(3).
- An Y, Kim T, Byon H, Rayamajhi, Lee J (2024). Improved production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using a hybrid open – closed cultivation system. *Applied Sciences* 14(3): 1104.
- Cabello-Pasini A, Macías-Carranza V, Abdala R, Korbee N and Figueroa FL (2011). Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 23:363-369.
- Đặng Diễm Hồng (2019). *Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 749 trang.
- Dang DH, Le TT, Nguyen CH, Ngo THT, Hoang TMH, Luu TT, Nguyen MD, Tran MD, Nguyen VT, Nguyen TMH, Ambati RR

- (2023). Isolation of fucoxanthin from *Sarrgassum oligocystum* Montagne, 1845 seaweed in Vietnam and its Neuroprotective activity. *Biomedicines* 11 (8): 2310.
- Hồng DD, Mai ĐTN, Lâm BĐ, Tâm LT, Thủy NTT, Hà NC, Thơm LT, Hoàng ĐĐ, Anh HTL, Thu (2012). Ảnh hưởng kết hợp của nồng độ nitrate và chế độ chiếu sáng lên sinh trưởng của vi tảo *Haematococcus pluvialis*. *Tạp chí Sinh học*. 34 (4): 493-499
- Do TT, Tran TBT, Ong NB, Le TL, Nguyen TC, Dang QQ, Le CT, Tran DL, Melkonian M, Tran HD (2021). Effects of red and blue light emitting diodes on biomass and astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* in pilot scale angled twin-layer porous substrate photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Tehcnology and Engineering. Life Sciences/Biotechnology* 63(2): 81-8
- Erturk B (2019). Sodium bicarbonate amendment for enhanced astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis*. *Montana State University - Bozeman, College of Engineering*.
- Luu TT, Dang DH, Ravishankar GA, Rao AR (2021). Chapter 29: Astaxanthin Production and Technology in Vietnam and other Asian countries. In book "Global Perspectives on astaxanthin from Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications". Edited by Golare A Ravishankar, Ambati Ranga Rao. *Elsevier*: 594-633.
- Tran HD, Do TT, Le TL, Nguyen TML, Pham CH, Melkonian M (2019). Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production on angled bench-scale and large-scale biofilm-based photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering* 61(3): 61-70.
- Kang CD, Sim SJ (2008). Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnology Letter* 30(3): 441-444.
- Pereira S, Otero A (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Resesearch* 51: 102027.
- Rizzo A, Ross ME, Norici A, Jesus (2022). A two-step process for improved biomass production and non-destructive astaxanthin and carotenoids accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Applied Sciences* 12(3): 1261.
- Strickland JDH, Parsons TR (1972). A manual of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada* 125: 310.
- Viñeola B, Segovia M and Figueroa FL (2006). Effect of Artificial UV Radiation on Carbon and Nitrogen Metabolism in the Macroalgae *Fucus spiralis* L. and *Ulva olivascens* Dangeard. *Hydrobiologia* 560:31-42
- Wong YK, Ho YH, Ho KC, Lai YT (2016). Effects of light intensity, illumination cycles on microalgae *Haematococcus pluvialis* for production of Astaxanthin. *Journal of Marine Biology and Aquaculture* 2 (2): 1-7.

## RESEARCH ON TWO-PHASE CULTIVATION FOR ENHANCING HIGH GROWTH AND ASTAXANTHIN ACCUMULATION FROM GREEN MICROALGAE *Haematococcus pluvialis* HB ORIENTED FOR MAKING THE HEALTH HUMAN PROTECTIVE FOOD

**Nguyen Cam Ha<sup>1</sup>, Le Thi Thom<sup>1</sup>, Nguyen Manh Dat<sup>1,3</sup>,  
Le Anh Huy<sup>1</sup>, Ngo Thi Hoai Thu<sup>1\*</sup>, Dang Diem Hong<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Tachnology (VAST)*

<sup>3</sup>*University of Science and Technology of Hanoi*

### SUMMARY

The green microalga *Haematococcus pluvialis* is widely known as a high-value natural source of astaxanthin. Potential applications of astaxanthin in nutritional ingredient, food color additive, cosmetic, and pharmaceutical is spreading globally. The cultivation of *H. pluvialis* is performed through a two-phase cultivation process. The first phase is dedicated to biomass accumulation under favorable growth conditions, and the second phase is for astaxanthin accumulation under various stress conditions (lack of nutrients, high light, high temperature, etc.). This paper investigated the effect of different culture conditions on the growth of *H. pluvialis* HB in 10 L plastic bottles to achieve the highest cell density in the first stage and high astaxanthin accumulation in the second stage and extraction of astaxanthin using vegetable oil is presented in this study. In the first phase, the highest cell density reached  $4.14 \times 10^6$  TB/mL on the 20<sup>th</sup> under a photoperiod of 16: 8 h (light: dark) with 10 h for high light intensity of 85  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  and 6 h for combination of high light intensity and UV (30  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) with a perfusion culture process. When transitioning to the second phase, under 100 mM bicarbonate supplementation conditions, the HB strain transitioned from vegetative cells to cyst cells within just 5 days and accumulated a significant amount of astaxanthin, reaching 39.60 mg/g of dry cell weight. Furthermore, the extracted astaxanthin demonstrated considerable antioxidant activity with IC<sub>50</sub> value of 4.09 mg/mL, meeting standards as a raw material for health human protective food production.

**Keywords:** *Haematococcus pluvialis*, astxanthin, two-phase, perfusion culture, green microalgae.

\* Author for correspondence: Tel: 02437911059; nhthu@ibt.ac.vn (Dr. Ngo Thi Hoai Thu)

## PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG NẤM MỐC CÓ HOẠT TÍNH CHITINASE CAO

Ngô Ngọc Lan Anh, Nguyễn Thị Thùy Linh, Hồ Đăng Quốc Huy, Nguyễn Minh Trí\*

Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế

### TÓM TẮT

Nấm mốc đã được nghiên cứu và ứng dụng để sản xuất nhiều loại enzym khác nhau, trong đó có chitinase. Nghiên cứu này tập trung vào quá trình tuyển chọn, định danh chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase cao được phân lập từ đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... và đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase của chủng nấm mốc được tuyển chọn. Từ 9 mẫu đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... ở thành phố Huế, đã phân lập được 36 chủng nấm mốc, kết quả sơ tuyển chọn được chủng M11 phân lập từ trầm tích ao nuôi tôm có khả năng phân giải chitin với kích thước vòng phân giải lớn nhất ( $36,2 \pm 0,31$  mm). Kết quả định danh bằng phân tích trình tự ITS và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, chủng M11 được xác định là loài *Aspergillus oryzae*. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh trưởng và tổng hợp chitinase của *A. oryzae* M11 là: thời gian nuôi cấy 72 giờ, pH = 5.5, chất cảm ứng là bột chitin với nồng độ 1% là thích hợp nhất và cho hoạt độ chitinase cao nhất. Kết quả điện di SDS-PAGE của chế phẩm chitinase được kết tủa bằng ethanol từ dịch chiết enzyme của chủng *A. oryzae* M11 có sự hiện diện của chitinase với trọng lượng phân tử khoảng 26 ~ 35 kDa. Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng nấm mốc *A. oryzae* M11 có hoạt tính chitinase cao trong việc sản xuất các chế phẩm từ vỏ tôm là nguồn phế phụ phẩm của ngành chế biến thủy sản, góp phần bảo vệ môi trường.

Từ khóa: Nấm mốc, chitinase, *Aspergillus oryzae*.

### MỞ ĐẦU

Chitin là một polymer sinh học có trữ lượng đứng thứ 2 trong tự nhiên chỉ sau cellulose (Dutta P.K. *et al.*, 2004). Chitin phân bố rất rộng rãi ở dạng cấu trúc cơ bản trong thành tế bào của nấm và là cấu tạo phần vỏ ngoài của tôm, cua và côn trùng... Đây là một polymer có trọng lượng phân tử cao, không tan trong nước, chứa các đơn phân là N-acetyl-glucosamine liên kết bởi liên kết 1,4- $\beta$ -glucoside (Trang Sĩ Trung và đồng tác giả, 2010). Chitin không có khả năng hòa tan trong nước nên việc sử dụng chúng rất hạn chế. Vì thế để nâng cao giá trị sử dụng của chitin, người ta nghiên cứu theo hướng sản xuất các chế phẩm từ chitin như: oligochitin, glucosamine, chitosan... có thể hòa tan để mở rộng phạm vi ứng dụng và giải quyết các nguồn phế phẩm từ ngành chế biến thủy sản của nước ta, nhằm giảm tác hại gây ô nhiễm môi trường. Những năm gần đây có nhiều công trình nghiên cứu tập trung vào chitinase do tiềm năng ứng dụng to lớn của enzyme này trong nhiều lĩnh vực khác nhau như trong thu nhận tế bào trần (thể nguyên sinh), sản xuất chitin oligosaccharide, glucosamine và N-acetyl glucosamine, sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, trong việc kiểm soát nấm ký sinh trên cây trồng, ứng dụng trong y học... (Trần Thị Luyết và đồng tác giả, 2006). Những nguồn để thu nhận chitinase đáng kể là các chủng vi khuẩn thuộc các chi *Enterobacter* và *Streptomyces*, các chủng nấm sợi thuộc các chi *Asperillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* và một số động vật nguyên sinh.

Do đó, việc phân lập và chọn lọc các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp chitinase mạnh cũng như tối ưu hóa các điều kiện thu nhận chitinase từ các chủng này được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp chitinase ngoại bào có hoạt tính cao và xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng được tuyển chọn. Nghiên cứu này tạo cơ sở cho việc thu nhận chitinase ngoại bào cũng như ứng dụng trong việc tạo chế phẩm sinh học để ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu

Chủng nấm mốc có hoạt độ chitinase cao được phân lập từ các nguồn khác nhau tại thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế: đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... Mẫu đất sau khi thu về được hong khô trong không khí ở nhiệt độ phòng, sau đó nghiền nhỏ và lọc qua rây để loại bỏ rác, cho vào túi nilon để bảo quản chuẩn bị cho phân lập.

Vỏ tôm thẻ chân trắng được thu nhận tại nhà máy chế biến thủy sản Phú Song Hoàng, thành phố Huế.

Hóa chất: 3,5-acid dinitrosalicylic (DNS) của hãng Sigma Aldrich, agar (Thái Lan), các hóa chất thông thường (Trung Quốc).

### Phương pháp

#### **Bột chitin và chitin huyền phù**

**Bột chitin:** Vỏ tôm thẻ chân trắng được rửa sạch, sấy khô. Sau đó xử lý tách protein bằng dung dịch NaOH 5% ở 70-75°C trong 4 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Tiếp tục tách khoáng bằng dung dịch HCl 10% ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Sấy khô, nghiền nhỏ thành dạng bột.

**Chitin huyền phù 1%:** Dung dịch chitin huyền phù 1% được chuẩn bị như sau: 1g bột chitin được cho từ từ vào 20ml HCl đậm đặc, khuấy đều và để qua đêm ở 4°C. Thêm vào hỗn hợp 200ml ethanol lạnh, khuấy đều và ủ qua đêm. Ly tâm hỗn hợp ở 5000 vòng/phút trong 20 phút, thu lấy kết tủa và rửa bằng nước cất cho đến khi pH trung tính. Thêm nước cất vào tủa cho đủ thể tích 100ml (Nguyễn Thị Hà, 2012).

#### **Phân lập các chủng nấm mốc**

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập nấm mốc trên môi trường Czapeck có thành phần như sau: 20 g saccharose, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>, 0,5 g MnSO<sub>4</sub>, 3g NaNO<sub>3</sub>, 20 g agar, nước cất vừa đủ 1000 ml (Nguyễn Lâm Dũng và đồng tác giả, 2003).

Cân 1g mẫu, hòa tan vào 9ml nước cất vô trùng, khuấy đều, ta thu được dung dịch có độ pha loãng là 10<sup>-1</sup>. Từ dung dịch trên tiến hành pha loãng mẫu ở các độ pha loãng tiếp theo 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>. Lấy dịch pha loãng ở các độ pha loãng ở trên nhỏ lên đĩa Petri chứa môi trường Czapeck, mỗi đĩa 1 giọt. Dùng que gạt được khử trùng trên ngọn lửa đèn cồn và làm nguội, trải đều giọt dịch khắp môi trường nuôi cấy cho đến khi khô. Đậy nắp đĩa, ghi chú các thông tin như: ngày cấy, thông tin mẫu, độ pha loãng. Gói các đĩa petri bằng giấy báo và nuôi trong tủ ấm 30°C, trong 3 ngày, sau đó thu được khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa thạch, từ các khuẩn lạc đơn đó cấy truyền qua ống thạch nghiêng để giữ giống.

#### **Xác định khả năng phân giải chitin của nấm mốc**

Trên môi trường thạch có chứa chitin, nấm mốc sẽ tiết ra chitinase ngoại bào phân hủy cơ chất để sinh trưởng và làm cho môi trường trong hơn khi nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol. Độ lớn của khuẩn lạc và khoảng môi trường trong suốt phản ánh khả năng phân giải chitin của nấm mốc (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012).

#### **Phương pháp phân loại chủng nấm mốc**

**Quan sát hình thái:** Quan sát đại thể trên môi trường thạch đĩa. Sử dụng phương pháp nuôi cấy nấm mốc trên phiến kính để quan sát cơ quan sinh sản (Nguyễn Lâm Dũng và đồng tác giả, 2003).

**Phương pháp định danh:** Chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase mạnh được giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa (Thành phố Hồ Chí Minh). Phương pháp này được tiến hành như sau: Hệ sợi nấm được sử dụng cho tách chiết DNA theo phương pháp của Gardes và Bruns (1993): 50mg sợi nấm được nghiền trong 5 phút, thêm 500µl dung dịch trích ly, vortex và để ở nhiệt độ phòng 10 phút, sau đó ly tâm rồi thu lấy dung dịch phía trên. DNA được tủa bằng cồn 96<sup>o</sup> và rửa 2 lần bằng cồn 70<sup>o</sup>. DNA sau đó được sấy chân không 10 phút ở 45°C rồi hòa tan trong 100µl TE 0.1X. Cuối cùng DNA được kiểm tra chất lượng thông qua quá trình đo quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8%. Những sản phẩm đạt yêu cầu được bảo quản ở -20°C cho những bước tiếp theo.

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS1 và ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTA TTG ATATGC-3') theo phương pháp của White *et al*, (1990). Sản phẩm PCR sẽ được phân tích trên gel agarose và sau đó giải trình tự theo nguyên lý của phương pháp Sanger cải tiến, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm Sequencing Analysis 5.3 và cuối cùng trình tự này được so sánh với các trình tự ITS trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST để phân loại chủng nấm mốc (Sambrook and Russell, 2001).

Các trình tự được sắp giống bằng phần mềm ClustalW. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa mẫu nghiên cứu và các loài thuộc chi *Aspergillus* hiện có trên dữ liệu GenBank được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11 theo phương pháp Maximum Parsimony với hệ số tin tưởng (bootstrap) 100%.

#### **Xác định hoạt độ chitinase bằng phương pháp Bernfeld**

Hoạt độ chitinase của enzyme ngoại bào từ nấm mốc được xác định thông qua lượng đường khử tạo thành sau phản ứng giữa dịch enzyme thô và chitin huyền phù 1%. Phương pháp này dựa trên cơ sở sử dụng thuốc thử 3,5-acid dinitrosalicylic (DNS) có màu vàng sau khi cho phản ứng với đường khử (sản phẩm thủy phân của chitin) sẽ tạo thành 3-amino,5-nitro salicylic acid màu đỏ cam có khả năng hấp thụ cực đại bước sóng 540nm (Bernfeld P. 1955).



Nuôi chủng nấm mốc trong điều kiện bán rắn để thu nhận dịch thô chitinase ngoại bào. Dịch enzyme cho phản ứng với dung dịch huyền phù chitin 1% trong 10 phút và thuốc thử DNS được thêm vào để xác định lượng đường khử giải phóng sau phản ứng. Đơn vị hoạt tính (UI) của chitinase được xác định bằng lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 micromole đường khử ở 37°C trong 3 phút (Da Silva et al, 2012).

**Xác định ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính của chitinase**

Tiến hành nuôi cấy nấm mốc trong môi trường cám gạo có bổ sung chitin trong các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau (24, 48, 72, 96, 120, 144 và 168 giờ). Xác định hoạt độ chitinase và tìm ra được thời gian tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp chitinase của nấm mốc.

pH tối ưu được xác định bằng cách thực hiện nuôi cấy nấm mốc tại thời gian tối ưu và các pH khác nhau, sử dụng hệ đệm phù hợp như: sodium citrate có pH 4; 5,0 và sodium phosphate có pH 6,0; 7,0 (Nguyễn Thị Hà, 2012).

**Xác định thành phần protein enzyme**

Sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE theo Andrew. Phân tích kết quả điện di để xác định trọng lượng phân tử của protein enzyme dựa trên thang chuẩn protein Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa của hãng Thermo Scientific (B.N. Andrew, 2014).

Các phân tích được thực hiện trong ba lần lặp lại, kết quả là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng chương trình MS. Excel 2016 (Đặng Văn Giáp, 2000)

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Từ 9 mẫu đất thu thập ở các địa điểm khác nhau trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, bằng phương pháp phân lập trên môi trường Czapek, đã phân lập được 36 chủng nấm mốc. Tiến hành cấy các chủng nấm mốc đã phân lập trên môi trường Czapek thạch đĩa có bổ sung cơ chất chitin. Xác định khả năng phân giải chitin của nấm mốc bằng cách đo đường kính vòng phân giải cơ chất, dựa trên khả năng sinh trưởng mạnh trong môi trường và tiết enzyme để phân giải cơ chất. Vòng phân giải được phát hiện bằng thuốc nhuộm lugol và hoạt tính được xác định bằng hiệu số vòng phân giải.

Trong 36 chủng đã phân lập được thì chỉ có 1 chủng có khả năng phân giải chitin rất mạnh chiếm 2.78% số chủng, 19.44% chủng có khả năng phân giải mạnh, 27.77% chủng có khả năng phân giải chitin trung bình và 50.00% chủng còn lại phân giải chitin ở mức yếu (Bảng 1).

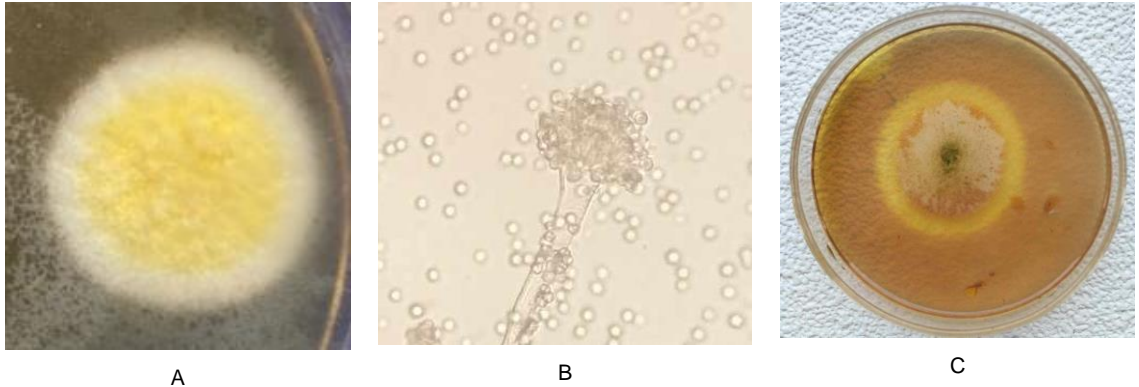
**Bảng 1. Khả năng phân giải chitin của các chủng nấm mốc trên môi trường Czapek – chitin**

Mức độ phân giải	Đường kính vòng phân giải D – d (mm)	Số chủng	Tỷ lệ %
Yếu	< 10	18	50.00
Trung bình	10 - 15	10	27.77
Mạnh	> 15 - 20	7	19.44
Rất mạnh	> 20	1	2.78

**Đặc điểm hình thái và phân loại của chủng nấm mốc**

Qua kết quả sơ tuyển, chúng tôi lựa chọn được chủng M11 được phân lập từ trầm tích ao nuôi tôm có đường kính vòng phân giải chitin lớn nhất (36,2 ± 0,31 mm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các chủng còn lại với độ tin cậy 95% để khảo sát về mặt hình thái, đồng thời giải trình tự gen bằng phương pháp PCR để định danh khoa học.

*Đặc điểm hình thái:* Khuẩn lạc tròn, mặt phải lúc đầu màu trắng có sợi mịn như nhung, về sau chuyển dần sang màu vàng hoa cau, không tiết sắc tố, mép khuẩn lạc xẻ rãnh nhỏ, sợi nấm mọc tỏa tròn. Sợi nấm màu xanh lục có vách ngăn, phân nhánh. Cuống sinh bào tử không phân nhánh. Thể bình một tầng hoặc hai tầng. Bào tử trần hình cầu không có vách ngăn (hình 1). Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA được thể hiện ở Hình 1.



**Hình 1. Đặc điểm hình thái của chủng nấm mốc M11 được tuyển chọn (Ảnh: Tác giả)**

A: Hình thái khuẩn lạc; B: Bào tử (10x10); C: Vòng phân giải chitin của khuẩn lạc.

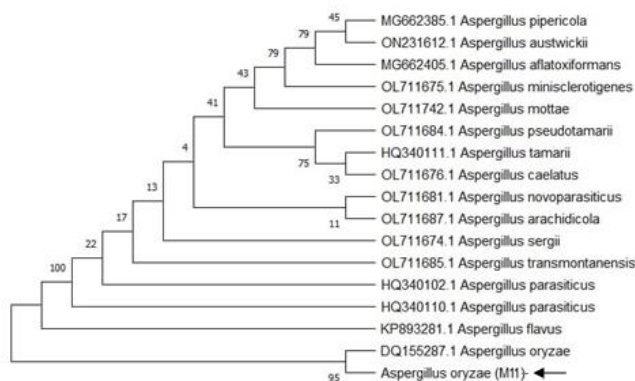
Sử dụng công cụ Blast Search để tra cứu và so sánh, đối chiếu trình tự này trên Ngân hàng gene. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng nấm mốc M11 được tuyển chọn có độ tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng *Aspergillus oryzae* RIB40 DNA, SC206 (Bảng 1 và Hình 2). Như vậy, chủng nấm mốc được xác định là thuộc loài *Aspergillus oryzae* M11.

**Bảng 2. Đánh giá mức độ tương đồng trình tự đoạn gen 28S RNA**

Tên loài	Tên chủng	Mã số truy cập	Độ tương đồng (%)
<i>Aspergillus oryzae</i>	RIB40 DNA, SC206	DQ155287.1	100
Query 1	CACGGGCGGGACACCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCTCTCTGACGGCCCGTTCCAG	60	
Sbjct 3119	CACGGGCGGGACACCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCTCTCTGACGGCCCGTTCCAG	3080	
Query 61	GGCACTTAGACAGGGGCGCACCCGAGCATCCTCTGCAAATTACAATGGGACCCCGAA	120	
Sbjct 3059	GGCACTTAGACAGGGGCGCACCCGAGCATCCTCTGCAAATTACAATGGGACCCCGAA	3000	
Query 121	GGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCG	180	
Sbjct 2999	GGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCG	2940	
Query 181	GTTGGTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGAT	240	
Sbjct 2939	GTTGGTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGAT	2880	
Query 241	CCGAGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTGCGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGA	300	
Sbjct 2879	CCGAGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTGCGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGA	2820	
Query 301	GCGGTTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCCTTGGGG	360	
Sbjct 2819	GCGGTTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCCTTGGGG	2760	
Query 361	CCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAAGCCGTGCTTGATGGGACGCA	420	
Sbjct 2759	CCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAAGCCGTGCTTGATGGGACGCA	2700	
Query 421	ATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAC	480	
Sbjct 2899	ATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAC	2840	
Query 481	TCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCAT	540	
Sbjct 2839	TCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCAT	2580	
Query 541	CGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACT	600	
Sbjct 2579	CGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACT	2520	
Query 601	CAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTG	660	
Sbjct 2519	CAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTG	2460	
Query 661	AGAGCCCCCGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAAGTAAACAG	720	

**Hình 2. Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA của chủng M11**

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự 28S rRNA của chủng nghiên cứu và các chủng có quan hệ họ hàng gần thuộc chi *Aspergillus* được thể hiện qua Hình 3.



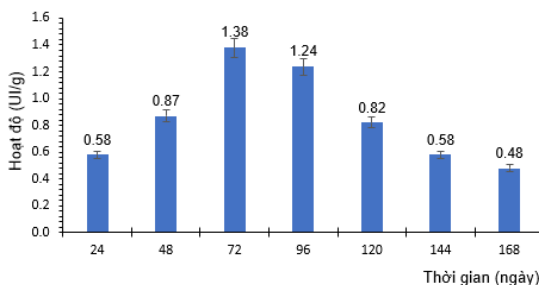
Hình 3. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của chủng *Aspergillus oryzae* M11

(Ghi chú: Chủng nghiên cứu được đánh dấu bằng mũi tên)

### Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ chitinase của *A. oryzae* M11

#### Ảnh hưởng của thời gian

Tiến hành nuôi cấy chủng *A. oryzae* M11 trong môi trường cám gạo có bổ sung chitin sau các khoảng thời gian 24, 48, 72, 96, 120, 144 và 168 giờ, thu dịch enzyme và xác định hoạt độ chitinase, kết quả được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Biến thiên hoạt độ chitinase của chủng *A. oryzae* M11 theo thời gian nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu cho thấy: khi tăng thời gian nuôi cấy thì sự sinh trưởng và khả năng phân giải chitin của chủng nấm mốc đều tăng nhưng khi vượt quá thời gian nuôi tối ưu thì hoạt độ chitinase giảm mạnh. Thời gian nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp chitinase của nấm mốc *A. oryzae* M11 là 72 giờ với hoạt độ enzyme là 1,38 IU/g, sau đó hoạt độ giảm dần theo thời gian. Kết quả này cho thấy với mỗi loại VSV có giới hạn thời gian thích hợp để sinh enzyme.

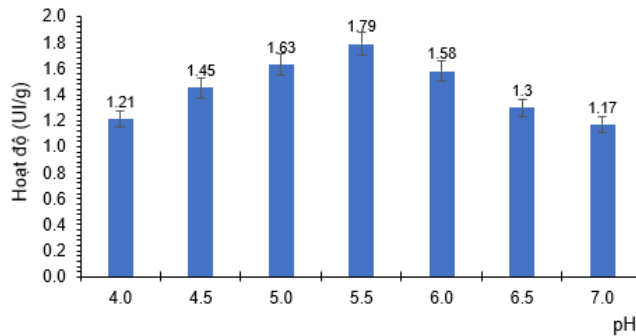
Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lê Thị Huệ (2010) khi nghiên cứu về chủng *Aspergillus* sp. sinh chitinase có hoạt độ cao nhất khi nuôi cấy ở 72 giờ. Tuy nhiên khác với kết quả của Brazeinska M.S. (2012) khi nghiên cứu về chủng *A. niger* tổng hợp chitinase đạt hoạt độ cao nhất khi nuôi ở 144 giờ. Qua kết quả từ Hình 4, chúng tôi chọn thời gian nuôi cấy là 72 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo của chủng *A. oryzae* M11.

#### Ảnh hưởng của pH

Sau khi khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp, tiến hành khảo pH môi trường để biết được sự ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh tổng hợp chitinase. Chủng nấm mốc *A. oryzae* M11 được nuôi trong môi trường cám gạo có nguồn chitin trong thời gian tối ưu với các giá trị pH khác nhau (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0); sau 72 giờ tiến hành thu dịch chiết enzyme và xác định hoạt độ chitinase. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt độ enzyme cao nhất là 1,79 IU/g ở pH=5,5 (Hình 5).

Kết quả cho thấy chủng *A. oryzae* M11 sinh tổng hợp chitinase ở một khoảng pH rộng từ 4,5 - 6,5 và sinh tổng hợp chitinase mạnh nhất ở khoảng pH từ 5,5 - 6,0 với hoạt độ chitinase cao nhất ở pH 5,5 (1,79 IU/g). Khi tăng pH môi trường thì sự tổng hợp chitinase để phân giải chitin trong môi trường của chủng nấm mốc cũng tăng nhưng khi vượt qua pH môi trường nuôi cấy tối ưu thì hoạt độ chitinase giảm mạnh.

Kết quả của chúng tôi là phù hợp với của Lê Thị Huệ (2010) khi xác định pH ban đầu của môi trường nuôi cấy thích hợp cho *Aspergillus* sp. sinh tổng hợp chitinase hoạt độ cao trong khoảng pH 5 – 6. Theo nghiên cứu của Gunalan *et al.*, (2012) khi sản xuất và tối ưu hóa chitinase từ *A. flavus* C<sub>10</sub>M<sub>3</sub> đã xác định pH của môi trường nuôi cấy thích hợp để *A. flavus* C<sub>10</sub>M<sub>3</sub> sinh tổng hợp chitinase là 6.5. Như vậy tùy từng chủng nấm sợi khác nhau mà sẽ có giá trị pH thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của từng loài.

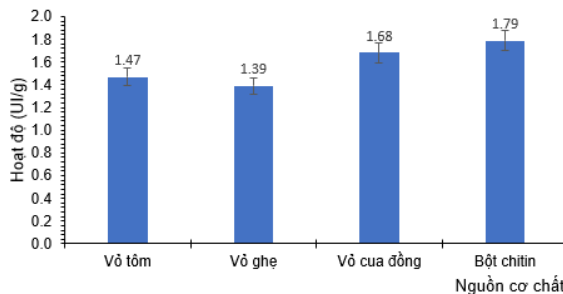


Hình 5. Biến thiên hoạt độ chitinase của chủng *A. oryzae* M11 theo pH

**Ảnh hưởng của cơ chất**

Qua khảo sát thời gian và pH tối ưu, chúng tôi chọn được thời gian nuôi cấy là 72 giờ với pH = 5.5 để tiếp tục khảo sát các loại cơ chất ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng *A. oryzae* M11.

Dùng môi trường cám gạo và lần lượt các loại cơ chất khác nhau: bột vỏ gẹ, bột vỏ cua đồng, bột vỏ tôm và bột chitin với tỉ lệ 1%. Tiến hành nuôi ở điều kiện 30°C và pH = 5.5 trong 72 giờ. Thu dịch enzyme và tiến hành xác định hoạt độ chitinase, kết quả ghi nhận được ở hình 6.



Hình 6. Biến thiên hoạt độ chitinase của chủng *A. oryzae* M11 theo loại cơ chất

Kết quả cho thấy: cơ chất có ảnh hưởng lớn và khác nhau đến sự sinh trưởng cũng như hoạt độ chitinase của *A. oryzae* M11. Đối với cơ chất là bột vỏ tôm, vỏ cua đồng và vỏ gẹ thì hoạt độ chitinase của *A. oryzae* M11 thấp hơn so với bột chitin.

Nguyên nhân là do bột vỏ tôm, vỏ gẹ, vỏ cua đồng là nguồn cơ chất khó phân giải, do thành phần cấu tạo của chúng ngoài chitin, còn có rất nhiều tạp chất và khoáng chất khác nên chitinase tổng hợp trong môi trường không thể phân giải hoàn toàn để tạo sản phẩm cuối cùng là N-acetyl-D-glucosamine. Với cơ chất cảm ứng là bột chitin thì hoạt độ chitinase cao hơn đáng kể, vì chitin đã trải qua bước loại bỏ protein, loại bỏ các muối calcium carbonate, phosphate calcium và các sắc tố. Cấu trúc chitin bây giờ không còn ở dạng phức hợp liên kết với các chất khác như ở bột vỏ tôm, cua, gẹ thô (Nguyễn Thu Hiền, 2012). Theo Đinh Minh Hiệp (2007) khi nghiên cứu nồng độ cơ chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy *Trichoderma atroviride* để thu chitinase đã kết luận nồng độ chitin thô 10% là thích hợp nhất cho quá trình tăng trưởng và sinh tổng hợp chitinase.

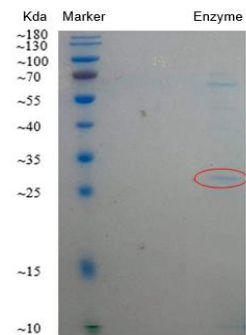
**Đánh giá thành phần protein enzyme bằng điện di SDS-PAGE**

Để xác định chính xác thành phần chitinase trong hỗn hợp dịch enzyme thu được, chúng tôi tiến hành phân tích điện di SDS-PAGE, kết quả được thể hiện ở Hình 7.

Kết quả điện di SDS-PAGE của chế phẩm chitinase được kết tủa bằng ethanol 96<sup>0</sup> cho thấy có hiện sự diện rõ nét của band là có trọng lượng phân tử khoảng 26 ~ 35 kDa (Hình 7).

Theo nghiên cứu của Beltagy khi điện di SDS-PAGE chitinase tinh khiết thì cho trọng lượng phân tử ước tính khoảng 30 kDa (Beltagy *et al*, 2018).

Theo Moore, trọng lượng phân tử thu được khi điện di SDS-PAGE của chitinase thu được từ *A. flavus* là 29 kDa (Moore *et al.*, 2003)



Hình 7. Kết quả điện di SDS

## KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... ở thành phố Huế, đã phân lập được 36 chủng nấm mốc, kết quả sơ tuyển chọn được chủng M11 phân lập từ trầm tích ao nuôi tôm có khả năng phân giải chitin với kích thước vòng phân giải lớn nhất ( $36,2 \pm 0,31$  mm). Phân tích trình tự ITS và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, chủng M11 được xác định là loài *Aspergillus oryzae*. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng và tổng hợp chitinase của *A. oryzae* M11 là: thời gian nuôi cấy 72 giờ, pH = 5.5, chất cảm ứng là bột chitin với nồng độ 1% là thích hợp nhất và cho hoạt độ chitinase cao nhất. Kết quả điện di SDS-PAGE của chế phẩm chitinase được kết tủa bằng ethanol từ dịch chiết enzyme của chủng *A. oryzae* M11 có sự hiện diện của chitinase với trọng lượng phân tử khoảng 26 ~ 35 kDa.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dutta PK., Dutta J, and Tripathi VS (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, pp. 20–31.
- Trang Sĩ Trung, Trần Thị Luyến, Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hoàng Phượng (2010). *Chitin-Chitosan từ phế liệu thủy sản và ứng dụng*. NXB Nông nghiệp.
- Trần Thị Luyến, Đỗ Minh Phụng, Nguyễn Anh Tuấn (2006), *Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản*. NXB Nông nghiệp.
- Nguyễn Thị Hà (2012). Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng *Aspergillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22b: 26-35.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (2003). *Vì sinh vật học*. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
- Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Thực tập vi sinh vật học*. Nxb Đại học Huế.
- Gardes M, Bruns TD (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, and Taylor JW (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. US. 482pp.
- Sambrook J, and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Bernfeld P (1955). *Amylase,  $\alpha$  and  $\beta$* . *Methods in Enzymology*. 1: 149-158.
- Da Silva LCA, Honorato TL, Franco TT, Rodrigues S (2012). Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid-state fermentation. *Food and Bioprocess Technology* 5 (5), 1564-1572.
- Andrew BN, Wobig WJ, and Petering DH (2014). Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, vol 6, no. 5, pp: 1068-1078.
- Đặng Văn Giáp (2000). *Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel*. NXB Giáo dục, Hà Nội.
- Lê Thị Huệ (2010). *Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng nấm sợi thuộc giống Aspergillus, Trichoderma và ứng dụng*. Luận văn Thạc sĩ. Trường ĐHSP TP. Hồ Chí Minh.
- Brzazinska MS, Jankiewicz U (2012). Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Curr Microbiol*. pp. 271-285.
- Gunalan G, Sadhana D, and Ramya PR (2012). Production, Optimization of Chitinase Using *Aspergillus flavus* and its Biocontrol of *Phytopathogenic* Fungi. *Journal of Pharmacy Research*, 5(6), 3151-3154.
- Nguyễn Thu Hiền (2012). *Nghiên cứu sử dụng vi sinh vật tạo nguyên liệu thực phẩm giàu glucosamine và protein từ cua đồng*. Luận văn Thạc sĩ. Trường ĐHSP TP. Hồ Chí Minh.
- Đình Minh Hiệp, Lê Đình Đôn, Nguyễn Tiến Thắng và Ngô Kế Sương (2007). Khảo sát hoạt tính các enzyme chitinase,  $\beta$ -glucanase, cellulase, pectinase, amylase, protease của các chủng *Trichoderma* phân lập tại Việt Nam. Tuyển tập Báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr.708-710
- Beltagy EA, Rawway M, Abdul-Raouf UM, Elshenawy MA, Kelany MS (2018). Purification and characterization of thermohalophilic chitinase producing by halophilic *Aspergillus flavus* isolated from Suez Gulf. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. DOI: 10.1016/j.ejar.2018.08.002
- Moore KG, Price MS, Boston RS, Weissinger AK, Payne GA (2003). A Chitinase from Tex6 Maize Kernels Inhibits Growth of *Aspergillus flavus*. *The American Phytopathological Society*, Vol. 94, No. 1.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MOLD STRAINS WITH HIGH CHITINASE ACTIVITY

Ngo Ngoc Lan Anh, Nguyen Thi Thuy Linh, Ho Dang Quoc Huy, Nguyen Minh Tri\*

*Hue University of Science, Hue University*

### SUMMARY

Molds have been studied and applied to produce many different types of enzymes, including chitinases. This study focuses on the selection and identification of mold strains with high chitinase activity isolated from garden soil, mangrove sediments, shrimp ponds, etc., and evaluates the conditions affecting the chitinase activity of the selected mold strains.

From 9 samples of garden soil, mangrove sediments, shrimp ponds... in Hue city, 36 mold strains were isolated. The preliminary selection results showed that strain M11 isolated from shrimp pond sediments had the ability to decompose chitin with the largest resolution ring size ( $36.2 \pm 0.31$  mm). The identification results were obtained by ITS sequence analysis and comparison with the NCBI database, strain M11 was identified as *Aspergillus oryzae*. The optimal culture conditions for growth and chitinase synthesis of *A. oryzae* M11 were: culture time of 72 hours, pH = 5.5, the inducer was chitin powder with a concentration of 1% which was the most suitable and gave the highest chitinase activity. The SDS-PAGE electrophoresis results of the chitinase preparation precipitated with ethanol from the enzyme extract of *A. oryzae* M11 strain showed the presence of chitinase with a molecular weight of about 26 ~ 35 kDa. This study shows the potential application of the mold strain *A. oryzae* M11 with high chitinase activity in the production of products from shrimp shells, a by-product of the seafood processing industry, contributing to environmental protection.

*Keywords:* Mold strains, chitinase, *Aspergillus oryzae*.

---

\* Author for correspondence: 0914031085; Email: [nguyenminhtri@husc.edu.vn](mailto:nguyenminhtri@husc.edu.vn)

# PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ TÍNH CHẤT CÓ LỢI CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC TỪ SỮA MẸ VÀ RAU, QUẢ LÊN MEN

Nguyễn Thị Phương Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Chuyên<sup>2</sup>, Lê Thị Thùy Nhi<sup>2</sup>, Phan Mỹ Hạnh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Phòng Công nghệ Vi sinh, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria - LAB) là nhóm vi khuẩn Gram dương, thường là lợi khuẩn, phổ biến trong đường tiêu hóa ở người và động vật. Chúng có khả năng chuyển hóa các hợp chất carbohydrate thành axit lactic giúp ức chế vi khuẩn gây hại, tăng cường hệ miễn dịch và cân bằng hệ vi sinh đường ruột. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic từ sữa mẹ và sản phẩm lên men từ rau quả có tiềm năng ức chế 5 chủng vi khuẩn gây bệnh chi thị phổ biến, gây ra các bệnh nhiễm trùng ở đường tiêu hóa, hô hấp, da và máu (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus spp.*), đáp ứng nhu cầu cấp thiết trong việc kiểm soát các bệnh truyền nhiễm và vấn đề kháng với kháng sinh ngày càng nghiêm trọng, với 4 loại kháng sinh phổ biến (Cefotaxime (Ct), Cefoxitin (Cn), Ciprofloxacin (Ci) và Penicillin (Pn)). Nghiên cứu cũng đánh giá khả năng chịu muối mật của các chủng tuyển chọn ở các nồng độ 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1%. Kết quả phân lập được 21 chủng vi khuẩn từ 3 mẫu sữa mẹ và 2 mẫu rau quả lên men, trong đó 7 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái và khả năng sinh hóa của nhóm vi khuẩn LAB. Thực hiện định danh sinh học phân tử, giải trình tự 16S rRNA, 7 chủng vi khuẩn axit lactic được xác định là MM1.2.1 (*Lactobacillus paracasei*), MM2.2 (*Limosilactobacillus fermentum*), MM2.3 (*Lactobacillus salivarius*), MM3.2 (*Enterococcus faecalis*), BC2 (*Limosilactobacillus fermentum*), DL2 (*Lactobacillus citreum*) và DL4 (*Weissella cibaria*). Nghiên cứu ghi nhận cả 7 chủng LAB đều có khả năng ức chế 5 chủng vi khuẩn chi thị, hiệu quả ức chế được theo dõi liên tục trong 5 ngày. Trong đó chủng vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* MM2.2 có đường kính vùng ức chế lớn nhất, có ý nghĩa khác biệt thống kê với các chủng khác và duy trì hiệu quả ổn định theo thời gian. Kết quả đánh giá mức độ nhạy cảm của 7 chủng LAB đối với 4 loại kháng sinh cho thấy mức độ nhạy cảm chủ yếu ở kháng sinh Cefotaxime (Ct) và Penicillin (Pn). Cả 7 chủng đều có khả năng sinh enzyme bile salt hydrolysis (BSH) ở nồng độ muối mật 1%.

**Từ khóa:** Kháng khuẩn, kháng kháng sinh, lên men rau củ, muối mật, sữa mẹ, vi khuẩn sinh axit lactic.

## MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria – LAB) không sinh bào tử, có hình cầu hoặc hình que, gram dương, catalase âm tính, oxydase âm tính và có khả năng chuyển hóa axit lactic. Nhóm vi khuẩn này thường có trong sữa mẹ và trong đường tiêu hóa ở người và động vật. Ngoài ra, chúng cũng có thể được tìm thấy trong các sản phẩm lên men tự nhiên từ rau quả. Mật độ vi khuẩn sống có trong sữa mẹ theo các nghiên cứu khoa học từ khoảng  $10^2$ – $10^5$  CFU/ml, chiếm ưu thế bởi các loài *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. Trong đó, các chủng *Limosilactobacillus fermentum* và *Lactobacillus salivarius* được đánh giá là có khả năng kháng khuẩn và tiềm năng probiotic (Perez-Cano *et al.*, 2010). Trong quá trình sinh trưởng, vi khuẩn LAB sử dụng đường glucose, lactose, sản sinh axit lactic, làm pH giảm dưới pH 4.0, làm ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn khác, từ đó ngăn ngừa sự phát triển của chúng. Bên cạnh đó, LAB còn sản sinh ra các hợp chất hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), diacetyl, acetaldehyde, các đồng phân D của amino acid, reuterin và bacteriocin có khả năng ức chế vi sinh vật gây hại theo các cơ chế khác nhau giúp đẩy lùi sự phát triển của các tác nhân gây bệnh (Smita *et al.*, 2014).

Hiện tượng kháng với kháng sinh (Antimicrobial resistance - AMR) đang trở thành một trong những mối đe dọa lớn nhất đối với sức khỏe toàn cầu. Nghiên cứu của Murray và đồng tác giả (2022) cho thấy trong năm 2019, AMR đã gây ra 4,95 triệu ca tử vong, trong đó 1,27 triệu ca tử vong trực tiếp do kháng kháng sinh của vi khuẩn. Các vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, và *Pseudomonas aeruginosa* đã được phát hiện có khả năng kháng lại nhiều loại kháng sinh quan trọng, làm giảm hiệu quả điều trị và tăng nguy cơ tử vong (Murray *et al.*, 2022). Điều này đòi hỏi sự phát triển của các phương pháp điều trị mới và hiệu quả hơn để khắc phục hiện tượng này. Việc nghiên cứu và ứng dụng các dòng vi khuẩn lactic có thể mở ra hướng đi mới trong việc kiểm soát các bệnh nhiễm khuẩn, đồng thời giảm sự phụ thuộc vào các loại thuốc kháng sinh. Điều này không chỉ có ý nghĩa trong y học mà còn góp phần bảo vệ sức khỏe cộng đồng trước nguy cơ lan rộng của hiện tượng kháng kháng sinh.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Mẫu sữa mẹ được thu thập tại ngân hàng sữa mẹ, bệnh viện Từ Dũ, thành phố Hồ Chí Minh từ 5 người mẹ tình nguyện độ tuổi từ 25 đến 35 tuổi, có tình trạng sức khỏe tốt, theo khảo sát sức khỏe không sử dụng kháng sinh trong vòng 3 tháng và không có bất kỳ bệnh lý nào được chẩn đoán.

Mẫu dịch lên men rau, quả gồm bắp cải và dưa leo được mua từ chợ đầu mối nông sản Hóc Môn, Tp. Hồ Chí Minh.

Các chủng vi khuẩn chỉ thị được dùng trong thử nghiệm: *Escherichia coli*, (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus*, (ATCC 25923) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10231), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028TM) và *Streptococcus sp.*, được lưu trữ trong bộ sưu tập giống vi sinh vật HBCM (HCMbiotech collection microorganisms) từ Phòng Công nghệ Vi sinh và Phòng Công nghệ sinh học Y Dược thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học, TP. Hồ Chí Minh.

### Hóa chất và thiết bị

Các môi trường vi sinh tổng hợp như MRS (De Man, Rogosa và Sharpe), TSB (Tryptone Soya Broth), TSA (Tryptone Soya Agar) từ các hãng Bio Basic và Himedia. Đĩa giấy tẩm kháng sinh từ Công ty Nam Khoa Việt Nam. Hóa chất sử dụng trong kiểm tra sinh hóa: KOH 3%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, bộ kit nhuộm gram (Gram Stain-Kit, Himedia, India), Bile Salt từ hãng Bio Basic. Hóa chất sử dụng trong định danh sinh học phân tử: hoá chất tách chiết, điện di, tinh sạch DNA và giải trình tự từ hãng Thermo scientific, Bio Basic, Merck.

Các thiết bị và dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ các hãng Himedia, Merck, Carl Zeiss, Mettler toledo, Memmert, Thermo scientific.

### Phương pháp

#### Phân lập các chủng vi khuẩn nghi ngờ là LAB

Quá trình thu nhận sữa mẹ được thực hiện trực tiếp, cẩn thận để hạn chế nguy cơ nhiễm bẩn theo tiêu chuẩn của bệnh viện Từ Dũ. Mẫu sữa được chứa trong các ống falcon đã được vô trùng và vận chuyển đến Phòng công nghệ Vi sinh trong vòng 24 giờ ở nhiệt độ 4°C. Các mẫu sữa mẹ được ủ trong điều kiện yếm khí trong môi trường MRS lỏng, ở 37°C trong 48 giờ (Yavuzdurmaz, 2007).

Rau củ gồm bắp cải, dưa leo được rửa sạch, cắt nhỏ cho vào các lọ thủy tinh sạch bổ sung 3% NaCl, ủ 37°C, duy trì yếm khí trong 48 giờ.

Quá trình phân lập các chủng vi khuẩn nghi ngờ LAB được tiến hành bằng cách pha loãng thập phân dịch tăng sinh bằng nước muối sinh lý vô trùng 0,85%, hút 0,1ml ở mỗi nồng độ pha loãng trải lên đĩa thạch MRS có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>, ủ ở 37°C và sàng lọc các khuẩn lạc đơn mục tiêu sau 48 giờ. Các đặc điểm hình thái đặc trưng của nhóm vi khuẩn sinh axit lactic như khuẩn lạc màu trắng đục, có tâm hay không có tâm, kích thước (từ 2-5 mm), dạng lồi, có mùi chua hoặc mùi sữa chua đặc trưng được quan sát bằng kính hiển vi soi nổi (Carl Zeiss – Đức) với độ phóng đại 8X.

Thực hiện định danh sơ bộ nhóm vi khuẩn LAB mục tiêu bằng các thử nghiệm sinh hóa nhằm loại các chủng nấm men, vi khuẩn axit acetic như: khảo sát khả năng tạo vòng tan trên môi trường thạch MRS có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>, nhuộm Gram, thử nghiệm enzyme catalase sử dụng thuốc thử hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%, thử nghiệm oxydase để kiểm tra sự hiện diện của cytochrom oxydase sử dụng thuốc thử tetra-metyl-p-phenylenediamine dihydrochlorid (TMPD), khả năng di động được kiểm tra bằng cách quan sát vi khuẩn trong môi trường MRS lỏng dưới kính hiển vi quang học. Tiến hành ghi nhận các chủng nghi ngờ là LAB khi có kết quả là gram dương, tạo vòng tan, không có khả năng tổng hợp enzym catalase, không có sự hiện diện của cytochrom oxydase và không có khả năng di động để tiếp tục định danh bằng phương pháp giải trình tự DNA.

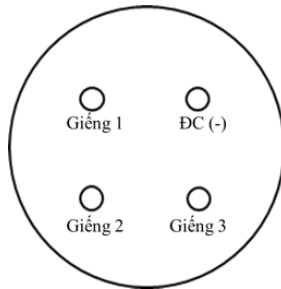
#### Định danh bằng phương pháp giải trình tự DNA

DNA vi khuẩn được tách chiết bằng quy trình của Phòng công nghệ Vi sinh. Phản ứng khuếch đại PCR sử dụng hai đoạn mồi 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1500R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') để khuếch đại đoạn trình tự 16s rRNA. Phản ứng PCR bao gồm gia nhiệt ban đầu ở 94°C trong 10 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm biến tính ở 94°C, ủ ở 56°C và kéo dài ở 72°C, mỗi bước kéo dài trong 60 giây. Bước cuối cùng là gia nhiệt ở 72°C trong 10 phút để hoàn tất quá trình PCR. Sản phẩm PCR sau đó được giữ ở 4°C để ổn định và bảo quản (Dubernet *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2016). Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, sử dụng thang Generuler DNA ladder mix (ThermoScientific). DNA được tinh sạch và giải trình tự bằng máy giải trình tự gene 3500 Genetic. Trình tự DNA được xử lý, BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI để xác định loài. Cây phát sinh loài được vẽ thể hiện mối quan hệ loài của 7 chủng tuyển chọn theo phương pháp Neighbor-Joining, bootstrap 1000, sử dụng phần mềm MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021).



**Khả năng kháng khuẩn theo thời gian**

Khả năng kháng khuẩn của các chủng LAB tuyển chọn được đánh giá theo thời gian dựa trên phương pháp khuếch tán giếng thạch. Dịch nuôi cấy các chủng LAB ở 35°C trong 48 giờ được cho vào 3 giếng thạch đã tạo trên môi trường MRS chứa lần lượt các chủng gây bệnh chỉ thị *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus spp* ở mật độ 10<sup>8</sup> CFU/mL theo phương pháp so màu Mc-farland. Đối chứng âm là giếng thạch có môi trường MRS không chứa vi khuẩn (Hình 1), ủ ở 35°C trong 48 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 5 lần ở 1 chủng LAB tương ứng với 1 chủng chỉ thị. Mức độ kháng hoặc ức chế khuẩn được xác định bằng vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh giếng thạch (Đoàn Thị Tuyết Lê, Đỗ Minh Anh, 2019). Đường kính vòng ức chế xung quanh miệng giếng thạch được tính theo công thức:  $\Delta D = D - d$ . Trong đó,  $\Delta D$  là đường kính vùng vô khuẩn (mm); D là đường kính vòng ức chế (mm) và d là đường kính miệng giếng (d = 8 mm).



Hình 1. Bố trí thí nghiệm kháng khuẩn trên đĩa petri

**Định tính khả năng chịu muối mật**

Muối mật là các muối của axit mật, chủ yếu bao gồm các muối natri và kali của axit cholic và axit chenodeoxycholic, có vai trò quan trọng trong quá trình tiêu hóa và hấp thụ chất béo. Các chủng LAB có tiềm năng ứng dụng trong probiotic có khả năng chịu muối mật trong đường tiêu hóa của vật chủ nhờ hoạt động của enzyme bile salt hydrolysis (BSH) (EC3.5.1.24). Nồng độ muối mật trung bình trong ruột non là 0,3% w/v. Khả năng chịu được nồng độ muối mật cao giúp các chủng LAB tồn tại lâu trong đường ruột (Foley, et al., 2019). Các chủng LAB tuyển chọn được tăng sinh trong môi trường MRS sau 48 giờ ở 30°C, ly tâm thu sinh khối, huyền phù trong PBS (Phosphate buffered saline) sau đó nhỏ dịch lên môi trường MRS thạch chứa muối mật ở các nồng độ 0.3%, 0.5%, 0.7% và 1%. Kết quả dương tính khi xuất hiện vòng kết tủa axit mật (vòng sáng mờ đục) xung quanh sinh khối khuẩn lạc LAB.

**Mức độ nhạy cảm kháng sinh**

Thí nghiệm thực hiện dựa trên phương pháp khuếch tán đĩa do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) đề xuất, nhằm đánh giá tác động 4 loại kháng sinh khác nhau, bao gồm Cefotaxime (30ug), Cefoxitin (30ug), Ciprofloxacin (5ug) và Penicillin (10UI) lên các chủng LAB tuyển chọn. Dịch tăng sinh các chủng LAB trong môi trường MRS lỏng sau 48 giờ ở 30°C được trải 0,1 ml lên đĩa thạch MRS. Đặt các đĩa giấy đã được tẩm kháng sinh lên đĩa thạch có chủng LAB trong điều kiện vô trùng, ủ 30°C trong 48 giờ. Sau thời gian ủ, đường kính vùng ức chế sinh trưởng được đo và so sánh với các giá trị tiêu chuẩn để ghi nhận mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn LAB.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phân lập các chủng nghi ngờ là LAB**

Từ 3 mẫu sữa mẹ và 2 mẫu lên men rau củ, sàng lọc thu được 21 chủng vi sinh vật có khả năng tạo vòng tan trên môi trường thạch MRS có bổ sung 0,5% CaCO<sub>3</sub>. Đặc điểm hình thái của các chủng thuần được đánh giá bằng kính hiển vi soi nổi và so sánh với các đặc điểm hình thái phổ biến của nhóm vi khuẩn sinh lactic. Kết quả ghi nhận 12 chủng có mô tả hình thái khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường MRS của nhóm vi khuẩn LAB.

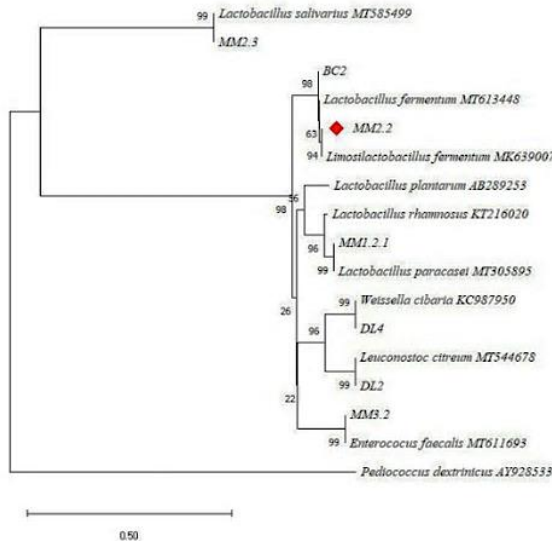
Kết hợp kết quả khảo sát định danh sinh hóa về gram, thử nghiệm phản ứng catalase, oxydase, khả năng di động được thể hiện ở (Bảng 1), có 7 chủng gồm: MM1.2.1, MM2.2, MM2.3, MM3.2, BC2, DL2 và DL4 đáp ứng các đặc trưng sinh hóa của nhóm vi khuẩn LAB như vi khuẩn gram dương, phản ứng catalase âm tính, oxydase âm tính và không có khả năng di động.

Bảng 1. Kết quả sinh hóa 12 chủng sàng lọc

Chủng	Gram	Catalase	Oxydase	Khả năng di động
MM1.1	-	-	-	-
MM1.2.1	+	-	-	-
MM1.3	+	+	-	-
MM1.4	-	-	-	-
MM2.2	+	-	-	-
MM2.3	+	-	-	-
MM3.1	-	-	-	-
MM3.2	+	-	-	-
BC1	+	+	+	-
BC2	+	-	-	-
DL2	+	-	-	-
DL4	+	-	-	-

**Định danh bằng phương pháp giải trình tự DNA**

Kết quả BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI trình tự đoạn gene 16S rDNA của 7 chủng cho kết quả các chủng với ký hiệu và tên khoa học lần lượt là MM1.2.1 (*Lactobacillus paracasei*), MM2.2 (*Limosilactobacillus fermentum*), MM2.3 (*Lactobacillus salivarius*), MM3.2 (*Enterococcus faecalis*), BC2 (*Limosilactobacillus fermentum*), DL2 (*Lactobacillus citreum*) và DL4 (*Weissella cibaria*). Cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ giữa 7 chủng LAB tuyển chọn được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Cây phát sinh loài của 7 chủng LAB

**Khả năng kháng khuẩn**

Bảng 2. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *E. coli*

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+++	+++	+++	+++	+++
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	+++	+++	+++	+++	+++
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	++++	+++	+++	+++	+++
BC2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	++++	++++	++++	++++
DL2 - <i>L. citreum</i>	++	++	++	++	++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+++	+++	++	++	++

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20mm, “+++++”: 20-25mm, “++++++”: 25-30 mm.

Cả 7 chủng LAB tuyển chọn đều có khả năng ức chế 5 chủng gây bệnh chỉ thị hoặc làm giảm sự phát triển của chúng khi vùng vô khuẩn bắt đầu xuất hiện khuẩn lạc của chủng chỉ thị sau các mốc thời gian ghi nhận. Trong đó chủng lactic MM2.2 có hiệu quả kháng khuẩn cao nhất đối với 5 chủng chỉ thị sau 1 – 2 ngày, sau đó duy trì ổn định sau 5 ngày khảo sát. Cụ thể, đối với *E.coli* (Bảng 2), chủng MM2.2 có hiệu quả kháng khuẩn tốt nhất, duy trì sau 5 ngày (từ 21,9 – 22,1 mm), 5 chủng LAB còn lại cho kết quả kháng khuẩn trung bình lần lượt từ 8,2 – 18,4 mm. sau 1 – 2 ngày, sau đó giảm dần ở mỗi chủng trong 3 ngày tiếp theo (từ 7,3 – 13,3 mm).

Bảng 3. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *P. aeruginosa*

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+	+	+	+	+
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	++	++	++	++	++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	+	+	+	+	+

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+
BC2 - <i>L. fermentum</i>	++	+	+	+	+
DL2 - <i>L. citreum</i>	+	+	+	+	+
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+	+	+	+	+

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20mm, “+++++”: 20-25mm, “++++++”: 25-30 mm.

Tương tự, 5 chủng MM2.2, BC2, DL4, DL2, MM2.3 cho khả năng kháng *P. aeruginosa* sau 24 giờ, sau đó giảm trong 4 ngày còn lại, cao nhất là chủng MM2.2 lần lượt 7,4 mm và 6,2 mm ở ngày thứ 1 và ngày thứ 5; 2 chủng MM1.2.1 và MM3.2 có khả năng ức chế chủng chỉ thị kéo dài 48 giờ, sau đó giảm dần (Bảng 3).

**Bảng 4. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *S. typhimurium***

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	-	+++	++++	+++	+++
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	-	++++	+++++	+++++	+++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	-	++++	++++	+++	+++
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	-	++++	++++	++++	++++
BC2 - <i>L. fermentum</i>	-	++++	++++	++++	++++
DL2 - <i>L. citreum</i>	-	+++	+++	+++	++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	-	++	++	++	++

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10 mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20 mm, “+++++”: 20-25 mm, “++++++”: 25-30 mm.

Kết quả đo đường kính vùng ức chế giữa 7 chủng LAB đối với vi khuẩn *S. typhimurium* có thể ghi nhận sau 2 ngày và có sự khác biệt (Bảng 4), trong đó, chủng MM2.2 có hiệu quả ức chế cao nhất, tăng dần từ ngày thứ 2 (23,5 mm) đến ngày thứ 4 (27,1 mm) nhất, sau đó giảm ở ngày thứ 5 (20,9 mm); 6 chủng LAB còn lại xuất hiện vùng ức chế sau 2 ngày, sau đó giảm nhẹ, trừ chủng MM1.2.1, có khả năng ức chế tăng dần trong 3 ngày đầu (13,4 – 17 mm).

**Bảng 5. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *S. aureus***

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	++++	+++++	+++++	++++	++++
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	++++	++++	+++	+++	++
BC2 - <i>L. fermentum</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
DL2 - <i>L. citreum</i>	+++	+++	+++	+++	++++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	++++

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10 mm, “+++”: 10-15 mm, “++++”: 15-20 mm, “+++++”: 20-25 mm, “++++++”: 25-30 mm.

Đối với hiệu quả kháng vi khuẩn *S. aureus*, cả 7 chủng LAB tuyển chọn đều duy trì hiệu quả kháng khuẩn trong 2 – 3 ngày đầu, cao nhất là chủng MM2.2 (27,12 mm), sau đó có dấu hiệu giảm dần ở 2 ngày còn lại (Bảng 5).

**Bảng 6. Kết quả đường kính vùng ức chế của 7 chủng LAB đối với *Streptococcus sp***

Các chủng LAB	Loại kháng sinh				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	+	+	+	+	+
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	++	++++	++++	++++	++++
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	+	+	+	+	+
MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	++	++	++	++	+

CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

BC2 - <i>L. fermentum</i>	+++	+++	+++	+++	+++
DL2 - <i>L. citreum</i>	++	++	++	++	++
DL4 - <i>W. cibaria</i>	+++	-	-	-	-

Ghi chú: “-”: 0, “+”: 1-5 mm, “++”: 5-10mm, “+++”: 10-15mm, “++++”: 15-20mm, “+++++”: 20-25mm, “++++++”: 25-30 mm.

Ngược lại, 7 chủng LAB tuyển chọn thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn *Streptococcus sp.* khác nhau, 2 chủng MM1.2.1 và MM2.3 không có khả năng ức chế, thể hiện ở vùng vô khuẩn rất nhỏ và mờ trong thời gian khảo sát; chủng DL4 chỉ có thể ức chế vi khuẩn chỉ thị sau 24 giờ (13,3 mm), hiệu quả ức chế sau đó không còn khi xuất hiện nhiều khuẩn lạc xung quanh giếng thạch; 2 chủng MM3.2 và BC2 có khả năng kháng khuẩn sau 24 giờ đầu tiên, lần lượt 9,3 và 14,6 mm, sau đó giảm dần và ổn định đến ngày thứ 5; 2 chủng MM2.2 và DL2 có khả năng kháng khuẩn duy trì trong 5 ngày, cao nhất là MM2.2 (19,1 mm) (Bảng 6).

Các kết quả này tương đồng với nghiên cứu của (Abubakr, 2018) khi khảo sát khả năng kháng khuẩn của 6 chủng LAB từ sữa mẹ đối với các vi khuẩn gây bệnh cũng cho thấy vùng ức chế rõ rệt trên môi trường MRS agar chứa *E. coli*, với một số chủng có khả năng ức chế mạnh mẽ và duy trì ổn định trong thời gian dài, điển hình là chủng LAB-HM6. Nghiên cứu của Abubakr cũng ghi nhận rằng các chủng LAB này có khả năng kháng khuẩn đa dạng, nhiều hợp chất chịu trách nhiệm cho hoạt động kháng khuẩn và không thể quy cho một hoặc các hợp chất chính có trong sữa mẹ và mức độ và thời gian duy trì hiệu quả kháng khuẩn có sự khác biệt giữa các chủng.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy chủng *L. fermentum* MM2.2 có khả năng kháng khuẩn đa dạng và có tiềm năng ứng dụng cao cũng tương tự với nghiên cứu của Thụy và đồng tác giả (2024) khi khảo sát khả năng kháng khuẩn của các chủng LAB từ thực phẩm lên men.

**Định tính khả năng chịu muối mật**

Chủng vi khuẩn LAB có enzyme BSH làm thủy phân axit mật liên hợp thể hiện vòng đục trên đĩa MRS có bổ sung bile salt ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy cả 7 chủng LAB đều có khả năng chống chịu muối mật ở các nồng độ 0.3%, 0.5%, 0.7% và 1%. Theo nghiên cứu của Jiang và đồng tác giả (2010), các chủng LAB *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* cho hiệu quả khử muối mật cao 50 mmol/L và các loài có khả năng tạo probiotic như *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* có khả năng thủy phân nhiều loại muối mật liên hợp khác nhau, hiệu quả khác nhau đối với đặc hiệu mỗi cơ chất (Morinaga et al., 2022).



Hình 3. Định tính enzyme BSH của 7 chủng LAB

**Mức độ nhạy cảm kháng sinh**

Mức độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng LAB dựa quan sát đường kính vùng vô khuẩn xung quanh 4 loại đĩa giấy kháng sinh khảo sát, phân loại thành ba nhóm: không nhạy cảm – K (không có vùng vô khuẩn), nhạy cảm trung bình – TB (mm), và nhạy cảm cao – N (mm). Đánh giá dựa vào tham chiếu mức độ nhạy cảm của chủng chỉ thị tương ứng đối với mỗi loại kháng sinh.

Đối với kháng sinh Cefotaxime (Ct), cả 7 chủng được phân loại ở mức nhạy cảm trung bình (TB). Đối với kháng sinh Cefoxitin (Cn), ghi nhận cả 7 chủng LAB không nhạy cảm tương tự với một số chủng LAB trong. Đối với Ciprofloxacin (Ci), ghi nhận 5 chủng không nhạy cảm (MM1.2.1, MM2.2, MM2.3, MM3.2, BC2); 2 chủng có kết quả là nhạy cảm trung bình (DL2 và DL4). Có 3 chủng LAB (MM2.2, MM2.3, MM3.2) không nhạy cảm; 4 chủng (MM1.2.1, BC2, DL2, DL4) nhạy cảm cao đối với kháng sinh Penicillin (Pn). Kết quả nghiên cứu thể hiện sự đa dạng trong mức độ nhạy cảm, tương tự một số chủng LAB trong phát hiện của Zommara và đồng tác giả, 2023. Theo nhiều nghiên cứu, không phải tất cả các chủng có khả năng kháng với kháng sinh (không nhạy cảm) đều mang gene kháng với kháng sinh đó.

Bảng 7. Kết quả khảo sát mức độ nhạy cảm kháng sinh của 7 chủng LAB

Các chủng LAB	Loại kháng sinh			
	Cefotaxime (Ct)	Cefoxitin (Cn)	Ciprofloxacin (Ci)	Penicillin (Pn)
MM1.2.1 - <i>L. paracasei</i>	TB	K	K	N
MM2.2 - <i>L. fermentum</i>	TB	K	K	TB
MM2.3 - <i>L. salivarius</i>	TB	K	K	TB

MM3.2 - <i>E. faecalis</i>	TB	K	K	TB
BC2 - <i>L. fermentum</i>	TB	K	K	N
DL2 - <i>L. citreum</i>	TB	K	TB	N
DL4 - <i>W. cibaria</i>	TB	K	TB	N

Ghi chú: K: Không nhạy cảm; TB: Nhạy cảm trung bình; N: Nhạy cảm cao.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết quả phân lập và tuyển chọn 7 chủng vi sinh vật có đặc điểm mô tả hình thái và sinh hóa của vi khuẩn lactic, định danh sinh học phân tử và thể hiện mối liên hệ thông qua cây phát sinh loài, được xác định là: *L. paracasei* (MM1.2.1), *L. fermentum* (MM2.2), *L. salivarius* (MM2.3), *E. faecalis* (MM3.2), *L. fermentum* (BC2), *L. citreum* (DL2), và *W. cibaria* (DL4).

Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn lactic là một trong những thúc đẩy quan trọng trong lĩnh vực vi sinh và y học, giúp chống lại vi khuẩn gây bệnh ngày càng phức tạp. Nghiên cứu này đã thành công trong việc tuyển chọn 7 dòng vi khuẩn lactic có tiềm năng kháng khuẩn từ sữa mẹ. Cả 7 chủng LAB tuyển chọn đều có khả năng ức chế sự phát triển của 5 chủng vi khuẩn gây bệnh ở mức độ khác nhau, có khả năng chịu được muối mật ở nồng độ 1% và khả năng nhạy cảm khác nhau với 4 loại kháng sinh phổ biến khác nhau. Trong đó *L. fermentum* MM2.2 có khả năng kháng khuẩn và duy trì hiệu quả tương đối ổn định trong việc ức chế nhiều loại vi khuẩn gây bệnh phổ biến như *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* và *Streptococcus sp* góp phần phát triển các phương pháp điều trị và phòng ngừa bệnh hiệu quả hơn, bảo vệ sức khỏe cộng đồng một cách toàn diện và bền vững.

Cần có nghiên cứu thêm về tác động *in vivo* của các chủng tuyển chọn lên khả năng kháng khuẩn trên mô hình chuột, kiểm tra các gene kháng kháng sinh của 7 chủng tuyển chọn, để hạn chế hiện tượng chuyển gene kháng với kháng sinh truyền ngang giữa các vi sinh vật.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abubakr MA (2018). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from human breast milk against human pathogenic strains. *Int J Clin Dev Anat*, 4(1): 27–31.
- Dubernet S, Desmases N, Guéguen M (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett*, 214(2): 271–275.
- Đoàn Thị Tuyết Lê, Đỗ Minh Anh. "Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* từ nội tạng tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)."  
*Tạp chí Khoa học-Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang* 04 (2019): 181-188.
- Foley MH, O'Flaherty S, Barrangou R, Theriot CM (2019). Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathog*, 15: e1007581.
- Jiang, J., Hang, X., Zhang, M., Liu, X., Li, D., & Yang, H. (2010). Diversity of bile salt hydrolase activities in different lactobacilli toward human bile salts. *Annals of Microbiology*, 60, 81-88.
- Lin SP, Huang YH, Hsu KD, Lai YJ, Chen YK, Cheng KC (2016). Isolation and identification of cellulose-producing strain *Komagataeibacter intermedius* from fermented fruit juice. *Carbohydr Polym*, 151: 827–833.
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*, 399(10325): 629–655.
- Morinaga K, Kusada H, Tamaki H (2022). Bile salt hydrolases with extended substrate specificity confer a high level of resistance to bile toxicity on atopobiaceae bacteria. *Int J Mol Sci*, 23(18): 10980.
- Perez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P (2010). In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: Two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 215(12): 996–1004.
- Smita N, Bodhankar MG, Vaijayanti S (2014). Screening of intestinal Lactic Acid Bacteria of breastfed neonates for antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staph. aureus* and *E. coli*. *Res J Chem Environ*, 18(3): 37–41.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*, 38(7): 3022–3027.
- Thuy TTD, Lu HF, Bregente CJB, Huang FCA, Tu PC, Kao CY (2024). Characterization of the broad-spectrum antibacterial activity of bacteriocin-like inhibitory substance-producing probiotics isolated from fermented foods. *BMC Microbiol*, 24(1): 85.
- Yavuzdurmaz H (2007). Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk. *PhD Thesis. Izmir Institute of Technology, Turkey*.
- Zommara M, El-Ghaish S, Haertle T, Chobert JM, Ghanimah M (2023). Probiotic and technological characterization of selected *Lactobacillus* strains isolated from different Egyptian cheeses. *BMC Microbiol*, 23(1): 160.

## ISOLATION, IDENTIFICATION, AND POTENTIAL PROBIOTIC CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM BREAST MILK AND FERMENTED VEGETABLES

Nguyen Thi Phuong Trang<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hong Chuyen<sup>2</sup>, Le Thi Thuy Nhi<sup>2</sup>, Phan My Hanh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology & Biotechnology – University of Science – Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>Department of Microbial Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

### SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) are typically beneficial Gram-positive bacteria. They were commonly found in the gastrointestinal tract of humans and animals. They can metabolize carbohydrates into lactic acid, in order to inhibit harmful bacteria, enhance the immune system, and balance gut microbiota. This study aims to select LAB strains from human breast milk and fermented vegetable products that have the potential inhibition to five indicator pathogenic bacteria. These are often found in the gut, environment, food, skin, and mucous membranes of humans, causing infections in the gastrointestinal tract, respiratory system, skin, and blood (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus sp*). The study was carried out to address the urgent need to control infectious diseases and the increasing phenomenon of resistance to four common antibiotics (Cefotaxime (Ct), Cefoxitin (Cn), Ciprofloxacin (Ci), and Penicillin (Pn)). The study also assesses the bile salt tolerance of the selected strains at concentrations of 0.3%, 0.5%, 0.7%, and 1%. A total of 21 bacterial strains were isolated from three breast milk samples and two fermented vegetable samples, of which seven strains exhibited morphological and biochemical characteristics of lactic acid-producing bacteria. Molecular identification by 16S rRNA sequencing determined that the seven lactic acid bacterial strains were MM1.2.1 (*Lactobacillus paracasei*), MM2.2 (*Limosilactobacillus fermentum*), MM2.3 (*Lactobacillus salivarius*), MM3.2 (*Enterococcus faecalis*), BC2 (*Limosilactobacillus fermentum*), DL2 (*Lactobacillus citreum*) và DL4 (*Weissella cibaria*). Moreover, the study found that all seven LAB strains could inhibit five indicator pathogenic bacteria. The inhibition effect was monitored continuously over five days. Among these, *Limosilactobacillus fermentum* MM2.2 illustrated the largest zone inhibition diameter, showing a statistically significant difference from the other strains and maintaining stable effectiveness over five days. The assessment of the seven LAB strains' sensitivity to the four antibiotics revealed that they were mainly sensitive to Cefotaxime (Ct) and Penicillin (Pn). Additionally, all seven strains were capable of producing bile salt hydrolase (BSH) enzyme at a bile salt concentration of 1%.

**Keywords:** Antibacterial, antibiotic resistant, bile salts, breast milk, fermented vegetables, lactic acid bacteria.

---

\* Author for correspondence: Tel 0984888320; Email: hanhues@gmail.com

# ẢNH HƯỞNG CHẾ PHẨM *LACTOCBAILLUS* DẠNG KẾT HỢP VỚI CHITOSAN, ALGINATE HOẶC CARBOXYMETHYL CELLULOSE TRƯỚC THU HOẠCH ĐẾN CHẤT LƯỢNG CHÔM CHÔM (*Nephelium lappaceum* L.) SAU THU HOẠCH

Thạch Thị Ngọc Yên<sup>1\*</sup>, Nguyễn Văn Phong<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Thành<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm - Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển cây ăn quả miền Nam

## TÓM TẮT

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) là loại trái cây rất được ưa chuộng ở vùng nhiệt đới nhưng dễ bị hư hỏng vì mất nước, hóa nâu và nhiễm nấm bệnh làm giảm chất lượng và giá trị kinh tế của trái. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích khảo sát sự ảnh hưởng của chế phẩm *Lactobacillus* spp. đến chất lượng chôm chôm sau thu hoạch, với phương pháp xử lý (phun) chế phẩm *Lactobacillus* dạng kết hợp với Chitosan, Alginate hoặc CMC trên trái cận thu hoạch ở thời điểm 7 và 14 ngày với 5 nghiệm thức (Đối chứng, *Lactobacillus plantarum* CC6 kết hợp Chitosan 0,03%; *Lactobacillus fermentum* DC2 kết hợp với Chitosan 0,03%, *Lactobacillus plantarum* CC6 kết hợp với CMC 0,5% và *Lactobacillus fermentum* DC2-kết hợp với Alginate 0,03%) sau đó tồn trữ 7 ngày ở điều kiện bảo quản 13°C. Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 4 nghiệm thức xử lý chế phẩm đều hạn chế hao hụt trọng lượng và kiểm soát được hoàn toàn được nấm bệnh sau thu hoạch và khi xử lý trái 7 ngày trước thu hoạch duy trì chất lượng trái cao hơn so với nghiệm thức 14 ngày. Trong đó 2 nghiệm thức DC2-Chito và CC6-CMC có hiệu quả cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Hai nghiệm thức này giữ được độ sáng của vỏ trái (L\*) cao lần lượt là 44,22 và 43,30. Chất lượng của trái được duy trì cao với tỷ lệ TSS% là 19,45% (DC2-Chito) và 19,58% (CC6-CMC). Hàm lượng Vitamin C là 79,03 mg.100g<sup>-1</sup> (DC2-Chito) và 76,98 (CC6-CMC) cao hơn hẳn so với đối chứng, đồng thời mức độ hóa nâu thấp nhất cũng ở nghiệm thức DC2-Chito (1,59) và CC6-CMC (2,13). Từ kết quả trên cho thấy công thức DC2-Chito và CC6-CMC có thể được đề xuất làm chế phẩm xử lý trên trái chôm chôm cận thu hoạch như là một giải pháp có thể áp dụng thay thế nông dược dưỡng trái, an toàn cho sức khỏe của con người và thân thiện với môi trường.

**Từ khóa:** Alginate, Carboxymethyl cellulose, Chitosan, chôm chôm, *Lactobacillus*, sau thu hoạch.

## MỞ ĐẦU

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) (Sapindaceae) có nguồn gốc từ Malaysia, Indonesia và được trồng khắp các vùng nhiệt đới ẩm của Đông Nam Á (Sun *et al.*, 2010). Là loại trái cây có hương thơm, vị ngọt nên rất được ưa chuộng và trồng nhiều ở khu vực phía nam của Việt Nam, diện tích trồng chôm chôm cả nước khoảng 21.600 ha, với sản lượng 314,2 tấn/năm (Cục thống kê 2022). Tuy nhiên vỏ trái chôm chôm dễ bị sẫm màu nhanh chóng sau thu hoạch 2 đến 3 ngày ở nhiệt độ phòng, điều này hạn chế sự hấp dẫn về thị giác và thời hạn sử dụng và khả năng tiếp cận thị trường của chúng cũng bị hạn chế (Zhang *et al.*, 2021).

Theo Schnürer và Magnusson (2005), kiểm soát sinh học có thể giúp kéo dài thời hạn sử dụng và tăng cường tính an toàn của thực phẩm bằng cách sử dụng hệ vi sinh vật tự nhiên hoặc được bổ sung và các sản phẩm kháng khuẩn của chúng. Theo nghĩa này, vi khuẩn axit lactic (LAB) là một phương pháp tiếp cận đầy hứa hẹn vì một số lý do: 1) chúng có sẵn trong các loại thực phẩm như rau và trái cây tươi, 2) được coi là vô hại đối với sức khỏe con người, 3) có trạng thái GRAS (được công nhận chung là an toàn), 4) được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm và 5) có thể hoạt động như tác nhân kiểm soát sinh học do khả năng sản xuất các hợp chất kháng khuẩn và xâm chiếm các mô thực vật dễ bị nhiễm trùng. Các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp khác nhau do LAB tạo ra đã được báo cáo là có hiệu quả chống lại một số tác nhân gây bệnh nấm trong tài liệu: các dẫn xuất hydroxy của axit béo (ví dụ: axit palmitic, stearic, oleic và linoleic), axit hữu cơ (ví dụ: axit phenyllactate, lactic, axetic và propionic) và dipeptide vòng (diketopiperazine) (Lamont *et al.*, 2017).

*Lactobacillus* sp. là nhóm vi khuẩn đặc biệt được quan tâm và đã được phân lập và công bố có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm rất cao. Đây là nhóm vi khuẩn gram dương, kỵ khí không bắt buộc và lên men dị hình có thể được phân lập từ nhiều môi trường khác nhau, chẳng hạn như sữa, thịt, rau lên men và thậm chí cả khoang miệng và đường tiêu hóa của người và động vật. Có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng sử dụng *Lactobacillus* trong bảo quản trái sau thu hoạch nhằm hạn chế sự hóa nâu, ức chế nấm bệnh và duy trì chất lượng trái cây rất hiệu quả như Martínez-Castellanos *et al.*, (2009) đã sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* dạng đơn hoặc dạng

kết hợp với Chitosan có hiệu quả hạn chế hóa nâu và duy trì chất lượng trái chôm chôm sau thu hoạch. Khodaei. (2019) đã sử dụng lớp phủ ăn được với hoạt tính sinh học của *Lactobacillus plantarum* kết hợp CMC đã giúp cải thiện thời gian sử dụng của dâu tây.

Xử lý sau thu hoạch chắc chắn không phải là phương pháp thích hợp nhất để duy trì thời hạn sử dụng và chất lượng quả trong giai đoạn sau thu hoạch. Việc ứng dụng trước thu hoạch có thể được coi là một giải pháp hỗ trợ quan trọng để giải quyết các vấn đề nêu trên về nấm bệnh cũng như chất lượng trái. Tuy nhiên, hiện nay đa số người dân trồng cây ăn quả chỉ có thói quen sử dụng thuốc diệt nấm và thuốc dưỡng trái cận và sau thu hoạch với mong muốn mang lại sản lượng cao và bắt mắt khi đưa ra thị trường tiêu thụ. Nhưng nó là một phương pháp bất lợi, tốn kém và ô nhiễm môi trường đồng thời gây hại cho sức khỏe con người nếu người dân lạm dụng quá mức. Chính vì vậy, các biện pháp xử lý trái cận thu hoạch bằng các phương pháp thay thế với các sản phẩm thân thiện với môi trường ngày càng được đề xuất. Đề tài “Ảnh hưởng chế phẩm *Lactobacillus* dạng kết hợp với chitosan, alginate hoặc carboxymethyl cellulose trước thu hoạch đến chất lượng chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) sau thu hoạch” với mục đích khảo sát sự ảnh hưởng của chế phẩm *Lactobacillus* spp. đến chất lượng chôm chôm sau thu hoạch.

## PHƯƠNG PHÁP VÀ MẪU VẬT NGHIÊN CỨU

### Nguyên vật liệu, hóa chất, thiết bị

Chôm chôm Java; Chitosan trọng lượng phân tử thấp (187 kDa); Alginate; Carboxymethyl cellulose (CMC); *Latobacillus fermentum* DC2, *Lactobaillus plantarum* CC6.

### Chuẩn bị chế phẩm vi khuẩn *Lactobacillus* dạng kết hợp với Chitosan, Alginate hoặc Carboxymethyl cellulose

Các chủng vi khuẩn *L. plantarum* CC6, *L. fermentum* DC2 đã được phân lập, đặc tính và định danh bằng cách sử dụng phương pháp phân tích trình tự gen 16S rRNA, được bảo quản tại Khoa Vi sinh – Khoa Sau thu hoạch – Viện Nghiên cứu Cây trồng Miền Nam. Các chủng vi khuẩn được cấy vào môi trường Man, Rogosa và Sharpe (MRS) và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Sau đó, các tế bào được ly tâm (959x g) ở 5°C trong 15 phút và cặn được rửa bằng dung dịch đệm phosphat 0,02 M (pH 7,0). Sau đó, huyền phù tế bào được điều chỉnh đến  $10^8$  CFU/mL và bảo quản ở 10°C trong thời gian không quá 24 giờ. Sau đó nó được sử dụng cho công thức tạo chế phẩm tương ứng với Chitosan 0,05%, CMC 0,5% và Alginate 0,03% (Thạch Thị Ngọc Yến *et al.*, 2024).

Chế phẩm vi khuẩn *Lactobacillus*: CC6-Chito (*Lastobacillus plantarum* CC6 kết hợp chất bổ sung Chitosan 0,05%), DC2-Chi (*Lactobacillus fermentum* DC2 kết hợp với chất bổ sung Chitosan 0,05%), CC6-CMC (*Lastobacillus plantarum* CC6 kết hợp với chất bổ sung CMC 0,5%) và DC2-SA (*Lactobacillus fermentum* DC2 kết hợp với chất bổ sung Alginate 0,03%) (Bản công thức được xây dựng dựa vào kết quả nghiên cứu của Thạch Thị Ngọc Yến *et al.*, (2024): mật số vi khuẩn  $10^8$  được chọn lọc do có hiệu quả ức chế nấm bệnh và duy hiệu quả duy trì chất lượng trái sau thu hoạch tốt nhất; Nồng độ Chitosan 0,05%, Alginate 0,03% và CMC 0,5% được lựa chọn nồng độ tối ưu qua phương pháp MIC - Nồng độ ức chế tối thiểu).

### Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trên vườn chôm chôm Java 6 năm tuổi tại xã Vĩnh Bình, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre vụ thuận. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có mười lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng một cây. Các nghiệm thức bao gồm: (1) đối chứng (phun nước); (2) CC6-Chito; (3) DC2-Chito (4) CC6-CMC và DC2-SA (5) phun trực tiếp lên chùm trái đã treo thể thí nghiệm 2 lần vào lúc sáng sớm, vào giai đoạn 14 ngày và 7 ngày trước thu hoạch.

Chỉ tiêu theo dõi: Chôm chôm sau khi thu hoạch được đem về phòng bảo quản sau thu hoạch và tồn trữ ở 13°C, sau 7 ngày và kiểm tra các chỉ tiêu về: màu sắc vỏ trái (L, a, b), TSS%, TA%, vitamin C, hao hụt trọng lượng, chỉ số hóa nâu và tỷ lệ nhiễm nấm bệnh.

### Đo lường chất lượng

Để đo lường chất lượng quả, việc đánh giá được thực hiện với 3 lần lặp lại và mỗi nghiệm thức xử lý gồm 15 quả sau thời gian bảo quản 5 ngày. Màu sắc của vỏ trái cây của mỗi phương pháp xử lý được đo bằng Máy đo sắc độ CR-400 (Minolta, Osaka, Nhật Bản) bên trong hộp với điều kiện ánh sáng LED được kiểm soát, thể hiện qua các giá trị L\* biểu thị độ sáng, giá trị a\* biểu thị màu đỏ (+) hoặc màu xanh lục (-) và giá trị b\* biểu thị màu vàng (+) hoặc màu xanh lam (-). Một tiêu chuẩn tham chiếu màu trắng đã được sử dụng để hiệu chuẩn thiết bị. Giá trị độ sáng càng thấp thì màu nâu càng nghiêm trọng. Những chiếc gai mềm của quả được loại bỏ trước khi đo. Ba phép đo được thực hiện trên mỗi mẫu tại các điểm cách đều nhau trên trục xích đạo.

Chỉ số hóa nâu được xác định bằng phương pháp được mô tả bởi Zhang *et al.* (2015) với một số sửa đổi. Màu nâu của vỏ quả chôm chôm được đánh giá bằng mắt bằng cách đánh giá mức độ diện tích màu nâu trên mỗi bề mặt quả theo thang đo sau: Lớp 0 = không chuyển sang màu nâu; Loại 1 = 1–25% hóa nâu; Loại 2 = hóa nâu 26–50%; Loại 3 = hóa nâu 51–75%; Loại 4 = 76–100% hóa nâu. Chỉ số hóa nâu được tính bằng  $\sum$  (thang độ hóa nâu x số quả tương ứng trong mỗi lần xử lý) / (4 x tổng số quả) (Zhang *et al.*, 2021).



Tỷ lệ mắc bệnh được tính bằng tỷ lệ giữa số quả có đốm bệnh trên tổng số quả ( $n = 20$ ) (Zhang *et al.*, 2021).

Hao hụt trọng lượng: được đo bằng cân kỹ thuật số. Quả được cân khi bắt đầu bảo quản và sau hai ngày phân tích và biểu thị bằng phần trăm hao hụt trọng lượng. Tỷ lệ hao hụt trọng lượng của quả (% WL) được tính theo công thức sau:

$$WL (\%) = [(W_i - W_0)/W_0] \times 100\%$$

Trong đó  $W_t$  là khối lượng (g) tại mỗi thời điểm và  $W_0$  là khối lượng ban đầu (g) của mỗi mẫu.

Nước ép được chiết xuất đến thể tích xác định. Tổng hàm lượng chất rắn hòa tan (TSS) và độ axit chuẩn độ (TA) từ nước ép chôm chôm được xác định bằng máy đo độ axit Brix bỏ túi (ATAGO®) được báo cáo lần lượt là % Brix và % TA. Hàm lượng vitamin C (mg/100 g) được xác định bằng phương pháp chuẩn độ (Arya *et al.*, 2000).

### Phân tích thống kê

Thí nghiệm bao gồm một thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên với sự sắp xếp giai thừa của các biến số và mỗi nghiệm thức bao gồm ba lần lặp lại để đánh giá chất lượng quả. Các phương tiện được phân tích bằng ANOVA một chiều của SAS phiên bản 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Sự khác biệt đáng kể giữa các phương tiện được so sánh bằng cách sử dụng sai biệt có ý nghĩa nhỏ nhất (LSD) ở  $p < 0,05$ .

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Màu sắc vỏ trái

Màu sắc là một trong những chỉ tiêu cảm quan quan trọng đối với tất cả loại trái cây. Đối với quả chôm chôm khi thu hoạch vỏ trái có 75% đỏ và 25% vàng, độ sáng cao. Sau khi thu hoạch và bảo quản quả trái thường đậm màu hơn và độ sáng giảm xuống làm giảm tính cảm quan khi tiêu thụ. Chỉ số màu sắc vỏ quả chôm chôm được xác định thông qua giá trị  $L^*$  (độ sáng) và giá trị  $a^*$  (sắc đỏ),  $b^*$  (sắc xanh).

Kết quả khi xử lý ở thời điểm 7 ngày trước thu hoạch (Bảng 1), độ sáng ( $L^*$ ) khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nghiệm thức có độ sáng vỏ trái cao là DC2-Chito (44,22) kế đến là các nghiệm thức CC6-CMC (43,30), CC6-Chito (43,03) và DC2-SA (43,43) so với đối chứng ở giá trị  $L^*$  thấp nhất (39,78). So với thời điểm phun chế phẩm ở thời điểm 14 ngày trước thu hoạch (Bảng 1) thì độ sáng vỏ trái có thấp hơn, thấp nhất vẫn là nghiệm thức đối chứng (39,76) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 4 nghiệm thức xử lý trái bởi chế phẩm lần lượt là CC6-Chito (40,60), DC2-Chito (41,07), CC6-CMC (40,96) và DC2-SA (41,27). Màu sắc vỏ trái được duy trì có thể do hoạt động có tác dụng của chế phẩm ức chế sự hóa nâu, hạn chế sự thay đổi màu sắc của vỏ trái, kết quả phù hợp với nghiên cứu của Martínez *et al.*, (2009) cho rằng việc sử dụng lactobacilli trên vỏ quả chôm chôm đã tạo ra quá trình axit hóa vỏ quả và tránh bị thâm; do đó, ngăn ngừa được tình trạng khô héo do hình thành màng sinh học.

Giá trị  $a^*$ ,  $b^*$  có khác biệt nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê, có thể giải thích là do màu sắc vỏ trái (đỏ, vàng) khi thu hoạch đủ độ chín ít thay đổi tiếp tục sau khi thu hoạch.

**Bảng 1.** Màu sắc vỏ trái chôm chôm sau 7 ngày tồn trữ với nghiệm thức xử lý ở thời điểm 7 và 14 ngày trước thu hoạch

Nghiệm thức	7 ngày trước thu hoạch			14 ngày trước thu hoạch		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Đối chứng	39,78 <sup>b</sup>	20,68 <sup>a</sup>	30,42 <sup>a</sup>	39,76 <sup>b</sup>	20,89 <sup>a</sup>	30,22 <sup>a</sup>
CC6-Chito	43,03 <sup>a</sup>	21,13 <sup>a</sup>	30,84 <sup>a</sup>	40,60 <sup>ab</sup>	20,96 <sup>a</sup>	30,99 <sup>b</sup>
DC2-Chito	44,22 <sup>a</sup>	21,22 <sup>a</sup>	30,75 <sup>a</sup>	41,07 <sup>ab</sup>	20,78 <sup>a</sup>	32,08 <sup>a</sup>
CC6-CMC	43,30 <sup>a</sup>	20,61 <sup>a</sup>	29,43 <sup>a</sup>	40,95 <sup>ab</sup>	20,85 <sup>a</sup>	30,43 <sup>c</sup>
DC2-SA	42,43 <sup>a</sup>	20,91 <sup>a</sup>	30,11 <sup>a</sup>	41,27 <sup>ab</sup>	20,99 <sup>a</sup>	30,50 <sup>bc</sup>
CV%	3,14	2,63	1,67	1,72	0,66	0,89

Các giá trị trung bình có chỉ số trên khác nhau trong cùng một cột khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức  $p \leq 0,05$ .  
CV là hệ số biến thiên.

### Tổng lượng chất rắn hòa tan (TSS%), TA% và vitamin C

Tổng hàm lượng chất rắn hòa tan và độ axit có thể chuẩn độ là những chỉ số quan trọng để đánh giá và nhận dạng chất lượng trái cây và có thể thể hiện tốt nhất hương vị của trái cây. Trước đây, người ta đã chứng minh rằng hàm lượng TSS cao hơn có thể duy trì hiệu quả chất lượng hương vị trái cây trong thời gian bảo quản và sự trưởng thành, lão hóa của trái cây sau khi thu hoạch sẽ dẫn đến giảm hàm lượng TSS, ảnh hưởng đến chất lượng hương vị (Sajid *et al.*, 2019b).

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở thời điểm xử lý chế phẩm 7 ngày trước thu hoạch: hàm lượng chất rắn hòa tan (TSS%) ở nghiệm thức đối chứng thấp nhất 19,13% khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức xử lý chế phẩm CC6-Chito, DC2-Chito, CC6-CMC và DC2-SA lần lượt là 19,37%; 19,58%; 19,45% và 19,41%. Ở thời

điểm xử lý trái 14 ngày trước thu hoạch thì hàm lượng TSS% thấp hơn so với xử lý ở 7 ngày, cụ thể nghiệm thức đối chứng tỷ lệ TSS% thấp nhất là 18,6% khác biệt so với 4 nghiệm thức CC6-Chito (19,03%), DC2-Chito (19,03%), CC6-CMC (19,02%) và DC2-SA (19,36%) (Bảng 3). Sự khác biệt này có thể là do hoạt động sinh acid lactic của vi khuẩn *Lactobacillus* trên bề mặt vỏ trái đã làm chậm quá trình lão hóa của trái so với nghiệm thức đối chứng (Martínez *et al.*, 2009).

Trong nghiên cứu này hầu như không ảnh hưởng đến hàm lượng TA%, TA% ở tất cả các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 2, 3).

Hàm lượng vitamin C trong trái cây là một chỉ số quan trọng vì nó ảnh hưởng đến chất lượng và dinh dưỡng của trái cây và những thay đổi về vitamin C có liên quan đến nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như căng thẳng sinh lý và điều kiện bảo quản. Ngoài ra, vitamin C còn đóng vai trò loại bỏ oxy hóa (ROS-reactive oxygen species) và giảm tổn thương do oxy hóa (Lai *et al.*, 2020). Các nghiệm thức duy trì Vitamin C tốt lần lượt là CC6-Chito (79,11 mg.100g<sup>-1</sup>) và DC2-Chito (79,03 mg.100g<sup>-1</sup>) ở thời điểm xử lý 7 ngày trước thu hoạch và DC2-Chito (78,11 mg.100g<sup>-1</sup>) và DC2-SA (78,01 mg.100g<sup>-1</sup>) ở thời điểm xử lý 14 ngày trước thu hoạch cao hơn nghiệm thức đối chứng là 74,97 và 75,61 mg.100g<sup>-1</sup> lần lượt 7 và 14 ngày xử lý trước thu hoạch. Nhìn chung, hàm lượng vitamin C ở nghiệm thức xử lý 7 ngày trước thu hoạch dần có hiệu quả duy trì hàm lượng Vitamin C tốt hơn so với 14 ngày.

**Bảng 2. Mức độ hóa nâu, hao hụt trọng lượng và thành phần sinh hóa của chôm chôm xử lý chế phẩm 7 ngày trước thu hoạch**

Nghiệm thức	Mức độ hóa nâu (1-5)	Hao hụt trọng lượng (%)	TSS%	TA%	Vitamin C (mg.100g <sup>-1</sup> )
Đối chứng	2,65 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup>	19,13 <sup>b</sup>	5,19 <sup>a</sup>	74,79 <sup>c</sup>
CC6-Chito	2,44 <sup>ab</sup>	0,66 <sup>b</sup>	19,37 <sup>a</sup>	5,34 <sup>a</sup>	79,11 <sup>b</sup>
DC2-Chito	1,56 <sup>c</sup>	0,51 <sup>b</sup>	19,58 <sup>a</sup>	5,33 <sup>a</sup>	79,03 <sup>a</sup>
CC6-CMC	2,14 <sup>b</sup>	0,66 <sup>b</sup>	19,45 <sup>a</sup>	5,28 <sup>a</sup>	76,98 <sup>b</sup>
DC2-SA	2,22 <sup>b</sup>	0,62 <sup>b</sup>	19,41 <sup>a</sup>	5,19 <sup>a</sup>	76,74 <sup>b</sup>
CV%	9,32	6,71	1,02	2,81	1,05

Các giá trị trung bình có chỉ số trên khác nhau trong cùng một cột khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức  $p \leq 0,05$ . CV là hệ số biến thiên.

**Bảng 3. Mức độ hóa nâu, hao hụt trọng lượng và thành phần sinh hóa của chôm chôm xử lý chế phẩm 14 ngày trước thu hoạch**

Nghiệm thức	Mức độ hóa nâu (1-5)	Hao hụt trọng lượng (%)	TSS%	TA%	Vitamin C (mg.100g <sup>-1</sup> )
Đối chứng	2,73 <sup>a</sup>	1,99 <sup>a</sup>	18,60 <sup>b</sup>	5,55 <sup>a</sup>	75,61 <sup>c</sup>
CC6-Chito	2,44 <sup>b</sup>	0,73 <sup>b</sup>	19,03 <sup>a</sup>	5,42 <sup>a</sup>	76,67 <sup>b</sup>
DC2-Chito	1,75 <sup>d</sup>	0,57 <sup>c</sup>	19,03 <sup>a</sup>	5,3 <sup>a</sup>	78,11 <sup>a</sup>
CC6-CMC	2,12 <sup>c</sup>	0,65 <sup>bc</sup>	19,02 <sup>a</sup>	5,25 <sup>a</sup>	76,92 <sup>b</sup>
DC2-SA	2,23 <sup>bc</sup>	0,70 <sup>b</sup>	19,36 <sup>a</sup>	5,27 <sup>a</sup>	78,01 <sup>a</sup>
CV%	5,84	5,19	0,95	3,87	0,64

Các giá trị trung bình có chỉ số trên khác nhau trong cùng một cột khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức  $p \leq 0,05$ . CV là hệ số biến thiên.

### Hao hụt trọng lượng

Bảng 2 cho thấy kết quả hao hụt trọng lượng trái khi xử lý ở 7 ngày trước thu hoạch, kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nghiệm thức xử lý. Hao hụt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng 1,82% kế tiếp là nghiệm thức CC6-Chito, DC2-SA (0,66%) và CC6-CMC là 0,62%) và nghiệm thức có sự hao hụt trọng lượng thấp nhất là DC2-Chito (0,51%).

Bảng 3 cho thấy kết quả hao hụt trọng lượng trái khi xử lý ở 14 ngày trước thu hoạch, kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nghiệm thức xử lý. Hao hụt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng 1,99% kế tiếp là nghiệm thức CC6-Chito, DC2-SA và CC6-CMC lần lượt là (0,73%, 0,70% và 0,65%) và nghiệm thức có sự hao hụt trọng lượng thấp nhất là DC2-Chito (1,57%). Kết quả phù hợp với nghiên cứu của nhiều báo cáo đã công bố khi ứng dụng vi khuẩn *Lactobacillus* trong bảo quản chôm chôm (Martínez *et al.*, 2009), vải (Keiko Shirai., 2011); hoặc thu nhận acid phenyllactic từ chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. trong bảo quản nông sản (Vũ Kim Dung *et al.*, 2021).

Sự giảm trọng lượng của chôm chôm chủ yếu là do mất độ ẩm thông qua sự thoát hơi nước của spintern và cutin. Chôm chôm tươi có màu đỏ tươi hoặc vàng khi thu hoạch, nhưng việc giảm trọng lượng sẽ khiến vỏ và quả chôm chôm bị chuyển sang màu nâu/sậm màu trên diện rộng trong quá trình bảo quản (Landrigan *et al.* 1996). Nghiệm thức DC2-Chito có kết quả hao hụt trọng lượng thấp nhất. Sản phẩm thử cấp của vi khuẩn *Lactobacillus* như bacteroxin, acid béo và pH thấp do acid lactic của vi khuẩn tiết ra có khả năng ức chế sự phát triển của nấm và vi khuẩn gây bệnh trên vỏ trái chôm chôm do đó duy trì tính toàn vẹn của lớp biểu bì, giảm sự không bị mất nước và duy trì trọng lượng quả. Ngoài ra, chitosan có đặc tính tạo màng tuyệt vời, giúp dễ dàng tạo thành màng bán thấm trên bề mặt, giúp duy trì trọng lượng quả cao hơn (Marat *et al.*, 2016).

### Mức độ hóa nâu

Kết quả được thể hiện ở bảng 2 cho thấy khi xử lý ở thời điểm 7 ngày cận trước hoạch mức độ hóa nâu của chôm chôm khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nghiệm thức. Nghiệm thức DC2-Chito có mức độ hóa nâu thấp nhất (1,56) kể đến là các nghiệm thức CC6-CMC và DC2-SA lần lượt là 2,14 và 2,22 so với đối chứng có mức độ hóa nâu cao nhất là 2.65.

Ở thời điểm xử lý 14 ngày (Bảng 3) mức độ hóa nâu có cao hơn so với xử lý ở 7 ngày (Bảng 2) trước thu hoạch. Cụ thể, các nghiệm thức có khác biệt ý nghĩa thống kê. Mức độ hóa nâu thấp nhất là nghiệm thức DC2-Chito (1,75) kể đến là CC6-CMC (2,13), DC2-SA (2,23), và CC6-Chito (2,44). Mức độ hóa nâu cao nhất là 2,73 ở nghiệm thức đối chứng.

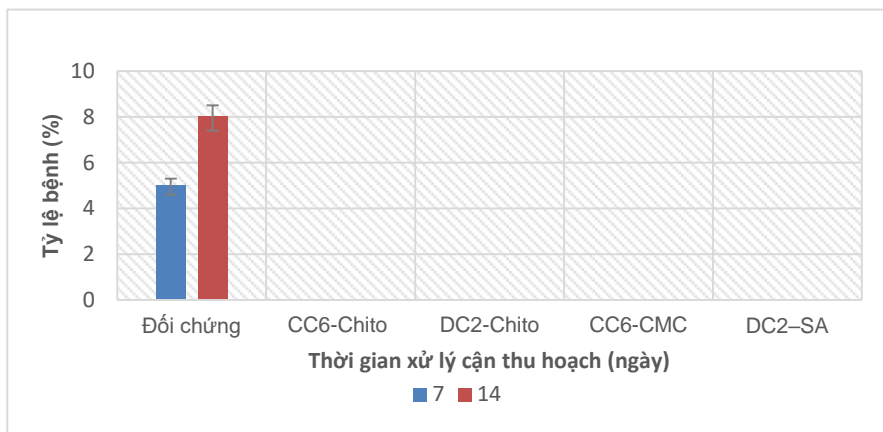
Có thể thấy sự kết hợp giữa vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* DC2 với Chitosan 0,05% (DC2-Chito) giúp hạn chế sự hóa nâu rất tốt ở vỏ trái chôm chôm. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đó đã công bố về khả năng sinh acid lactic của vi khuẩn LAB đã tạo pH thấp trên bề mặt vỏ trái, làm chậm quá trình hóa nâu vỏ trái (Martínez *et al.*, 2009). Bên cạnh đó Chitosan theo công bố là có khả năng tạo nên lớp màng bán thấm quanh bề mặt vỏ trái, giúp thay đổi bầu không khí bên trong, làm giảm mức độ hô hấp và hoạt động trao đổi chất của trái. Do đó, nó có khả năng làm giảm quá trình chín và lão hóa của vỏ trái (Petriccione *et al.*, 2015).

### Tỷ lệ nhiễm nấm bệnh sau thu hoạch

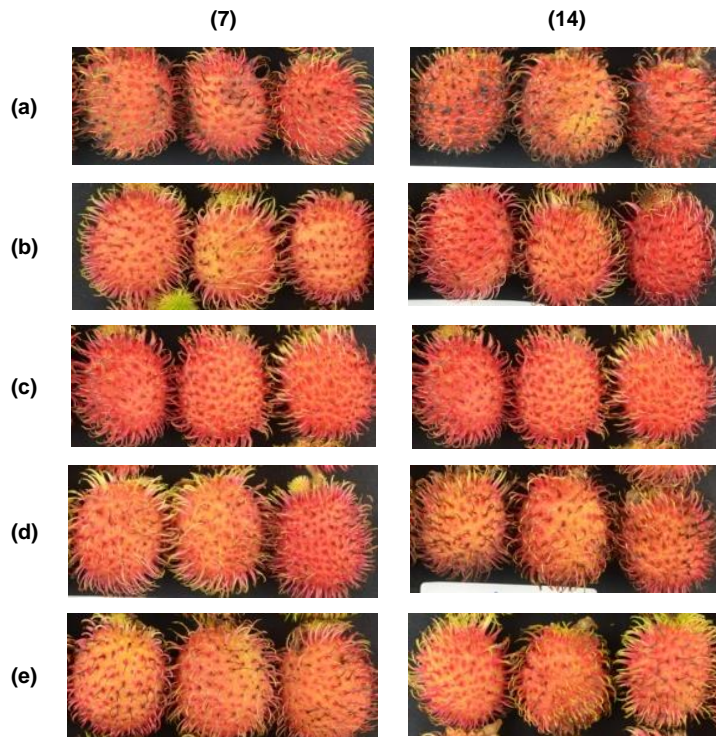
Kết quả hình 1 cho thấy hầu như tất cả các nghiệm thức xử lý trái cận thu hoạch ở 2 thời điểm 7 và 14 ngày trước thu hoạch đều hạn chế được nấm bệnh sau thu hoạch. Kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng có tỷ lệ nhiễm nấm 4.9 đến 8% (Hình 1, Bảng 4).

Kết quả này có thể giải thích do chế phẩm vi khuẩn *Lactobacillus* cùng với các chất mang đã tạo nên màng bao biofilm trên bề mặt vỏ trái và ức chế sự phát triển của nấm bệnh do *Lactobacillus* có khả năng tiết ra acid lactic làm giảm pH vỏ trái và vi khuẩn sinh trưởng tạo thành Biofilm với chất bổ sung CMC, Chitosan và Alginate ở nồng độ thích hợp đã được chứng minh có khả năng vừa tạo lớp keo mỏng giúp vi khuẩn bám dính trên bề mặt vỏ trái vừa hỗ trợ sự tăng trưởng của quần thể vi khuẩn trên bề mặt vỏ trái. Theo công bố của Palma-Guerrero *et al.*, 2009 thì bên cạnh khả năng thẩm thấu màng, chitosan còn có thể xâm nhập vào tế bào nấm gây bệnh. Bên cạnh đó, chitosan còn có khả năng làm mất tổ chức của tế bào, phá vỡ thành tế bào và gây biến dạng các vách ngăn giữa các tế bào của nấm gây bệnh trên trái.

Như vậy, có thể suy ra rằng sự có mặt của chất chống oxy hóa do vi khuẩn tiết ra và sự hình thành lớp bảo vệ từ các chất kết hợp (Chitosan, Alginate và CMC) góp phần duy trì độ ẩm trong vỏ trái cây và tăng cường đặc tính kháng nấm của vi khuẩn. Nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh khả năng ức chế nấm bệnh của vi khuẩn *Lactobacillus* cũng như Chitosan và CMC. Khodaei. (2019) đã duy trì chất lượng dầu tươi với lớp phủ ăn được có hoạt tính sinh học của *L. plantarum* kết hợp với CMC.



Hình 1. Tỷ lệ nhiễm nấm bệnh trên chôm chôm ở thời điểm 7 và 14 ngày xử lý trước thu hoạch (Cột hiển thị tỷ lệ bệnh trung bình của từng phương pháp xử lý và error bar hiển thị độ lệch chuẩn).



Hình 2. Bệnh sau thu hoạch trên chôm chôm ở thời điểm bảo quản 7 ngày

(a) Đối chứng; (b) CC6-Chito; (c) DC2-Chito; (d) CC6-CMC; (e) DC2-SA; (7) Nghiệm thức xử lý 7 ngày cận thu hoạch và (14) Nghiệm thức xử lý 14 ngày cận thu hoạch.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### Kết luận

Xử lý chôm chôm ở thời điểm 7 ngày cận thu hoạch là một giải pháp an toàn để hỗ trợ duy trì chất lượng và chậm quá trình lão hóa của chôm chôm sau thu hoạch. Sử dụng DC2-Chito (*Lactobacillus fermentum* DC2 kết hợp Chitosan 0,03%) và CC6-CMC (*Lactobacillus plantarum* CC6 kết hợp CMC 0,5%) cho hiệu quả duy trì chất lượng trái thông qua hạn chế tối đa giảm hàm lượng TSS%, TA% và Vitamin C của trái. Hoạt động của vi sinh vật *Lactobacillus* trên bề mặt vỏ trái đã tạo ra pH thấp chống oxy hóa và giảm sự hóa nâu, ít hao hụt trọng lượng và ức chế sự phát triển của nấm bệnh trên vỏ trái chôm chôm sau thu hoạch. Sử dụng chế phẩm *Lactobacillus* trên trái chôm chôm cận thu hoạch là một giải pháp có thể áp dụng thay thế nông dược dưỡng trái có thể gây độc hại đến sức khỏe của người tiêu dùng.

### Đề nghị

Cần nghiên cứu sâu hơn về chất bổ sung thích hợp hơn nữa với *Lactobacillus* để duy trì màu sắc, giữ sự căng bóng trái và đồng thời cũng duy trì chất lượng trái sau thu hoạch.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arya SP, Mahajan M, Jain P (2000). Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Anal. Chim*, 417, 1–14.
- Lamont JR, Wilkins O, Bywater-Ekegård M & Smith DL (2017). From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production *Soil Biol Biochem* 111, 19.
- Lai D, Shao XH, Xiao WQ, Fan C, Liu CH, He H, Tian S, Kuang S (2020). Suppression of fruit decay and maintenance of storage quality of litchi by *Photobacterium luminescens* Hb1029 treatment. *Sci. Hortic* 259:108836. doi: 10.1016/j.scienta.2019.108836.
- Keiko Shirai. 2011. Postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn) quality preservation by *Lactobacillus plantarum*. *Postharvest Bio Tec.* 59.2.
- Kaya M, Daubaras R, Cesoniene L, Leskauskaitė D, Zabulione D (2016). Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. *International Journal of Biological Macromolecules*.85, 355- 360.
- Martínez-Castellanos G, Pelayo-Zaldívar C, Pérez-Flores LJ, López-Luna A, Gimeno M, Bárzana E, Shirai K (2011). Postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) quality preservation by *Lactobacillus plantarum*. *Postharvest Biol Technol* 59, 172–178.

- Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J & Schnürer J (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria *FEMS Microbiol. Lett.* 219 129 135.
- Martínez-Castellanos G, Shirai K, Pelayo-Zaldívar C, Pérez-Flores LJ, Sepúlveda-Sánchez JD. Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Food Microbiol* 2009 Jun;26(4):444-9. doi: 10.1016/j.fm.2009.02.003. Epub 2009 Feb 27. PMID: 19376469.
- Petriccione M, Pasquariello M, Mastrobuoni F, Zampella L, Patre D, Scortichini M (2015). Influence of a chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of loquat fruit during postharvest life. *Scientia Horticulturae* VI 197. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.051.
- Sun J, Su WQ, Peng HX, Zhu JH, Xu LX, Nuria MB (2010). Two endogenous substrates for polyphenoloxidase in pericarp tissues of postharvest rambutan fruit. *J Food Sci* 2010 Aug 1;75(6):C473-7. https://doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01660.
- Thạch Thị Ngọc Yến, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Phong và Ngô Văn Tài (2024). Improve the Effectiveness of Inhibiting Pathogenic Fungus and Maintaining the Quality of Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Post-Harvest by Indigenous Lactic Bacteria. *Horticulturae* 2024, 10(3), 298; https://doi.org/10.3390/horticulturae10030298.
- Vũ Kim Dung, Nguyễn Như Ngọc, Lê Sỹ Dũng, Vũ Thị Ngọc Hiền (2021). Thu thập axit phenyllactic từ một chủng *Lactobacillus* sp. và ứng dụng trong bảo quản sản phẩm nông nghiệp. *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm.* 4(1):11-12 doi:10.47866/2615-9252/vjfc.2776
- Zhang R, Yuan Z, Jiang Y, Jiang F & Chen P (2021). Sodium nitroprusside functions in browning control and quality maintaining of postharvest rambutan fruit. *Front Plant Sci* 12 795671 https://doi.org/10.3389/fpls.2021.795671.

## EFFECTS OF LACTOBACILLUS PRODUCTS COMBINED WITH CHITOSAN, ALGINATE OR CARBOXYMETHYL CELLULOSE BEFORE HARVEST ON THE QUALITY OF RABBITAM (*Nephelium lappaceum* L.) POST-HARVEST.

Thạch Thị Ngọc Yến<sup>1\*</sup>, Nguyễn Văn Phong<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Thành<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, 3/2 Street, Can Tho 900000, Vietnam*

<sup>2</sup> *Southern Horticultural Research Institute, 1A Highway, Chau Thanh 840000, Vietnam*

### SUMMARY

Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) is a very popular fruit in the tropics but is easily damaged by dehydration, browning and fungal infections, reducing the quality and economic value of the fruit. This study was conducted with the purpose of investigating the effects of *Lactobacillus* spp. quality of rambutan after harvest, with the method of treating (spraying) *Lactobacillus* preparations combined with Chitosan, Alginate or CMC on pre-harvest fruit at 7 and 14 days with 5 treatments (Control, *Lactobacillus plantarum* CC6 combined with Chitosan 0.03%; *Lactobacillus fermentum* DC2 combined with Chitosan 0.03%, *Lactobacillus plantarum* CC6 combined with CMC 0.5% and *Lactobacillus fermentum* DC2 - combined with Alginate 0.03%) Store for 7 days at 13°C storage conditions. The experimental results showed that all 4 treatments limited weight loss and completely controlled post-harvest fungal diseases and when treating the fruit 7 days before harvest, the fruit quality was maintained higher than the 14-day treatment. Of which, the 2 treatments DC2-Chito and CC6-CMC were the most effective compared to the remaining treatments. These two treatments maintained the brightness of the fruit peel (L\*) at 44.22 and 43.30, respectively. The quality of the fruit was maintained at a high level with TSS% ratios of 19.45% (DC2-Chito) and 19.58% (CC6-CMC). The Vitamin C content was 79.03 mg.100g-1 (DC2-Chito) and 76.98 (CC6-CMC) which was much higher than the control, and the lowest browning level was also in the DC2-Chito (1.59) and CC6-CMC (2.13) treatments. The above results show that the formula DC2-Chito and CC6-CMC can be proposed as a treatment for near-harvest rambutan fruit as a solution that can be applied to replace fruit-nourishing chemicals, safe for human health and environmentally friendly.

**Keywords:** Alginate, Carboxymethyl cellulose, *Lactobacillus*, Chitosan, Postharvest. Rambutan.

\* Author for correspondence: Tel: 0917476982; Email: thachyen31@gmail.com

## NÂNG CAO HIỆU QUẢ SẢN XUẤT NHỰA SINH HỌC POLYHYDROXYBUTYRATE TỪ GLYCEROL THÔ BẰNG CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* PHB-08

Tạ Doãn Thành<sup>1,4</sup>, Chiang Chung Jen<sup>2</sup>, Lưu Nguyễn Luận<sup>1</sup>, Đoàn Thị Trâm<sup>1,4</sup>, Chao Yun Peng<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Kỹ thuật Hóa học, Đại học Phùng Giáp, Đài Trung, Đài Loan (Trung Quốc)

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Xét nghiệm Y học và Công nghệ Sinh học, Đại học Y Trung Hoa, Đài Trung, Đài Loan (Trung Quốc)

<sup>3</sup>Khoa Nghiên cứu Y học, Bệnh viện Đại học Y khoa Trung Quốc, Đài Trung, Đài Loan (Trung Quốc)

<sup>4</sup>Ban Công nghệ Sinh học, Công ty AVATAACK, Tập đoàn Four Pillar, Đài Loan (Trung Quốc)

### TÓM TẮT

Nhựa có nguồn gốc từ dầu mỏ rất khó phân hủy và có khả năng gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến nền kinh tế biển Việt Nam nếu như không được kiểm soát hợp lý. Polyhydroxybutyrate (PHB) là một dạng nhựa sinh học có thể bị phân hủy bởi vi sinh vật và có tính năng tương đồng với các loại nhựa có nguồn gốc dầu mỏ. Chi phí sản xuất PHB đa phần được chi cho nguồn carbon đầu vào. Để tăng tính cạnh tranh của PHB trên thị trường nhựa, chủng *Escherichia coli* PHB-08 đã được phát triển với tính năng chuyển hóa glycerol thô – phụ phẩm chính của quá trình sản xuất dầu diesel sinh học – thành PHB. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men và ion magiê ( $Mg^{2+}$ ) lên quá trình lên men của chủng PHB-08 đã được khảo sát. Nồng độ tối ưu của cao nấm men và  $Mg^{2+}$  đã được sử dụng trong lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng (fed-batch), từ đó cải thiện tốc độ sản xuất PHB lên 25% (1,5 g/L.h). Trong 25 h lên men, khối lượng tế bào khô đạt được là  $48,4 \pm 2,8$  g/L, trong đó có chứa  $73,8 \pm 1,7\%$  (w/w) là PHB với năng suất là 0,33g PHB /g glycerol tiêu thụ. Kết quả của nghiên cứu cho thấy chủng *Escherichia coli* PHB-08 có tiềm năng hứa hẹn để phát triển nền tảng công nghệ sản xuất nhựa sinh học PHB từ glycerol thô quy mô công nghiệp.

*Từ khóa:* *Escherichia coli*, fed-batch, glycerol thô, nhựa sinh học, polyhydroxybutyrate.

### MỞ ĐẦU

Nhựa là vật liệu được sử dụng rộng rãi trong hoạt động sản xuất và đời sống hiện đại. Đa số các sản phẩm nhựa trên thị trường được sản xuất từ nguyên liệu hóa thạch. Tuy nhiên, nhựa có nguồn gốc từ nguyên liệu hóa thạch rất khó phân hủy, dễ dàng tích tụ trong chuỗi thức ăn gây ảnh hưởng xấu đến môi trường, đặc biệt đối với hệ sinh thái biển. Nền kinh tế Việt Nam với hơn 40% GDP đến từ biển sẽ chịu ảnh hưởng nghiêm trọng nếu ô nhiễm nhựa không được kiểm soát một cách hợp lý (Vũ Tuấn Hưng và Nguyễn Danh Nam, 2021).

Polyhydroxyalkanoate (PHA) là một dạng nhựa sinh học có khả năng phân hủy bởi vi sinh vật trong môi trường tự nhiên (đất và nước biển), tạo thành các phân tử cơ bản (nước và  $CO_2$ ). PHA có tiềm năng được sử dụng trong công nghiệp đóng gói nhờ đặc tính vật liệu tương tự như các loại nhựa truyền thống trên thị trường (polyethylene, polypropylene...) (Keskin *et al.*, 2017). Với xu hướng phát triển bền vững, các phân tích thị trường cho thấy thị phần nhựa sinh học trên thị trường nhựa được dự đoán sẽ đạt ngưỡng 40% vào năm 2030 (khoảng 324 tỷ USD) (Zhao *et al.*, 2020).

Polyhydroxybutyrate (PHB) là một dạng PHA phổ biến. Chi phí cho nguồn carbon đầu vào chiếm hơn 40% tổng chi phí sản xuất PHB (Kim, 2000). Do đó, việc lựa chọn nguồn carbon đầu vào rất quan trọng để PHB có thể cạnh tranh với các sản phẩm nhựa truyền thống. Với nồng độ carbon cao, glycerol thô – phụ phẩm chính của quá trình transester hóa trong sản xuất dầu diesel sinh học từ dầu thực vật, mỡ cá, mỡ động vật – rất thích hợp để làm nguồn nguyên liệu cho quá trình lên men sản xuất nhựa sinh học PHB. Việc tận dụng glycerol thô vừa làm tăng giá trị kinh tế của nhựa sinh học PHB, vừa làm tăng tính phát triển bền vững của công nghiệp sản xuất dầu diesel sinh học.

Dưới sự hợp tác của Tập đoàn Four Pillars và Đại học Phùng Giáp, Đài Loan (Trung Quốc), chúng tôi đã phát triển thành công chủng vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) PHB-08 để sản xuất PHB từ glycerol thô (Ta *et al.*, 2023). Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng PHB-08 trong lên men 29 h đã đạt tốc độ sản xuất trung bình là  $1,2 \pm 0,1$  g/L.h, tạo ra hàm lượng tế bào khô (CDW) là  $53,8 \pm 4,1$  g/L với PHB chiếm  $66,5 \pm 2,8\%$  (w/w) và đã tiêu thụ đến  $95,6 \pm 0,9\%$  lượng glycerol thô đầu vào.

Để tiếp tục nâng cao hiệu suất của quá trình sản xuất PHB từ glycerol thô, nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của thành phần cao nấm men và ion magiê ( $Mg^{2+}$ ) trong chất dinh dưỡng đối với quá trình lên men chủng PHB-08. Sau đó, kết quả tối ưu sẽ được sử dụng cho quá trình lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng (fed-batch).

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *E. coli* PHB-08 được Tập đoàn Four Pillars phát triển cùng với Đại học Phùng Giáp, Đài Loan (Trung Quốc) và hiện đang được lưu trữ tại bộ sưu tập chủng giống của Trung tâm Nghiên cứu và Sưu tập Tài nguyên Sinh học Đài Loan, Trung Quốc (BCRC) với mã số BCRC911222. Chủng PHB-08 này được nghiên cứu dựa trên chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp N31 (*P<sub>trc</sub>-gfp*,  $\lambda$ <sub>P<sub>R</sub></sub>-*gldA*,  $\lambda$ <sub>P<sub>R</sub></sub>-*dhaK*) được tăng cường biểu hiện gen vận chuyển và hấp thụ glycerol thô (Chiang *et al.*, 2020). Các thay đổi ở kiểu gen của chủng PHB-08 so với N31 bao gồm:  $\lambda$ <sub>P<sub>R</sub></sub>-*zwf*,  $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*pgl*,  $\Phi$ 80:: $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*phaCAB*,  $\Delta$ *pta*,  $\lambda$ :: $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*phaCAB*, *lacO-gltA*, *P<sub>trc</sub>-pntAB*,  $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*aceEF*,  $\text{HK}::\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*phaCAB* (Ta *et al.*, 2023).

### Môi trường dinh dưỡng

Glycerol thô trong nghiên cứu này được thu thập từ Công ty sản xuất dầu thực vật Yeow Hwa, Đài Loan. Hàm lượng glycerol trong glycerol thô là 60%. Môi trường lên men chủng PHB-08 được thay đổi dựa trên công thức môi trường muối tối giản M9, bao gồm: glycerol (20 g/L), cao nấm men (1 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (3 g/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,04 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g/L), NaCl (0,5 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,24 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,022 g/L), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (8 mg/L), Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.16H<sub>2</sub>O (1,31 mg/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2 mg/L), CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,1 mg/L), NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,2 mg/L), MnCl<sub>2</sub> (0,74 mg/L), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,07 mg/L), và H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (0,05 mg/L) (Yang *et al.*, 2019).

### Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần cao nấm men và ion Mg<sup>2+</sup>

Chủng *E. coli* PHB-08 được tiền nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB (5 mL) trong bình Erlenmeyer 125 mL ở 37°C và lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Dịch tiền nuôi cấy qua đêm sau đó được cấy chuyển vào các bình Erlenmeyer 125 mL chứa 20mL môi trường lên men với mật độ tế bào ban đầu tính theo OD<sub>550</sub> là 0,2. Cao nấm men được thêm vào môi trường dinh dưỡng để đạt các giá trị nồng độ cuối cùng khác nhau, bao gồm (g/L): 0, 0,5, 1, 1,5 và 2. Chủng *E. coli* PHB-08 được giữ trong tủ nuôi cấy ở 37°C và lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Giá trị OD<sub>550</sub> được đo vào các mốc thời gian 2, 4, 6, 8 và 24 h. Sau 24 h, dịch nuôi cấy được thu lại để xác định hàm lượng PHB và CDW. Việc khảo sát ảnh hưởng của ion Mg<sup>2+</sup> được thực hiện theo phương pháp tương tự. Nồng độ của Mg<sup>2+</sup> sẽ được điều chỉnh ở các giá trị khác nhau trong môi trường dinh dưỡng, bao gồm (mM): 1, 2 và 3. Nồng độ cao nấm men và Mg<sup>2+</sup> tối ưu sau khi được xác định sẽ được sử dụng trong công thức môi trường muối tối giản M9 cho phần thí nghiệm lên men fed-batch.

### Lên men fed-batch

Quá trình lên men 1L fed-batch được thực hiện ở trong thiết bị lên men 2L BioFlo®-120 và được điều khiển bởi hệ thống điều khiển BioFlo-120 (Eppendorf, Đức). Đầu dò hàm lượng oxy hòa tan (DO) và pH được mua từ Mettler Toledo, Mỹ. Điều kiện lên men được duy trì ở nhiệt độ 37°C và pH 7 sử dụng chất trung hòa 28% (v/v) NH<sub>4</sub>OH. Hàm lượng DO được duy trì tự động ở 10% và được điều khiển bởi tốc độ xoay của cánh khuấy. Lưu lượng không khí được bơm vào là 1vvm. Mật độ tế bào ban đầu đo ở OD<sub>550</sub> là 0,2. Tế bào sẽ được nuôi ở chế độ batch trong môi trường chứa công thức muối tối giản M9 với nồng độ cao nấm men và Mg<sup>2+</sup> tối ưu trong 10 h trước khi được cấp bổ sung dịch dinh dưỡng chứa 550 g/L glycerol thô. Công thức tính tốc độ cấp chất dinh dưỡng được dựa theo báo cáo trước đó (Yee, Blanch, 1992).

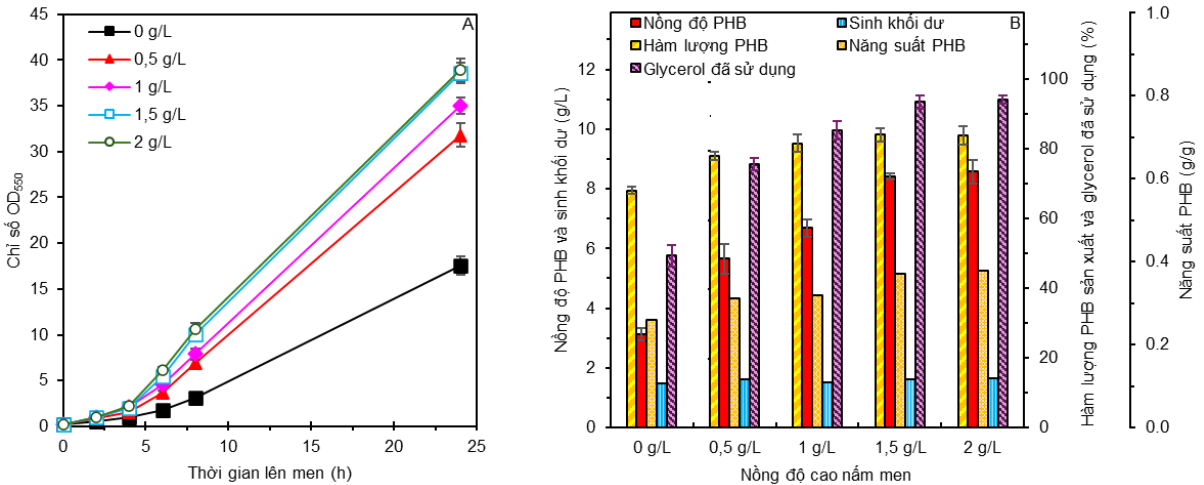
### Phương pháp xác định dư lượng glycerol, CDW, sinh khối dư, nồng độ PHB và năng suất PHB

Phương pháp xác định dư lượng glycerol, CDW và sinh khối dư được thay đổi dựa theo báo cáo trước đó (Cavalheiro *et al.*, 2009). Dư lượng glycerol (g/L) trong dịch lên men được đo bằng thiết bị Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột ICsep ICE-ION-300 (Transgenomic, Mỹ) và đầu đọc chỉ số khúc xạ. Nồng độ glycerol đã tiêu thụ được tính bằng hiệu nồng độ glycerol ban đầu (g/L) và dư lượng glycerol (g/L). Sinh khối sau thí nghiệm được ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi loại bỏ phần chất lỏng, sinh khối tế bào được rửa với nước cất. Quá trình trên được thực hiện ba lần, sau đó sinh khối tế bào được làm khô qua đêm ở nhiệt độ 60°C và được cân để xác định hàm lượng CDW (g/L) tính theo g trong một L dịch lên men. Sinh khối dư (g/L) được định nghĩa là lượng sinh khối tế bào khô không chứa PHB, tính bằng hiệu CDW (g/L) và nồng độ PHB (g/L). Nồng độ PHB (g/L) có trong tế bào được xác định sau khi được chuyển hóa thành axit crotonic, sử dụng thiết bị HPLC, cột loại trừ ion Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Mỹ) và đầu đọc cực tím (210 nm) (Ta *et al.*, 2023). Năng suất PHB (g/g) được tính bằng thương của nồng độ PHB (g/L) và nồng độ glycerol đã tiêu thụ (g/L).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB

Cao nấm men chứa nhiều axit amin, vitamin và khoáng chất quan trọng trong quá trình lên men vi sinh vật. Hình 1 biểu thị ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *E. coli* PHB-08.

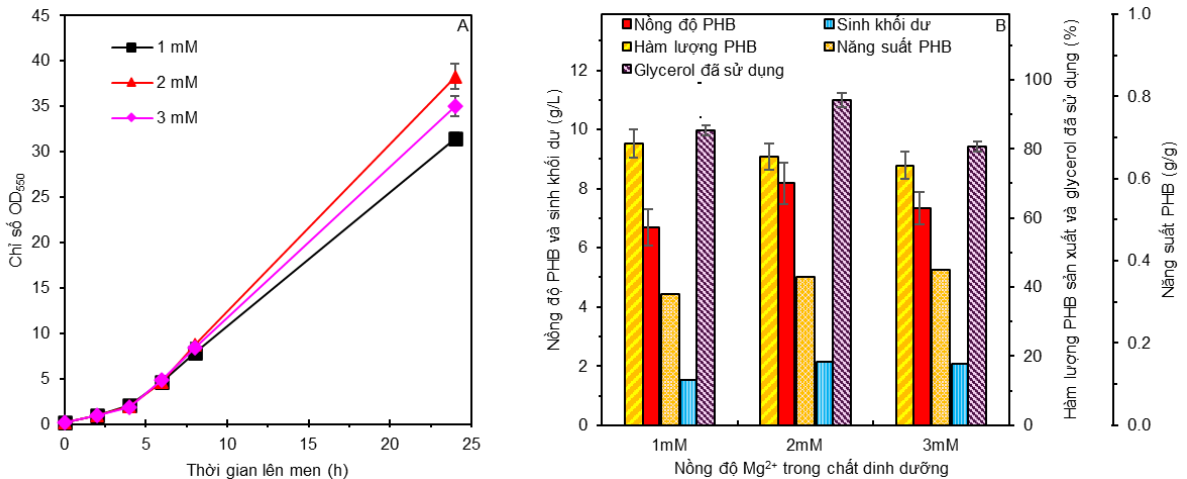


**Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men đến (A) đường cong sinh trưởng và (B) hiệu quả sản xuất PHB của chủng *E. coli* PHB-08 khi nuôi cấy trong bình Erlenmeyer 125mL có chứa 20 g/L glycerol**

Kết quả từ Hình 1 cho thấy cao nấm men giúp tăng cường khả năng hấp thụ glycerol của chủng PHB-08, từ 49,3±3,1% khi không sử dụng cao nấm men lên 94,1±1,2% khi sử dụng 2 g/L cao nấm men. Điều này đã giúp tăng đáng kể tốc độ sinh trưởng (Hình 1A) và khả năng tích lũy PHB trong tế bào (Hình 1B). Kết quả này có thể được giải thích bởi cao nấm men có khả năng tăng cường sức chịu đựng của vi sinh vật trong điều kiện môi trường dinh dưỡng có chứa thành phần gây ức chế sinh trưởng như ở trường hợp sử dụng glycerol thô (Huynh *et al.*, 2020). Bên cạnh đó trong thành phần của cao nấm men còn chứa nhiều axit amin, từ đó giảm đi lượng NADPH cần cho quá trình tổng hợp axit amin (Chen *et al.*, 2018). Lượng NADPH tiết kiệm được trong quá trình tổng hợp axit amin này có thể được sử dụng cho quá trình tổng hợp PHB, vốn là một quá trình phụ thuộc rất lớn vào trữ lượng NADPH nội bào. Kết quả cho thấy nồng độ PHB đã tăng từ 3,1±0,2 g/L khi không sử dụng cao nấm men lên 8,6±0,4 g/L khi sử dụng 2 g/L cao nấm men (Hình 1B). Trong nghiên cứu này, hiệu quả sản xuất PHB đạt mức bão hòa ở nồng độ cao nấm men 1,5 g/L. Kết quả thu được sau 24 h nuôi cấy là nồng độ PHB 8,4±0,6 g/L với hàm lượng PHB 84±1,2% và năng suất 0,44 g/g.

**Ảnh hưởng của nồng độ Mg<sup>2+</sup> đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB**

Việc tối ưu hóa nồng độ Mg<sup>2+</sup> trong môi trường nuôi cấy là cần thiết để đạt hiệu quả sản xuất PHB cao nhất. Hình 2 biểu thị ảnh hưởng của Mg<sup>2+</sup> đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *E. coli* PHB-08.



**Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ Mg<sup>2+</sup> đến (A) đường cong sinh trưởng và (B) hiệu quả sản xuất PHB của chủng *E. coli* PHB-08 khi nuôi cấy trong bình Erlenmeyer 125mL có chứa 20 g/L glycerol**

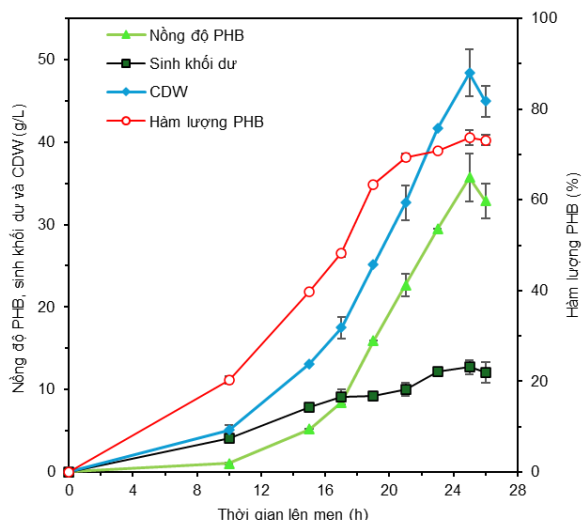
Trong sản xuất PHB, một chiến thuật lên men thường được sử dụng đó là hạn chế nguồn dinh dưỡng Mg<sup>2+</sup> để kích hoạt và tăng cường cho sự tích lũy PHB. Từ kết quả Hình 2 ta có thể thấy hàm lượng PHB đạt giá trị cao nhất (81,5±4,1%) tại nồng độ Mg<sup>2+</sup> thấp nhất (1 mM) trong khảo sát này. Tuy nhiên, Mg cũng là một nguyên tố vi lượng quan trọng trong sinh lý tế bào và chiếm khoảng 0,79% khối lượng tế bào khô của vi khuẩn *E. coli* (Moncany and Kellenberger, 1981). Điều này có nghĩa là nồng độ Mg<sup>2+</sup> trong chất dinh dưỡng sẽ quyết định số



lượng tế bào có thể đạt được trong quá trình lên men, từ đó nâng cao nồng độ PHB. Từ đường cong sinh trưởng (Hình 2A) ta có thể thấy nồng độ  $Mg^{2+}$  không ảnh hưởng đến tốc độ tăng sinh ban đầu nhưng lại ảnh hưởng đến sinh khối dư sau 24 h (Hình 2B). Lượng sinh khối dư đã tăng thêm 41% khi tăng nồng độ  $Mg^{2+}$  từ 1 mM lên 2 mM. Tuy nhiên khi tăng nồng độ  $Mg^{2+}$  từ 2 mM lên 3 mM, lượng sinh khối dư không có sự thay đổi đáng kể. Trong khảo sát này, nồng độ PHB cao nhất đã đạt được là  $8,2 \pm 0,7$  g/L sau khi nuôi cấy 24 h ở nồng độ  $Mg^{2+}$  2 mM với hàm lượng PHB đạt  $77,8 \pm 3,7\%$  và năng suất  $0,43$  g/g.

### Kết quả lên men fed-batch

Trong sản xuất PHB, lên men fed-batch thường được sử dụng để đạt hiệu quả sản xuất cao. Ở giai đoạn đầu (pha batch), chất dinh dưỡng được cung cấp với nồng độ cố định để vi khuẩn thích nghi và phát triển. Việc tối ưu hóa pha batch giúp tạo ra lượng sinh khối ban đầu ổn định về mặt số lượng cũng như về mặt sinh lý tế bào, tạo tiền đề cho giai đoạn tăng trưởng tiếp theo (pha feed). Ở pha feed, chất dinh dưỡng được bổ sung liên tục để duy trì nồng độ dinh dưỡng tối ưu cho vi khuẩn, giúp vi khuẩn tăng sinh khối theo hàm số lũy thừa dựa trên lượng sinh khối đã đạt được từ pha batch.



Hình 3. Kết quả quá trình lên men fed-batch của chủng PHB-08 sử dụng nồng độ cao nấm men và  $Mg^{2+}$  tối ưu

Hình 3 mô tả quá trình sản xuất PHB của chủng PHB-08 theo thời gian khi sử dụng môi trường với nồng độ cao nấm men và ion  $Mg^{2+}$  tối ưu (lần lượt là 1,5 g/L và 2 mM). Việc tối ưu hóa nồng độ cao nấm men và ion  $Mg^{2+}$  trong chất dinh dưỡng đã giúp tăng đáng kể tốc độ sinh trưởng và lượng sinh khối đạt được sau pha batch so với kết quả nghiên cứu trước đó (sử dụng 1 g/L cao nấm men và 1 mM  $Mg^{2+}$ ). CDW sau pha batch đã đạt  $5,07 \pm 0,6$  g/L, cao hơn khoảng 44,8% so với kết quả nghiên cứu trước đó dựa trên chủng PHB-08 (CDW  $3,5 \pm 0,5$  g/L). Ở pha feed, hiệu quả sản xuất PHB cao nhất đã đạt được sau 25 h lên men, với lượng CDW đạt  $48,4 \pm 2,8$  g/L trong đó có chứa  $73,8 \pm 1,7\%$  (w/w) là PHB và năng suất PHB là  $0,33$  g/g. So với kết quả đã công bố dựa trên chủng PHB-08, hàm lượng PHB và năng suất PHB đã tăng thêm khoảng 10%. Đặc biệt, tốc độ sản xuất PHB trung bình trong nghiên cứu này đã đạt  $1,5$  g/L.h, cao hơn 25% so với kết quả đã công bố trước đó ( $1,2$  g/L.h) (Ta *et al.*, 2023). Tất cả những cải thiện này đã giúp nâng cao một cách tổng thể hiệu suất của quy trình sản xuất PHB. Cụ thể, việc tăng hàm lượng PHB giúp nâng cao hiệu quả và giảm lượng chất thải trong quá trình tách chiết PHB. Năng suất PHB tăng sẽ làm giảm chi phí nguyên liệu đầu vào, khi 1 g glycerol thô có thể tạo ra nhiều g PHB hơn. Tốc độ sản xuất trung bình được cải thiện đồng nghĩa với việc thời gian để sản xuất cùng một lượng PHB sẽ được giảm đi, kéo theo đó là lợi ích giảm thời gian vận hành máy móc và thời gian nhân công lao động.

### KẾT LUẬN

Từ việc tối ưu hóa môi trường lên men, chúng tôi đã cải thiện đáng kể quy trình sản xuất PHB sử dụng chủng *E. coli* tái tổ hợp PHB-08. Toàn bộ quá trình lên men được thực hiện trong 25 h với hàm lượng và năng suất PHB tăng 10% cùng với tốc độ sản xuất trung bình tăng 25% so với công bố trước đó. Nền tảng công nghệ từ việc phát triển chủng PHB-08 có thể được ứng dụng để tạo ra các dòng *E. coli* tái tổ hợp dùng trong sản xuất các loại nhựa PHA khác nhau. Bên cạnh đó, việc sử dụng các nguồn cơ chất giá rẻ khác cũng có thể được nghiên cứu và phát triển để đa dạng hóa nguồn nguyên liệu đầu vào nhằm đảm bảo tính bền vững của công nghệ sản xuất nhựa sinh học.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện tại Đại học Phùng Giáp, với sự hỗ trợ kinh phí bởi Hội đồng Khoa học và Công nghệ Quốc gia Đài Loan (Trung Quốc) (NSTC 112-2622-E-035-004), Đại học Y Trung Hoa Đài Loan (Trung Quốc) (CMU111-MF-79) và Tập đoàn Four Pillars Đài Loan (Trung Quốc).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cavalheiro JM, de Almeida MCM, Grandfils C, Da Fonseca M (2009). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process biochemistry*, 44(5), 509-515.
- Chen J, Li W, Zhang ZZ, Tan TW, Li ZJ (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of polyhydroxyalkanoates using acetate as a main carbon source. *Microb Cell Fact*, 17, 1-12.
- Chiang CJ, Ho YJ, Hu MC, Chao YP (2020). Rewiring of glycerol metabolism in *Escherichia coli* for effective production of recombinant proteins. *Biotechnol biofuels*, 13, 1-9.
- Vũ Tuấn Hưng và Nguyễn Danh Nam (2021). Định hướng và giải pháp phát triển bền vững kinh tế biển Việt Nam. *Tạp chí Khoa học xã hội Thành phố Hồ Chí Minh*(9 (277)), 13-29.
- Huynh D, Kaschabek SR, Schlömann M (2020). Effect of inoculum history, growth substrates and yeast extract addition on inhibition of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* by NaCl. *Res Microbiol*, 171(7), 252-259.
- Keskin G, Kızıl G, Bechelany M, Pochat-Bohatier C, Öner, M (2017). Potential of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers family as substitutes of petroleum based polymers for packaging applications and solutions brought by their composites to form barrier materials. *Pure Appl Chem*, 89(12), 1841-1848.
- Kim BS (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol*, 27(10), 774-777.
- Moncany M, Kellenberger E (1981). High magnesium content of *Escherichia coli* B. *Cell Mol Life Sci*, 37(8), 846-847.
- Ta DT, Chiang CJ, Huang ZX, Luu NL, Chao YP (2023). High production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* using crude glycerol. *Bioresour Technol*, 384, 129315.
- Yang H, Huang B, Lai N, Gu Y, Li Z, Ye Q, Wu H (2019). Metabolic engineering of *Escherichia coli* carrying the hybrid acetone-biosynthesis pathway for efficient acetone biosynthesis from acetate. *Microb Cell Fact*, 18, 1-9.
- Yee L, Blanch H (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol*, 10(12), 1550-1556.
- Zhao X, Cornish K, Vodovotz Y (2020). Narrowing the gap for bioplastic use in food packaging: an update. *Environ Sci Tech*, 54(8), 4712-4732.

## IMPROVING THE EFFICIENCY OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION FROM CRUDE GLYCEROL USING THE *ESCHERICHIA COLI* STRAIN PHB-08

Doan Thanh Ta<sup>1,4</sup>, Chung Jen Chiang<sup>2</sup>, Nguyen Luan Luu<sup>1</sup>, Thi Tram Doan<sup>1,4</sup>, Yun Peng Chao<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Feng Chia University, Taichung, Chinese Taipei

<sup>2</sup>Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, China Medical University, Taichung, Chinese Taipei

<sup>3</sup>Department of Medical Research, China Medical University Hospital, Taichung, Chinese Taipei

<sup>4</sup>Department of Biotechnology, AVATAACK Co., Ltd, Four Pillars Group, Chinese Taipei

### SUMMARY

Fossil-based plastics are non-biodegradable and could negatively affect the marine economy of Vietnam if not regulated properly. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable bioplastic and has similar characteristics to traditional fossil-based plastics. The production cost of PHB mainly comes from the carbon source. To increase the competitiveness of PHB in the plastic market, the *Escherichia coli* PHB-08 having the capability to convert crude glycerol – a main byproduct of biodiesel production – into PHB was developed. In this study, the effects of yeast extract and magnesium ( $Mg^{2+}$ ) on the fermentation of PHB-08 were investigated. The optimal concentration of yeast extract and  $Mg^{2+}$  was used to improve fed-batch fermentation, increasing PHB production rate by 25 % (1.5 g/L.h). In a 25 h fermentation, the obtained cell dried weight was 48.4 g/L, which contains 73.8 % (w/w) PHB with the yield of 0.33g PHB/g consumed glycerol. The outcomes of this study show a promising potential of the strain PHB-08 in the bioplastic industry.

**Keywords:** *Escherichia coli*, fed-batch, crude glycerol, bioplastic, polyhydroxybutyrate.

\* Author for correspondence: TEL: 886-4-24517250 ext. 3677; Fax: 886-4-24510890; E-mail: ypchao@fcu.edu.tw

## PHÂN LẬP VI KHUẨN *Lactobacillus* CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC TỪ ĐƯỜNG TIÊU HÓA GÀ

Nguyễn Phương Thúy<sup>1\*</sup>, Nguyễn Việt Khánh Hưng<sup>1</sup>, Huỳnh Hải Long<sup>1</sup>, Trần Hữu Hậu<sup>1</sup>, Lê Thị Phương Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Tiên<sup>2</sup>, Nguyễn Ngọc Trai<sup>1</sup>, Nguyễn Nhật Nam, Lê Quốc Duy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

<sup>2</sup>Phòng Quản trị - Thiết bị, Trường Đại học Trà Vinh

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm phân lập và đánh giá các chủng *Lactobacillus* probiotic tiềm năng từ đường ruột gà khỏe mạnh để ứng dụng trong chăn nuôi gia cầm bền vững tại Việt Nam. Ba mươi chủng phân lập đã được sàng lọc khả năng chịu acid và muối mật, hai yếu tố quan trọng của vi khuẩn probiotic. Chủng LC20 và LC16 thể hiện khả năng sống sót tốt nhất trong điều kiện khắc nghiệt. Trong số các chủng này, LC6 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ chống lại các mầm bệnh gia cầm phổ biến (*E. coli*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella* sp.) đồng thời nhạy cảm với tất cả các loại kháng sinh được thử nghiệm. Phân tích phân tử xác định LC6 là *Lactobacillus farciminis*. *L. farciminis* LC6, với các đặc tính probiotic mong muốn và không có khả năng kháng kháng sinh, là ứng viên tiềm năng cho việc phát triển các giải pháp probiotic thay thế kháng sinh trong chăn nuôi gia cầm, góp phần cải thiện sức khỏe vật nuôi và nâng cao năng suất.

**Từ khóa:** Chịu đựng stress, chăn nuôi gà, *Lactobacillus*, probiotic.

### MỞ ĐẦU

Ngành chăn nuôi gà Việt Nam đóng góp đáng kể vào nền kinh tế, nhưng cũng đối mặt với thách thức về an toàn thực phẩm và sức khỏe cộng đồng do lạm dụng kháng sinh. Xu hướng loại bỏ kháng sinh trong chăn nuôi đòi hỏi các giải pháp thay thế bền vững, trong đó probiotic là một hướng đi đầy hứa hẹn (Reuben *et al.*, 2021). Probiotic, đặc biệt là vi khuẩn acid lactic (LAB) như *Lactobacillus*, nổi bật với khả năng kháng khuẩn và an toàn, đã được chứng minh có lợi cho sức khỏe vật nuôi (Sood *et al.*, 2020). Nghiên cứu đã chỉ ra LAB phân lập từ gà có thể giảm tỷ lệ chết, ức chế vi khuẩn có hại, cải thiện tăng trưởng và sức khỏe đường ruột (Wang *et al.*, 2023). *Lactobacillus* đặc biệt thu hút sự chú ý nhờ đặc tính kháng khuẩn ở gà, trở thành ứng cử viên tiềm năng thay thế kháng sinh trong chăn nuôi gia cầm. Các nghiên cứu đã chứng minh *Lactobacillus* có thể tác động tích cực đến sự tăng trưởng của gà, đồng thời ức chế các mầm bệnh gia cầm phổ biến (Ndaywel *et al.*, 2023). Nhiều nghiên cứu trước đây đã khám phá tiềm năng probiotic của các chủng *Lactobacillus* phân lập từ ruột gà, cho thấy chúng có hoạt tính kháng khuẩn, khả năng chịu đựng môi trường khắc nghiệt và ổn định trong điều kiện khác nhau (Sirisopapong *et al.*, 2023). Dựa trên những kết quả này, nghiên cứu của chúng tôi tập trung phân lập và lựa chọn các chủng *Lactobacillus* probiotic từ đường ruột gà khỏe mạnh, nhằm tìm kiếm giải pháp thay thế kháng sinh hiệu quả, góp phần thúc đẩy chăn nuôi gia cầm bền vững tại Việt Nam.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Thu thập mẫu và phân lập vi khuẩn

Mẫu ruột non được lấy từ 50 gà khỏe mạnh, 4 tháng tuổi, tại thành phố Trà Vinh. 1 gram ruột non được đồng nhất trong 9 mL nước cất vô trùng bằng phương pháp vortex trong 5 phút. Dịch đồng nhất được pha loãng liên tục 10 lần, và 100  $\mu$ L dịch pha loãng được cấy trên đĩa thạch de Man, Rogosa, và Sharpe (MRS) (Himedia, Ấn Độ) bổ sung 0,05% xanh bromocresol (Sigma-Aldrich) và 0,05% muối mật (Sigma-Aldrich). Sau 48 giờ ủ kỵ khí ở 37°C, các khuẩn lạc có hình thái khác biệt được phân lập và nhuộm Gram và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi. Các chủng thuần được bảo quản trong 30% glycerol ở -80°C để phân tích tiếp (Risa *et al.*, 2020).

#### Thử nghiệm khả năng chịu acid và muối mật

Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy qua đêm trong môi trường MRS ở 37°C. Sau đó, mỗi chủng được chuyển sang môi trường MRS mới và ủ thêm 24 giờ ở 37°C. Sinh khối vi khuẩn được thu bằng ly tâm (7.500 x g, 5 phút, 4°C), rửa hai lần bằng dung dịch PBS (pH 7.2) và tái huyền phù trong môi trường MRS mới. Nồng độ tế bào được điều chỉnh bằng máy đo quang phổ để đạt mật độ quang (OD) từ 0,5 đến 0,7 ở bước sóng 600 nm.

**Khả năng chịu acid:** 1 mL dịch huyền phù tế bào được thêm vào 9 mL môi trường MRS đã điều chỉnh pH đến 2,0, 4,0 và 6,5. Các ống nghiệm được ủ ở 37°C trong 4 giờ.

**Khả năng chịu muối mật:** 1 mL dịch huyền phù tế bào được thêm vào 9 mL môi trường MRS bổ sung các nồng độ muối mật khác nhau (0%, 0.15%, 0.3%). Các ống nghiệm được ủ ở 37°C trong 4 giờ.

Sau khi ủ, các mẫu được pha loãng liên tục ( $10^{-4}$  đến  $10^{-7}$ ) và cấy trên đĩa thạch MRS. Số lượng tế bào sống được xác định bằng cách đếm đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) (Ramlucken *et al.*, 2020).

**Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn**

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong 3 ống nghiệm 10 ml (9 ml MRS/ ống) điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 giờ. Dịch nổi được tách bằng ly tâm (ở 10,000 vòng/phút, 5 phút, ở 4°C) và sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế đối với *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, và *Salmonella* sp. bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Vùng ức chế rõ xung quanh giếng cấy cho thấy hoạt tính kháng khuẩn (Rossi *et al.*, 2021).

**Nhận dạng phân tử các chủng *Lactobacillus***

DNA của các chủng vi khuẩn được ly trích bằng bộ kit DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được kiểm tra bằng đo quang phổ NanoDrop. Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và U1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'). Chu kỳ nhiệt bao gồm biến tính ban đầu ở 94°C trong 3 phút, tiếp theo là 29 chu kỳ 94°C trong 45 giây, 53°C trong 60 giây và 72°C trong 90 giây, với bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra trên gel agarose 2%. Sản phẩm PCR tinh sạch (Bioline, UK) được giải trình tự (Next Gen Scientific Co., Ltd, TP.HCM) và các trình tự thu được được phân tích bằng phần mềm BioEdit (phiên bản 7.0). Các trình tự đồng thuận được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank sử dụng NCBI BLAST để xác nhận định danh ở mức loài của các chủng phân lập (Mudawaroch và cs., 2023) (Mudawaroch *et al.*, 2023).

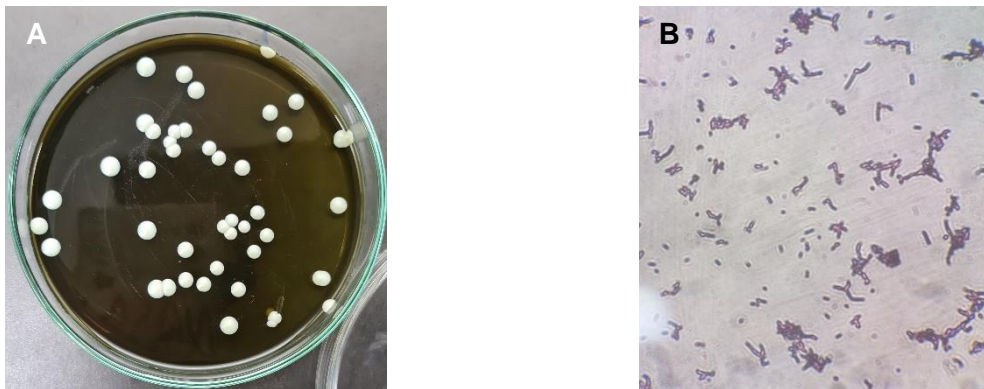
**Phân tích thống kê**

Kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình và độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại độc lập. Phân tích phương sai một chiều (ANOVA) được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm với mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phân lập và định danh hình thái các chủng *Lactobacillus***

Từ 50 mẫu ruột gà, chúng tôi đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn acid lactic (LAB) trên môi trường thạch MRS bổ sung xanh bromocresol và muối mật. Các chủng này đều có hình thái trực khuẩn hoặc cầu trực khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, phù hợp với đặc điểm của chi *Lactobacillus* (Hình 1, Bảng 1).



**Hình 1. Hình thái và nhuộm Gram của các chủng vi khuẩn phân lập**

(A): Hình thái khuẩn lạc của chủng LC6 trên môi trường MRS agar (với 0.15% muối mật). (B): Nhuộm Gram của chủng LC6. Các tế bào có màu tím, hình que và không có bào tử.

**Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của 30 chủng vi khuẩn phân lập**

Mã chủng vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc					Hình thái tế bào
	Hình dạng	Màu sắc	Kích thước	Độ nổi	Rìa	
LC1	Tròn	Trắng sữa	Lớn	Nhô	Lượn sóng	Gram dương - que dài
LC2	Tròn	Trắng trong	Nhỏ	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC3	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC4	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC5	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

LC6	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC7	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC8	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC9	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC10	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC11	Tròn	Trắng sữa	Lớn	Lồi	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC12	Tròn	Trắng đục	Nhỏ	Phẳng	Lượn sóng	Gram dương - que dài
LC13	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC14	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC15	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC16	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC17	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC18	Tròn	Trắng sữa	Vừa	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC19	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC20	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC21	Tròn	Trắng trong	Vừa	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC22	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC23	Tròn	Trắng trong	Nhỏ	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC24	Tròn	Trắng sữa	Vừa	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC25	Không đều	Trắng đục	Small	Phẳng	Lượn sóng	Gram dương - que dài
LC26	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC27	Tròn	Trắng sữa	Nhỏ	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC28	Không đều	Trắng sữa	Vừa	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn
LC29	Tròn	Trắng	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que dài
LC30	Tròn	Trắng sữa	Lớn	Nhô	Trơn	Gram dương - que ngắn

**Khả năng chịu acid và muối mật**

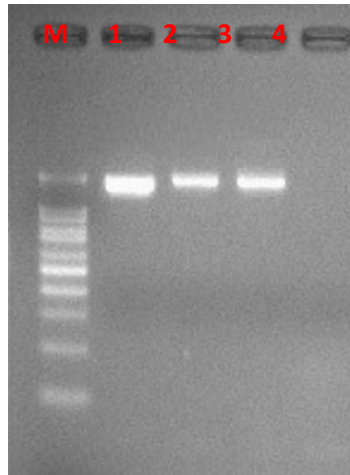
Kết quả đánh giá khả năng chịu acid (pH 2.0, 4.0 và 6.5) và muối mật (0%, 0.15% và 0.3%) cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các chủng *Lactobacillus*. Trong đó, LC20 và LC16 nổi bật với khả năng sống sót tốt nhất ở cả điều kiện pH thấp (pH 2.0) và nồng độ muối mật cao (0.3%). Khả năng này là yếu tố quan trọng để vi khuẩn probiotic có thể tồn tại và phát huy tác dụng trong môi trường khắc nghiệt của đường tiêu hóa (Bảng 2).

**Hoạt tính kháng khuẩn**

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus* được đánh giá trên ba mầm bệnh gây bệnh phổ biến cho gia cầm: *E. coli*, *S. aureus* và *Salmonella* sp. (Bảng 3). Tất cả các chủng đều ức chế sự phát triển của *E. coli*, với đường kính vòng vô khuẩn từ  $0,60 \pm 0,17$  cm (LC23) đến  $4,63 \pm 3,51$  cm (LC11). Đối với *S. aureus*, LC28 cho thấy vòng vô khuẩn lớn nhất ( $3,63 \pm 3,51$  cm), trong khi LC20 và LC22 không có hoạt tính ức chế. Đối với *Salmonella* sp., LC6 thể hiện khả năng ức chế mạnh nhất ( $3,30 \pm 2,65$  cm), và LC26 không có khả năng ức chế. Hai chủng LC12 và LC6 cho thấy hoạt tính kháng khuẩn phổ rộng trên cả ba mầm bệnh.

**Nhận dạng phân tử chủng *Lactobacillus***

Chủng LC6 được chọn để xác định loài bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Sau khi chạy PCR với các cặp mồi 27F và U1492R sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 2,0% và thu một băng khoảng gần 1500 bp (Hình 4). Kết quả giải trình tự cho thấy chủng LC6 có độ tương đồng 99,64% với *Lactobacillus farciminis* trong cơ sở dữ liệu GenBank (Mã số PP946874). Dựa trên kết quả này, chủng LC6 được xác định là *Lactobacillus farciminis* và được đặt tên là *L. farciminis* LC6.



**Hình 2. Khuếch đại DNA từ chủng LC6. (A): Sản phẩm vùng gen 16S rRNA khoảng 1500 bp trên gel agarose 2% với thang DNA 100 bp; M: Thang DNA chuẩn; Lane 1: Đối chứng dương; Lane 2-3: Mẫu; Lane 4: Đối chứng âm không DNA**

Probiotic, đặc biệt là các chủng có nguồn gốc từ vật chủ, được coi là giải pháp thay thế kháng sinh tiềm năng trong chăn nuôi gia cầm (Ahmad *et al.*, 2022). Nghiên cứu này tập trung vào việc phân lập và đánh giá các chủng *Lactobacillus* từ đường ruột gà khỏe mạnh để tìm kiếm probiotic mới.

Ba mươi chủng vi khuẩn acid lactic (LAB) đã được phân lập thành công và xác định là *Lactobacillus* dựa trên các đặc điểm hình thái và nhuộm Gram. Hai chủng tiềm năng, LC20 và LC16, cho thấy khả năng sống sót tốt ở pH 2.0 và 0.3% muối mật, đáp ứng các tiêu chuẩn về khả năng chịu acid và muối mật của probiotic. Khả năng này rất quan trọng để probiotic tồn tại trong môi trường khắc nghiệt của đường tiêu hóa (Schmid *et al.*, 2016).

Các chủng phân lập cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn khác nhau chống lại *E. coli*, *Salmonella* sp. và *S. aureus*. LC12 và LC6 cho thấy hiệu quả ức chế mạnh nhất đối với cả ba mầm bệnh. Hoạt tính đối kháng này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về các chủng *Lactobacillus* từ gà và các nguồn khác (Cisek *et al.*, 2022).

**KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đã phân lập được ba mươi chủng vi khuẩn. Trong đó, LC20 và LC16 nổi bật với khả năng sống sót tốt nhất ở cả điều kiện pH thấp (pH 2.0) và nồng độ muối mật cao (0.3%). Chủng LC6 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ chống lại *E. coli*, *Salmonella* sp. và *S. aureus*. Kết quả định danh phân tử chủng LC6 là *Lactobacillus farciminis*. *L. farciminis* LC6, là một bước tiến đáng kể trong việc phát triển các giải pháp probiotic an toàn và hiệu quả cho ngành chăn nuôi gia cầm tại Việt Nam.

**Bảng 2. Khả năng chịu pH thấp của dòng vi khuẩn Lactobacillus**

Mã chủng vi khuẩn	Mật số <i>Lactobacillus</i> (Log CFU/mL)											
	Độ pH						Nồng độ muối mật					
	pH 6.5 (Đối chứng)		pH 4		pH 2		0% (Đối chứng)		0.15%		0.30%	
LC1	7,59	± 0,11	7,20	± 0,17	5,10	± 0,17	7,59	± 0,11	5,40	± 0,17	4,43	± 0,51
LC2	7,66	± 0,10	7,26	± 0,24	5,20	± 0,17	7,66	± 0,10	5,79	± 0,10	0,00	± 0,00
LC3	8,97	± 0,01	6,49	± 0,20	0,00	± 0,00	8,97	± 0,01	5,63	± 0,06	0,00	± 0,00
LC4	7,83	± 0,13	6,82	± 0,04	4,73	± 0,05	7,83	± 0,13	5,10	± 0,17	0,00	± 0,00
LC5	7,76	± 0,15	6,33	± 0,35	5,10	± 0,17	7,76	± 0,15	5,59	± 0,11	0,00	± 0,00
LC6	8,34	± 0,05	7,95	± 0,16	5,86	± 0,03	8,34	± 0,05	5,20	± 0,35	0,00	± 0,00
LC7	7,53	± 0,21	7,06	± 0,06	5,26	± 0,24	7,53	± 0,21	4,23	± 0,40	0,00	± 0,00
LC8	7,79	± 0,10	7,10	± 0,17	5,26	± 0,01	7,79	± 0,10	5,36	± 0,10	4,43	± 0,51
LC9	7,65	± 0,16	7,33	± 0,35	4,73	± 0,05	7,65	± 0,16	5,62	± 0,15	4,16	± 0,28
LC10	7,30	± 0,30	7,26	± 0,24	5,80	± 0,02	7,30	± 0,30	5,77	± 0,07	5,09	± 0,05
LC11	7,69	± 0,09	7,52	± 0,07	6,28	± 0,02	7,69	± 0,09	5,72	± 0,12	4,84	± 0,10
LC12	9,07	± 0,01	8,98	± 0,03	6,18	± 0,03	9,07	± 0,01	5,40	± 0,02	0,00	± 0,00

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

LC13	8,99	±	0,01	8,09	±	0,10	5,82	±	0,07	8,99	±	0,01	5,95	±	0,05	5,19	±	0,66
LC14	7,54	±	0,28	6,55	±	0,13	0,00	±	0,00	7,54	±	0,28	5,58	±	0,17	4,57	±	0,51
LC15	7,40	±	0,35	6,53	±	0,21	4,77	±	0,07	7,40	±	0,35	5,69	±	0,09	4,63	±	0,85
LC16	8,10	±	0,07	6,82	±	0,07	6,54	±	0,02	8,10	±	0,07	5,98	±	0,09	5,21	±	0,55
LC17	8,69	±	0,01	8,09	±	0,08	0,00	±	0,00	8,69	±	0,01	5,63	±	0,13	4,79	±	0,71
LC18	8,69	±	0,02	8,49	±	0,02	5,40	±	0,17	8,69	±	0,02	4,84	±	0,06	4,73	±	0,51
LC19	8,63	±	0,08	7,20	±	0,35	5,55	±	0,13	8,63	±	0,08	5,88	±	0,35	5,09	±	0,60
LC20	8,31	±	0,01	8,11	±	0,06	6,54	±	0,01	8,31	±	0,01	5,86	±	0,07	5,26	±	0,67
LC21	8,86	±	0,03	7,23	±	0,40	0,00	±	0,00	8,86	±	0,03	5,84	±	0,12	0,00	±	0,00
LC22	7,40	±	0,17	6,20	±	0,35	6,65	±	0,04	7,40	±	0,17	5,72	±	0,12	4,59	±	0,53
LC23	8,19	±	0,02	7,16	±	0,28	6,18	±	0,04	8,19	±	0,02	5,70	±	0,17	4,43	±	0,51
LC24	8,95	±	0,01	7,84	±	0,10	6,19	±	0,04	8,95	±	0,01	5,87	±	0,11	5,08	±	0,54
LC25	7,77	±	0,12	7,10	±	0,17	6,54	±	0,01	7,77	±	0,12	5,32	±	0,28	0,00	±	0,00
LC26	8,71	±	0,05	7,90	±	0,05	5,10	±	0,17	8,71	±	0,05	5,58	±	0,17	4,43	±	0,51
LC27	8,32	±	0,06	6,20	±	0,17	6,77	±	0,00	8,32	±	0,06	5,23	±	0,40	0,00	±	0,00
LC28	8,42	±	0,05	6,16	±	0,28	6,63	±	0,00	8,42	±	0,05	5,82	±	0,19	4,79	±	0,10
LC29	8,96	±	0,01	7,82	±	0,07	5,56	±	0,07	8,96	±	0,01	3,93	±	3,41	4,73	±	0,51
LC30	9,02	±	0,01	7,30	±	0,30	5,77	±	0,07	9,02	±	0,01	6,22	±	0,03	4,69	±	0,65

**Bảng 3. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của các dòng *Lactobacillus* phân lập**

Mã chủng vi khuẩn	<i>Escherichia coli</i> (cm)			<i>Staphylococcus aureus</i> (cm)			<i>Salmonella</i> sp. (cm)		
LC1	2,00	±	0,40	1,53	±	0,21	1,77	±	0,21
LC2	1,57	±	0,21	1,50	±	0,17	1,63	±	0,45
LC3	1,90	±	0,66	2,60	±	0,61	1,63	±	0,06
LC4	1,80	±	0,20	1,53	±	0,21	1,63	±	0,32
LC5	1,57	±	0,67	0,73	±	0,06	1,27	±	0,42
LC6	3,00	±	1,73	2,67	±	1,15	4,00	±	2,65
LC7	2,00	±	0,30	1,90	±	0,17	1,53	±	0,31
LC8	3,10	±	2,52	3,10	±	1,65	1,90	±	0,46
LC9	1,60	±	0,20	1,57	±	0,25	1,40	±	0,50
LC10	1,93	±	0,12	1,30	±	0,10	1,67	±	0,31
LC11	5,33	±	3,51	1,67	±	0,58	3,67	±	3,79
LC12	3,67	±	3,79	4,00	±	4,36	3,00	±	2,65
LC13	1,97	±	0,31	1,50	±	0,36	1,90	±	0,36
LC14	1,60	±	0,20	1,87	±	0,23	1,50	±	0,10
LC15	1,57	±	0,06	2,33	±	0,21	2,33	±	0,38
LC16	1,47	±	0,31	2,80	±	1,06	1,23	±	0,06
LC17	1,90	±	0,46	1,60	±	0,17	1,60	±	0,44
LC18	1,70	±	0,46	2,43	±	0,72	1,70	±	0,36
LC19	1,73	±	0,21	2,03	±	0,21	1,37	±	0,15
LC20	4,00	±	2,65	0,00	±	0,00	3,33	±	2,08
LC21	1,83	±	0,21	1,77	±	0,21	1,90	±	0,53
LC22	3,67	±	2,52	0,00	±	0,00	3,33	±	2,08
LC23	1,30	±	0,17	1,47	±	0,12	1,83	±	0,45
LC24	1,60	±	0,17	1,73	±	0,12	1,97	±	0,40

LC25	2,67	±	2,08	1,00	±	0,00	3,67	±	2,52
LC26	1,67	±	0,58	2,00	±	2,65	0,00	±	0,00
LC27	1,50	±	0,17	2,00	±	0,10	1,37	±	0,35
LC28	1,33	±	0,31	4,33	±	3,51	3,33	±	2,08
LC29	1,43	±	0,50	1,63	±	0,32	2,13	±	0,31
LC30	1,43	±	0,51	1,53	±	0,12	1,93	±	0,47

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad R, Yu YH, Hsiao FSH, Dybus A, Ali I, Hsu HC, Cheng YH (2022). Probiotics as a Friendly Antibiotic Alternative: Assessment of Their Effects on the Health and Productive Performance of Poultry. *Ferment*, 8(12): 672.
- Cisek AA, Bąk I, Stefańska I, Binek M (2022). Selection and optimization of high-yielding DNA isolation protocol for quantitative analyses of methanogenic archaea. *Microorganisms*, 10(3): 523.
- Mudawaroch RE, Setiyono S, Yusiati L M, Suryanto E (2023). Molecular identification of lactic acid bacteria from broiler chicken meat. *Agroindustrial J*. 10(2): 101-107.
- Ndaywel ON, Nsiala GO, Ntumba LT, Banze T, Musibono DE, Biey EM (2023). Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from dairy products. *Asian J Environ Ecol*, 22(2): 70-78.
- Ramlucken U, Roets Y, Ramchuran SO, Moonsamy G, van Rensburg CJ, Thantsha MS, Lalloo R (2020). Isolation, selection and evaluation of *Bacillus* spp. as potential multi-mode probiotics for poultry. *J Gen Appl Microbiol*, 66(4): 228-238.
- Risa YK, Harimurti S, Widodo W (2020). Screening for probiotic of lactic acid bacteria isolated from the digestive tract of a native Aceh duck (*Anas platyrhynchos*). *Biodiversitas*, 21(7).
- Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagensen JAJ, Sommer LM, Molin S, Johansen HK (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol*, 19(5): 331-342.
- Schmid A, Neumann H, Karrasch T, Liebisch G, Schäffler A (2016). Bile acid metabolome after an oral lipid tolerance test by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *PLoS ONE*, 11(2): e0148869.
- Sirisopapong M, Shimosato T, Okrathok S, Khempaka S (2023). Assessment of lactic acid bacteria isolated from the chicken digestive tract for potential use as poultry probiotics. *Anim Biosci*, 36(8): 1209.
- Sood U, Gupta V, Kumar R, Lal S, Fawcett D, Rattan S, Poinern GEJ, Lal R (2020). Chicken gut microbiome and human health: Past scenarios, current perspectives, and futuristic applications. *Indian J Microbiol*, 60: 2-11.
- Wang L, Lin Z, Ali M, Zhu X, Zhang Y, Li S, Li K, Kebzhai F, Li J (2023). Effects of lactic acid bacteria isolated from Tibetan chickens on the growth performance and gut microbiota of broiler. *Front Microbiol*, 14: 1171074.

## ISOLATION AND SELECTION OF PROBIOTIC *Lactobacillus* STRAINS FROM CHICKEN INTESTINAL TRACT

Nguyen Phuong Thuy<sup>1\*</sup>, Nguyen Viet Khanh Hung<sup>1</sup>, Huynh Hai Long<sup>1</sup>, Tran Huu Hau<sup>1</sup>,  
Le Thi Phuong Thao<sup>1</sup>, Nguyen Thi Bich Tien<sup>2</sup>, Nguyen Ngoc Trai<sup>1</sup>, Nguyen Nhat Nam<sup>1</sup>, Le Quoc Duy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Agriculture and Aquaculture, Tra Vinh University.

<sup>2</sup>Equipment Administration Department, Tra Vinh University.

## SUMMARY

The escalating demand for sustainable poultry production in Vietnam necessitates the exploration of alternatives to antibiotic growth promoters. This study investigated the probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from the intestinal tract of healthy chickens. Thirty isolates were screened for their resilience to acidic and bile salt conditions, key characteristics of probiotic bacteria. LC20 and LC16 strains demonstrated exceptional tolerance to these harsh environments. Subsequently, the selected strains were evaluated for their antimicrobial activity against common poultry pathogens (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* sp.). Strain LC6 exhibited both potent antimicrobial activity and sensitivity to all tested antibiotics. Molecular identification through PCR and 16S rRNA gene sequencing confirmed LC6 as *Lactobacillus farciminis* and was named *Lactobacillus farciminis* LC6. Identifying *L. farciminis* LC6, a strain possessing desirable probiotic traits and lacking antibiotic resistance, signifies a promising step towards developing effective and sustainable probiotic interventions in Vietnamese poultry farming. This could contribute to improved animal health, reduced reliance on antibiotics, and enhanced productivity in the poultry industry.

**Keywords:** *Lactobacillus*, Probiotic, stress tolerance, chicken.

\* Author for correspondence: Tel: 02943855246; Email: npthuy@tvu.edu.vn



# PLASMID KHÔNG TƯƠNG HỢP VÀ VÙNG GEN CASSETTE LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH ĐA KHÁNG KHÁNG SINH CỦA CÁC SEROVAR *SALMONELLA* PHÂN LẬP TỪ THỰC PHẨM TẠI CÁC CHỢ TRUYỀN THỐNG TRÊN ĐỊA BÀN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Trương Huỳnh Anh Vũ<sup>1\*</sup>, Nguyễn Hoàng Khuê Tú<sup>2</sup>, Trần Quang Vinh<sup>3</sup>, Nguyễn Minh Hiền<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Phòng Vi sinh, Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Phòng Quản lý Khoa học, Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>4</sup>Khoa y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát sự hiện diện 18 loại plasmid không tương hợp và các vùng gen cassette thuộc integron nhóm I, II của 21 serovar *Salmonella* đa kháng (kháng từ 07 loại kháng sinh trở lên) được phân lập từ các mẫu thực phẩm thu thập tại các chợ truyền thống trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả đã phát hiện 100% serovar đều mang plasmid. Trong số đó, *W* và *Y* là plasmid phổ biến nhất với tỷ lệ hiện diện ở các serovar phân lập (100%), tiếp đến là các plasmid *N*, *T*, *P*, *A/C*, *FIB* với tỷ lệ lần lượt là 85,71%, 66,67%, 38,10%, 28,57%, 9,52%; các plasmid *Frepb*, *K/B*, *B/O* được phát hiện với tỷ lệ thấp 4,76%. Không phát hiện serovar nào mang *HII*, *HI2*, *II*, *X*, *L/M*, *FIIA*, *FIC*, *FIA*. Tỷ lệ serovar mang vùng gen cassette thuộc integron nhóm I là 85,71% với 08 kích thước khác nhau (> 1,0 kbp; 1,0 kbp; 0,9 kbp; 0,6 kbp; 0,5 kbp; 0,4 kbp; 0,25 kbp; 0,2 kbp), integron nhóm II là 72,73% với 05 kích thước khác nhau (2,0 kbp; 1,6 kbp; 1,0 kbp; 0,7 kbp; 0,5 kbp). Sự hiện diện các yếu tố di truyền di động ở *Salmonella* cho thấy khả năng vi khuẩn này có thể truyền hoặc nhận gen kháng kháng sinh từ các loài khác trong môi trường tự nhiên là rất cao. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu góp phần cung cấp bằng chứng khoa học cho các nghiên cứu chuyên sâu về cơ kháng kháng sinh và nâng cao ý thức sử dụng kháng sinh có hiệu quả tại Việt Nam nói chung và Thành phố Hồ Chí Minh nói riêng.

**Từ khóa:** Đa kháng kháng sinh, *Salmonella*, plasmid không tương hợp, vùng gen cassette.

## MỞ ĐẦU

Plasmid là các phân tử DNA mạch đôi, dạng vòng, nằm ngoài DNA nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Chúng có thể tự nhân lên độc lập với tế bào chủ do có vị trí khởi đầu sao chép ori. Các plasmid thường có kích thước từ vài đến vài trăm kbp. Các plasmid được xem là nhân tố quan trọng gây nên hiện tượng đa kháng ở vi khuẩn do chúng mang các gen mã hóa cho việc kháng lại nhiều loại kháng sinh như  $\beta$ -lactam, macrolide, aminoglycoside, tetracycline, phenicol và SXT (Nikaido, 2009). Các plasmid mạch vòng thường được tìm hiểu nhiều hơn các plasmid mạch hở. Tuy nhiên, ngày nay, các plasmid mạch hở bắt đầu được nghiên cứu đặc tính chuyên sâu do chúng cho có khả năng chuyên chở các kiểu hình tích cực cho vật chủ. Cũng giống như plasmid mạch vòng, plasmid mạch hở cũng có khả năng tiếp hợp. Một số plasmid kháng kháng sinh không thể cùng tồn tại trong tế bào vật chủ. Thực tế này cho thấy chúng cũng được chia thành các nhóm không tương hợp. Các nhà khoa học đã chia chúng thành bốn nhóm chính dựa trên cấu trúc DNA: nhóm *IncF* (bao gồm *IncC*, *IncD*, *IncF*, *IncJ*, DNA *IncS*), nhóm *Incl* (bao gồm *IncB*, *Incl*, DNA *IncK*), nhóm *IncP* (bao gồm *IncM*, *IncP*, *IncU*, DNA *IncW*) và DNA *Ti*. Thêm vào đó, các plasmid ngoài việc chứa các gen kháng kháng sinh mục tiêu còn chứa các yếu tố kháng kháng sinh qua trung gian plasmid khác như kháng quinolone (*QnrA* và *QnrB*) và aminoglycoside (*rmfB*) (Endimiani và Hujer, 2008).

Vùng gen cassette là những yếu tố di truyền di động nhỏ nhất và không có khả năng sao chép, thường chỉ chứa 1 gen đơn và 1 điểm tái tổ hợp (*attC*) hay còn gọi là 59-be. Hầu hết các gen cassette không có promoter nên hoạt động của chúng phụ thuộc vào promoter của integron mà chúng chèn vào (Cambray *et al.*, 2010). Do đó, nó không thể tự nhân đôi ở trạng thái tự do. Nhiều gen cassette có thể chèn vào cùng 1 integron nên gây ra hiện tượng đa kháng (Partridge *et al.*, 2009). Theo số liệu tổng hợp, có hơn 130 gen cassette khác nhau đã được xác định (Partridge *et al.*, 2009). Trong đó, có hơn 80 gen cassette khác nhau từ integron nhóm I và chúng thường mã hóa cho sự kháng với các kháng sinh như aminoglycoside, chloramphenicol, trimethoprim, streptothricin, rifampin, erythromycin, fosfomycin, lincomycin, các hợp chất amino bậc 4 và các kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$ -lactam. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát sự hiện diện các loại plasmid không tương hợp và vùng gen cassette thuộc integron nhóm I, II của các serovar đa kháng phân lập từ thực phẩm tại các chợ truyền thống trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh.

Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần cung cấp tư liệu làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu sau này ở quy mô lớn hơn nhằm tìm hiểu cơ chế kháng đa kháng sinh của *Salmonella* spp. ở mức độ phân tử có nguồn gốc từ thực phẩm, bổ sung bằng chứng khoa học cho các nghiên cứu chuyên sâu về cơ chế kháng kháng sinh và nâng cao ý thức sử dụng kháng sinh có hiệu quả tại Việt Nam nói chung và Thành phố Hồ Chí Minh nói riêng.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng nghiên cứu

21 serovar *Salmonella* đa kháng (kháng từ 07 loại kháng sinh trở lên) được phân lập từ các mẫu thịt heo, thịt bò, thịt gà và cá thu thập tại các chợ truyền thống trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh đang được lưu giữ trong các ống Cryobank ở nhiệt độ -70°C tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP. HCM.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp ly trích ADN tổng số

Dùng que cấy tròn lấy một vòng khuẩn lạc trên thạch Nutrient Agar (Merck/1.05450) cho vào Eppendorf chứa sẵn 1 ml nước cất vô trùng. Quy trình ly trích ADN được thực hiện theo bộ kit AccuRive Bacteria DNA Prep Kit (KT Biotech) (<https://kt-biotech.com/san-pham/accurive-bacteria-dna-prep-kit>).

#### Phương pháp phát hiện plasmid không tương hợp và các vùng gen cassette integron nhóm I, II

Xác định sự hiện diện 18 loại plasmid không tương hợp và các vùng gen cassette integron nhóm I, II trên các chủng *Salmonella* dựa vào 5 phản ứng multiplex-PCR và 5 simplex-PCR. Trình tự của các cặp mồi và kích cỡ sản phẩm khuếch đại được trình bày ở Bảng 1.

Thành phần phản ứng cho các m-PCR bao gồm: 25 µl Master mix 2X PCR (Bio-rad, Pháp); 0,25 µl iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-rad, Pháp); 0,5 µl mỗi đoạn mồi (nồng độ 0,5 µM); 5,0 µl (50 ng) DNA khuôn mẫu và nước cất khử ion vừa đủ thể tích 50 µl.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 1-->5: 94°C/5 phút, 30 chu kỳ (94°C/60 giây, 60°C/30 giây, 72°C/60 giây); 72°C/5 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 1-->3: 94°C/5 phút, 30 chu kỳ (94°C/60 giây; 52°C/30 giây và 72°C/60 giây); 72°C/5 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 4: 94°C/05 phút; 35 chu kỳ (94°C/01 phút, 58°C/02 phút, 72°C/02 phút); 72°C/10 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 5: 94°C/05 phút; 35 chu kỳ (94°C/01 phút, 55°C/01 phút, 72°C/05 phút); 72°C/10 phút.

Chứng dương: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky 1600.

### Điện di và đọc kết quả

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% có chứa 1 µg/ml ethidium bromide trong TBE. Các thang chuẩn DNA gồm 100 bp, 100 bp plus, 1 kbp (Fermentas, Mỹ). Thời gian điện di là 35 – 40 phút ở 100 V và 100 mA. Sau đó chụp hình gel với tia UV bằng máy chụp gel Ingenius.

**Bảng 1. Trình tự primer sử dụng cho phản ứng PCR**

Mục tiêu	Primer	Trình tự 5'-3'	Kích thước (bp)	Nguồn
parA-parB	H11 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
	H11 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
iterons	H12 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644	
	H12 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
RNAi	I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	
	I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
ori γ	X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	
	X RV	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC		
repA, B, C	L/M FW	GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG	785	
	L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
repA	N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	
	N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

iterons	<i>FIA</i> FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	
	<i>FIA</i> RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
repA	<i>FIB</i> FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702	m-PCR 3
	<i>FIB</i> RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
repA	<i>W</i> FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242	
	<i>W</i> RV	GGTGCGGGCATAAGAACCCT		
repA	<i>Y</i> FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	
	<i>Y</i> RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
iterons	<i>P</i> FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	m-PCR 4
	<i>P</i> RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
repA2	<i>FIC</i> FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	
	<i>FIC</i> RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
repA	<i>A/C</i> FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	
	<i>A/C</i> RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
repA	<i>T</i> FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	m-PCR 5
	<i>T</i> RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
repA	<i>FIIA</i> FW	CTGTGTAAGCTGATGGC	270	
	<i>FIIA</i> RV	CTCTGCCACAACTTCAGC		
RNAi/repA	<i>F<sub>repb</sub></i> FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	s-PCR 1
	<i>F<sub>repb</sub></i> RW	GAAGATCAGTCACACCATCC		
RNAi	<i>K/B</i> FW	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	160	s-PCR 2
	<i>K/B</i> R R	TCTTTCAGGAGCCCGCCAAA		
RNAi	<i>B/O</i> FW	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	159	s-PCR 3
	<i>B/O</i> RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		
Cassette integron I	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variable*	s-PCR 4
	3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA		
Cassette integron II	<i>hep51</i>	GATGCCATCGCAAGTACGAG	Variable*	s-PCR 5
	<i>hep74</i>	CGGGATCCCGACGGCATGCACGATTTGTA		

Kaushik  
et al., 2019

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Đặc điểm plasmid của các serovar *Salmonella* đa kháng

Phát hiện 100% serovar đều mang plasmid. Mang nhiều plasmid nhất là Kentucky với số lượng là 08 plasmid, Potsdam là 07 plasmid; Infantis, Saintpaul, Braenderup, Agona và 7:1,z<sub>6</sub>:UT mang 05 plasmid, mang 04 plasmid là các serovar OMF:1,z<sub>6</sub>:UT và Indiana (Bảng 2).

**Bảng 2. Tỷ lệ mang plasmid đối với các serovar của *Salmonella***

Serovar (n=21)	Số lượng	Loại plasmid (n=18)	Tỷ lệ (%)
S. Kentucky	08	<i>N-FIB-W-Y-A/C-T- K/B-B/O</i>	44,44
S. Potsdam	07	<i>N-FIB-W-Y-P-A/C-F<sub>repb</sub></i>	38,89
S. Agona	06	<i>N-W-Y-P-A/C-T</i>	33,33
S. Braenderup	05	<i>N-W-Y-P-T</i>	27,78
S. Saintpaul	05	<i>N-W-Y-P-T</i>	27,78
S. Infantis	05	<i>N-W-Y-P-T</i>	27,78
7:1,z <sub>6</sub> :UT	05	<i>N-W-Y-P-T</i>	27,78
S. Indiana	04	<i>N-W-Y-T</i>	22,22
OMF:1,z <sub>6</sub> :UT	04	<i>N-W-Y-T</i>	22,22

## CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

Sự hiện diện của plasmid khá đa dạng (10/18 loại) ở các serovar khác nhau. Trong số đó, *W* và *Y* là plasmid phổ biến nhất với tỷ lệ hiện diện trong các serovar phân lập (100%), tiếp đến là các plasmid *N*, *T*, *P*, *A/C*, *FIB* với tỷ lệ lần lượt là 85,71%, 66,67%, 38,10%, 28,57%, 9,52%; các plasmid *Frepb*, *K/B*, *B/O* được phát hiện với tỷ lệ thấp 4,76%. Không phát hiện serovar nào mang *HI1*, *HI2*, *I1*, *X*, *L/M*, *FIIA*, *FIC*, *FIA*. Cụ thể, plasmid *IncA/C* hiện diện ở *S. Agona* (01), *S. Kentucky* (03) và *S. Potsdam* (02) mang gen *blaTEM-strA-tetA-sul2* phổ biến nhất (Bảng 3). Điều này phù hợp với công trình của Cao và đồng tác giả (2018), plasmid *IncA/C* đã được phân lập ở *Salmonella* có chứa tới 10 gen kháng cho hơn 5 loại kháng sinh. Các gen kháng phổ biến nhất được mang bởi *IncA/C* là *strAB*, *sul2*, *tetAR*, *blaCMY-2* và *floR*. Các chủng *Salmonella* được phân lập tại Hoa Kỳ, plasmid *IncA/C* đã được tìm thấy trong một số serovar khác nhau và một số sản phẩm từ động vật, đặc biệt là gia súc (Folster *et al.*, 2017).

**Bảng 3. Tỷ lệ phát hiện các loại plasmid trên các serovar *Salmonella***

Loại plasmid	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Serovar (n=21)
<i>N</i>	18	85,71	<i>S. Agona</i> (01); <i>S. Braenderup</i> (01); <i>S. Indiana</i> (01); <i>S. Infantis</i> (03); <i>S. Kentucky</i> (07); <i>S. Potsdam</i> (02); <i>S. Saintpaul</i> (01); OMF:1,z6:Ut (01); 7:1,z6:UT (01)
<i>FIB</i>	02	9,52	<i>S. Kentucky</i> (01); <i>S. Potsdam</i> (01)
<i>W</i>	21	100	<i>S. Agona</i> (02); <i>S. Braenderup</i> (01); <i>S. Indiana</i> (01); <i>S. Infantis</i> (04); <i>S. Kentucky</i> (08); <i>S. Potsdam</i> (02); <i>S. Saintpaul</i> (01); OMF:1,z6:Ut (01); 7:1,z6:UT (01)
<i>Y</i>	21	100	<i>S. Agona</i> (02); <i>S. Braenderup</i> (01); <i>S. Indiana</i> (01); <i>S. Infantis</i> (04); <i>S. Kentucky</i> (08); <i>S. Potsdam</i> (02); <i>S. Saintpaul</i> (01); OMF:1,z6:Ut (01); 7:1,z6:UT (01)
<i>P</i>	8	38,10	<i>S. Agona</i> (01); <i>S. Braenderup</i> (01); <i>S. Infantis</i> (03); <i>S. Potsdam</i> (01); <i>S. Saintpaul</i> (01); 7:1,z6:UT (01)
<i>A/C</i>	06	28,57	<i>S. Agona</i> (01); <i>S. Kentucky</i> (03); <i>S. Potsdam</i> (02)
<i>T</i>	14	66,67	<i>S. Agona</i> (01); <i>S. Braenderup</i> (01); <i>S. Indiana</i> (01); <i>S. Infantis</i> (03); <i>S. Kentucky</i> (06); <i>S. Saintpaul</i> (01); OMF:1,z6:Ut (01)
<i>Frepb</i>	01	4,76	<i>S. Potsdam</i> (01)
<i>K/B</i>	01	4,76	<i>S. Kentucky</i> (01)
<i>B/O</i>	01	4,76	<i>S. Kentucky</i> (01)
<i>HI1-HI2-I1-X-L/M-FIIA-FIC-FIA</i>	0	0	-

Các loại plasmid phân bố theo kiểu gen kháng là rất khác nhau. Plasmid *W*, *Y* xuất hiện trong các serovar mang gen kháng nhóm  $\beta$ -lactam, *N* xuất hiện ở serovar mang gen *blaCTX*, *A/C* phân bố ở serovar mang gen *clm*. Đánh giá sự phân bố số lượng plasmid theo kiểu gen kháng của các serovar *Salmonella* chúng tôi nhận thấy: các serovar mang 3, 4 plasmid thường xuất hiện các chủng mang gen *blaCTX*, các serovar có kiểu gen *dhfr* thì chủ yếu mang 5 plasmid. Mang 6 plasmid chỉ xuất hiện ở các chủng mang kiểu gen *clm* (Bảng 4).

**Bảng 4. Số lượng plasmid và kiểu hình kháng kháng sinh của *Salmonella***

Nguồn	Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	Số lượng plasmid	Các loại plasmid
Thịt heo	SA11/19 3497	<i>S. Kentucky</i>	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	06	<i>N-W-Y-T-K/B-B/O</i>
	SA11/19 4221	<i>S. Indiana</i>	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	04	<i>N-W-Y-T</i>
Thịt bò	SA07/20 3335	<i>S. Infantis</i>	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	05	<i>N-W-Y-P-T</i>
	SA11/19 3498	<i>S. Agona</i>	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	03	<i>W-Y-A/C</i>
Thịt gà	SA12/19 1584	<i>S. Infantis</i>	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	04	<i>W-Y-P-T</i>
	SA05/20 1114	<i>S. Potsdam</i>	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	06	<i>N-FIB-W-Y-A/C-F<sub>repb</sub></i>
	SA07/20 1066	<i>S. Kentucky</i>	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	03	<i>N-W-Y</i>
	SA07/20 1067	<i>S. Kentucky</i>	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	04	<i>N-W-Y-T</i>
Cá	SA11/19 3514	<i>S. Kentucky</i>	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	05	<i>N-FIB-W-Y-T</i>
	SA11/19 3515	<i>S. Saintpaul</i>	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	05	<i>N-W-Y-P-T</i>

## HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

SA11/19 4205	S. Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	05	N-W-Y-P-T
SA12/19 501	S. Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	03	N-W-Y
SA12/19 1600	S. Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	05	N-W-Y-A/C-T
SA01/20 66	S. Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	05	N-W-Y-P-A/C
SA02/20 1524	S. Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	05	N-W-Y-A/C-T
SA05/20 210	S. Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	04	N-W-Y-T
SA06/20 1808	S. Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	05	N-W-Y-P-T
SA06/20 1809	S. Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	04	N-W-Y-P
SA07/20 460	OMF:1,z <sub>6</sub> :UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	04	N-W-Y-T
SA07/20 462	7:1,z <sub>6</sub> :UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	04	N-W-Y-P
SA08/20 2058	S. Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	04	W-Y-A/C-T

### Đặc điểm vùng gen cassette của *Salmonella* dương tính với integron I, II

Các gen cassette nằm giữa vùng 5'-CS và 3'-CS của các integron I và có kích thước thay đổi tùy thuộc vào các gen kháng được chèn vào. Đặc điểm vùng gen cassette của các serovar *Salmonella* được xác định tại Bảng 5. Đối với các integron I, kết quả khảo sát cho thấy vùng gen cassette được khuếch đại ở 18/21 chủng *Salmonella* (85,71%) với 08 kích thước khác nhau (> 1,0 kbp; 1,0 kbp; 0,9 kbp; 0,6 kbp; 0,5 kbp; 0,4 kbp; 0,25 kbp; 0,2 kbp). Vùng gen cassette của integron I được khuếch đại nhiều nhất là vùng có kích thước 0,6 kbp (9/21, 42,86%), kế đến là 1,0 kbp (7/21, 33,33%), 0,25 kbp (6/21, 28,57%), 0,9 kbp (5/21, 23,81%), > 1,0 kbp (4/21, 19,05%), 0,4 và 0,2 kbp (2/21, 9,53%) và thấp nhất là 0,5 kbp (1/21, 4,76%). Tỷ lệ các serovar của *Salmonella* không mang vùng gen cassette thuộc integron I là 14,29% (3/21), mang cùng lúc 4 vùng là 4,76% (1/21), 3 và 2 vùng là 23,81% (5/21), 1 vùng 33,33% (7/21). Vùng gen cassette có kích thước > 1,0 kbp chủ yếu hiện diện ở serovar Kentucky với tỷ lệ 50% (4/8), các serovar này mang chung các gen *bla*CTX/TEM là gen mã hóa enzyme  $\beta$ -lactamase phổ rộng ESBL; gen *gyrA,B/parC* mã hóa enzyme DNA gyrase và topoisomerase IV kháng đối với NA, OFX và CIP; gen *tet* mã hóa cho các protein bảo vệ ribosome kháng TE; gen *sul* ức chế dihydropteroate synthetase kháng SXT.

Tất cả các serovar chứa vùng gen cassette thuộc integron I có kích thước 0,9 và 1,0 kbp đều mang chung các gen *gyrA,B/parC,E-tetA,C-sul1* có khả năng kháng các kháng sinh thuộc nhóm quinolon, tetracycline và sulfonamide. Kết quả còn cho thấy, tất cả các serovar chứa vùng cassette thuộc integron I thì 100% mang gen *tet*; 94,44% mang gen *gyrA,B/parC,E*; 88,89% mang gen *sul1,2*; 61,11% mang gen *bla*TEM/CTX; 44,44% mang gen *strA*; 16,67% mang gen *dhfr*; 5,56% mang gen *cmIA*. Chúng tôi nhận định có sự tồn tại mối tương quan giữa integron chứa các vùng gen cassette với khả năng kháng AM, NA, CIP, SXT, STR, GM và TE của các serovar phân lập từ thực phẩm. Điều này cũng đã được giải thích từ các nghiên cứu trước đây, phần lớn các vùng gen cassette liên kết với integron I của nhiều loài vi khuẩn mang gen kháng với aminoglycoside (White *et al.*, 2001). Tuy nhiên, sự khác nhau về tỷ lệ xuất hiện cũng như sự kết hợp, sắp xếp của các gen trong vùng gen cassette ở các vi khuẩn cho đến nay vẫn chưa được chứng minh. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để làm sáng tỏ vấn đề này.

Vùng gen cassette thuộc integron II được xác định tại Bảng 5. Kết quả cho thấy tỷ lệ serovar mang vùng gen cassette là 72,73% với 05 kích thước khác nhau (2,0 kbp; 1,6 kbp; 1,0 kbp; 0,7 kbp; 0,5 kbp). Sự đa dạng của các vùng gen cassette chèn vào integron II thấp hơn so với integron I. Điều này được Moura và đồng tác giả (2007) giải thích có lẽ là do xảy ra đột biến ở codon 179 của gen mã hóa enzyme integrase thuộc integron II, từ đó tạo ra một protein bị cắt ngắn và mất chức năng, dẫn đến hoạt động của integrase bị hạn chế và không thể loại bỏ các vùng gen cassette hiện có hoặc chèn vùng mới vào integron. Sự sắp xếp vùng gen cassette phổ biến trong các integron II được tìm thấy ở các serovar *Salmonella* lần lượt là (*gyrA,B/parC,E-tetA-sul1,2*); (*aad2-dhfr*). Vùng gen cassette *aad2-dhfr* được phát hiện thường xuyên nhất trong các integron II (Van *et al.*, 2007). Hơn nữa, các serovar *Salmonella* dương tính với integron I và II kháng với các loại kháng sinh khác nhau nhưng các vùng gen cassette liên quan không được tìm thấy, điều này Chang và đồng tác giả (2000) cho rằng hiện tượng kháng của vi khuẩn không phải từ nguồn integron. Kết quả thu được trong nghiên cứu này, vùng gen cassette được khuếch đại bằng PCR ở integron II thấp hơn so với integron I.

Qua kết quả thu được, chúng tôi xác định được một số serovar, mặc dù có kiểu hình đa kháng và có mang gen integron I và II nhưng không được chèn các vùng gen cassette. Dawes và đồng tác giả (2010) cho biết, khác biệt này có thể do sự thay đổi trong vùng 3'CS của integron so với vị trí bắt cặp của các primer trong quá trình thực hiện phản ứng PCR. Ngoài ra, có một số serovar chứa nhiều nhóm integron và vùng gen cassette, điều này cho thấy các integron hiện diện tại các vùng nhiễm sắc thể khác nhau của các serovar đã được phân lập. Mặt khác,

## CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

mối tương quan đáng kể của các integron I và II được chèn các vùng gen cassette có khả năng kháng NA, SXT, AM, C, OFX, CIP và TE cũng được phát hiện.

**Bảng 5. Sự hiện diện các vùng gen cassette của *Salmonella***

Nguồn	Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	Integron		Kích thước vùng gen cassette (kbp)		
				IntI1	IntI2	IntI1	IntI2	
Thịt heo	SA11/19 3497	S. Kentucky	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	+	+	-	0,7	
	SA11/19 4221	S. Indiana	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,25	1,0; 0,7	
Thịt bò	SA07/20 3335	S. Infantis	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	+	+	1,0; 0,9	-	
	SA11/19 3498	S. Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	-	0,25	1,0; 0,7	
	SA12/19 1584	S. Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0	2,0; 1,6; 1,0; 0,7	
Thịt gà	SA05/20 1114	S. Potsdam	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	-	1,0; 0,6; 0,25	1,0; 0,7	
	SA07/20 1066	S. Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	> 1,0; 0,6	2,0; 0,7	
	SA07/20 1067	S. Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	> 1,0; 0,6; 0,4	0,7	
	SA11/19 3514	S. Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	-	0,7	
	SA11/19 3515	S. Saintpaul	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,2	1,0; 0,6	
	SA11/19 4205	S. Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0; 0,2	1,0; 0,7	
	SA12/19 501	S. Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	> 1,0	-	
	SA12/19 1600	S. Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	-	-	
	SA01/20 66	S. Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	2,5	1,0; 0,7	
	SA02/20 1524	S. Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,6; 0,4	1,0; 0,7	
	Cá	SA05/20 210	S. Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0; 0,9; 0,6	1,6; 1,0; 0,7
		SA06/20 1808	S. Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	+	0,6; 0,25	2,0; 1,0; 0,7; 0,5
		SA06/20 1809	S. Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	+	+	1,0; 0,9; 0,5	0,7
SA07/20 460		OMF:1,z <sub>6</sub> :UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,6	2,0; 1,0; 0,7	
SA07/20 462		7:1,z <sub>6</sub> :UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0; 0,9; 0,6; 0,25	1,0; 0,7	
	SA08/20 2058	S. Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	+	-	> 1,0; 0,9; 0,6	0,7	

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cho thấy sự đa kháng của các serovar *Salmonella* và xu hướng ngày càng gia tăng với nhiều loại kháng sinh. Ngoài ra, chúng tôi đã phát hiện 100% serovar đều mang plasmid. Trong số đó, W và Y là plasmid phổ biến nhất với tỷ lệ hiện diện ở các serovar phân lập (100%), tiếp đến là các plasmid N, T, P, A/C, FIB với tỷ lệ lần lượt là 85,71%, 66,67%, 38,10%, 28,57%, 9,52%; các plasmid *Frepb*, *KB*, *B/O* được phát hiện với tỷ lệ thấp 4,76%. Không phát hiện serovar nào mang *HI1*, *HI2*, *I1*, *X*, *L/M*, *FIIA*, *FIC*, *FIA*. Tỷ lệ serovar mang vùng gen cassette thuộc integron nhóm I là 85,71% với 08 kích thước khác nhau (> 1,0 kbp; 1,0 kbp; 0,9 kbp; 0,6 kbp; 0,5 kbp; 0,4 kbp; 0,25 kbp; 0,2 kbp), integron nhóm II là 72,73% với 05 kích thước khác nhau (2,0 kbp; 1,6 kbp; 1,0 kbp; 0,7 kbp; 0,5 kbp). Kết quả nghiên cứu nhằm cung cấp dữ liệu cho các nhà khoa học có những nghiên cứu tiếp theo về cơ chế kháng đa kháng sinh ở mức độ phân tử. Đồng thời, khảo sát thêm sự hiện diện của các nhóm integron khác, nghiên cứu đặc điểm vùng gene cassette của các *Salmonella* phân lập từ thực phẩm cũng hết sức cần thiết và đáng được quan tâm.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ về kinh phí từ nhiệm vụ khoa học công nghệ hợp đồng số 70/2019/HĐ-QPTKHCN.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Cambray G, Guerout AM, Mazel D (2010). Integrons. *Annu Rev Genet*, 44: 141-166.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods*, 63(3): 219-228.
- Chang C, Chang L, Chang Y (2000). Characterisation of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan. *J. Med. Microbiol*, 49(12): 1097-1102.
- Dawes F, Kuzevski A, Bettelheim K (2010). Distribution of class 1 integrons with is mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *PLoS ONE*, 5(9): e12754.
- Endimiani ACL, Hujer AM (2008). Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing BLA<sub>KPC</sub> in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother*, 52(7): 2680-2682.
- Folster JP, Grass JE, Bicknese A, Taylor J, Friedman CR, Whichard JM (2017). Characterization of resistance genes and plasmids from outbreaks and illness clusters caused by *Salmonella* resistant to ceftriaxone in the United States, 2011-2012. *Microb. Drug. Resist*, 23(2): 188-193.
- Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Gulati P (2019). Integrons and antibiotic resistance genes in water-borne pathogens: threat detection and risk assessment. *J Med Microbiol*, 68(5): 679-692.
- Moura A, Henriques I, Correia A (2007). Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother*, 60(6): 1243-1250.
- Nikaido H (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem*, 78: 119-146.
- Partridge SR, Coiera E, Iredell JR (2009). Gen cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*, 33: 757-784.
- Van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, Mevius D (2007). Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *E. coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother*, 59: 746-750.
- White PA, McIver CJ, Rawlinson WD (2001). Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 2658-2661.

## INCOMPATIBLE PLASMID AND GENE CASSETTES OF MULTI-RESISTANT *SALMONELLA* SEROVARS ISOLATED FROM FOOD AT CONVENTIONAL MARKETS IN HO CHI MINH CITY

Truong Huynh Anh Vu<sup>1\*</sup>, Nguyen Hoang Khue Tu<sup>2</sup>, Tran Quang Vinh<sup>3</sup>, Nguyen Minh Hien<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Microbiology laboratory, Center of Analytical Services and Experimentation HCMC (CASE), Vietnam

<sup>2</sup>School of Biotechnology, HCMC International University, Vietnam National University HCMC, Vietnam

<sup>3</sup>Science Management Division, Department of Science and Technology HCMC (DOST), Vietnam

<sup>4</sup>School of Medicine, Vietnam National University HCMC, Vietnam

**SUMMARY**

The study investigated the presence of 18 incompatible plasmids and gene cassette regions of integron I and II of 21 multi-resistant *Salmonella* serovars (resistant to more than 07 antibiotics) isolated from food samples collected at traditional markets in Ho Chi Minh City. The results have found that 100% of serovar carries plasmids. Among them, W and Y are the most common plasmids with the presence rate of isolated serovars (100%), followed by N, T, P, A/C, FIB plasmids with rates of 85.71%, 66.67%, 38.10%, 28.57%, 9.52%, respectively; Frepb, K/B, B/O plasmids were detected with a low rate of 4.76%. No serovars were detected carrying HI1, HI2, II, X, L/M, FIIA, FIC, FIA. The assessment of the gene cassette region of integron I was accounted for 85.71%; group II was 72.73%. The presence of mobile genetic factors in *Salmonella* in the study suggests that the bacteria can transmit or receive antibiotic resistance genes from other bacterial species in the natural environment. In addition, the research results contribute to providing scientific evidence for decisions on management and raising awareness of effective antibiotic use in Ho Chi Minh City, Vietnam.

**Keywords:** Multidrug-resistance, antimicrobial resistance, *Salmonella*, incompatible plasmid, gene cassette.

\* Author for correspondence: Tel:0909182442; Email: vutha@case.vn

# NGHIÊN CỨU TẠO HẠT NANO BẠC BẰNG CÔNG NGHỆ LÊN MEN CHŨNG VI KHUẨN *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS* CYS-V3 PHÂN LẬP TẠI VƯỜN QUỐC GIA CHUR YANG SIN

Đỗ Văn Chung<sup>1</sup>, Phan Tứ Quý<sup>3</sup>, Hồ Nhật Được<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Huyền<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Bốn<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên, Đắk Lắk, Việt Nam

<sup>3</sup>Bộ môn Hóa, Trường Đại học Tây Nguyên, Đắk Lắk, Việt Nam

## TÓM TẮT

Công nghệ tạo nano xanh là một phương pháp đơn giản, dễ thực hiện và dễ tái tạo, cung cấp các hạt nano có đặc tính ổn định và phân tán tốt trong dung dịch nước. Các hạt nano bạc có thể được tổng hợp hiệu quả bởi vi sinh vật. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn nhằm sinh tổng hợp nano bạc bằng công nghệ lên men. Trong số 15 chủng vi sinh vật phân lập từ vườn Quốc gia Chư Yang Sin, chủng vi khuẩn CYS-V3 được phát hiện và tuyển chọn là chủng tiềm năng có khả năng sinh tổng hợp nano bạc. Dựa trên phương pháp giải trình tự gen 16S, chủng này được định danh là *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 với độ tương đồng 99,93%. Trong đó, khả năng sinh tổng hợp nano bạc từ loài vi khuẩn này là ghi nhận mới cho khoa học. Điều kiện tạo hạt nano thích hợp đã được xác định trong dung dịch  $AgNO_3$  (nồng độ 2 mM) trộn với canh trường lên men (đã pha loãng 5%) với tỷ lệ 3:1 trong 35 giờ. Đặc tính hạt nano được xác định thông qua đo quang phổ UV-VIS, hình SEM, phổ XRD, phổ IR và thế Zeta. Kết quả cho thấy nano bạc tổng hợp được trong nghiên cứu này có dạng hình cầu, phổ hấp thụ trong khoảng 420 - 470 nm, vùng phân bố hạt nano từ 30 - 300 nm. Hạt nano bạc có độ bền cao với thế Zeta -58,1 mV.

*Từ khóa:* *Acinetobacter nosocomialis*, vi khuẩn bản địa, tổng hợp xanh, hạt nano bạc.

## MỞ ĐẦU

Nhiều loài vi khuẩn đã được minh chứng giữ vai trò quan trọng trong việc xử lý các độc tố kim loại nhờ khả năng khử các ion kim loại. Trong đó, một số loài vi đã được ghi nhận có khả năng sinh tổng hợp nano bạc như *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus licheniformis* (Weisburg *et al.*, 1991). Tổng hợp nano bạc bằng phương pháp sinh học có nhiều ưu điểm so với các phương pháp vật lý và hóa học thông thường, như an toàn và không độc hại cho môi trường cũng như giảm tiêu thụ năng lượng và tài nguyên. Ngoài ra, tổng hợp nano bạc phương pháp sinh học có thêm ưu điểm là đơn giản, dễ tái tạo, tạo ra hạt nano có đặc tính ổn định và phân tán tốt trong dung dịch nước. Bạc có nhiều tính chất đặc trưng và hữu ích (Alexander, 2009) như tính kháng khuẩn (Eckhardt *et al.*, 2013), khả năng xúc tác (Dong *et al.*, 2015), do đó được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng. Trong những năm gần đây, nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước đã có nhiều công trình nghiên cứu và công bố về việc tổng hợp xanh các hạt nano bạc. Nano bạc (AgNPs) đã được nghiên cứu chuyên sâu nhờ các đặc tính vật lý và hóa học (quang, điện, nhiệt và sinh học) hữu ích trong nhiều lĩnh vực như y học, sức khỏe, thực phẩm và công nghiệp. Vì vậy, công nghệ nano là một trong những công cụ quan trọng bậc nhất của khoa học nông nghiệp hiện đại, trong đó công nghệ nano trong lĩnh vực nông nghiệp - thực phẩm được dự đoán trở thành một lực lượng dẫn dắt nền kinh tế toàn cầu (Solaki *et al.*, 2015).

Với những ưu điểm về tiềm năng ứng dụng, nên các vật liệu nano thu hút được sự quan tâm nghiên cứu nhằm sản xuất và ứng dụng. Trong những năm gần đây, ứng dụng công nghệ lên men trong sản xuất vật liệu nano đã có nhiều tác động tích cực trong lĩnh vực khoa học công nghệ và nông nghiệp toàn cầu (Dandapat *et al.*, 2022). Sản xuất vật liệu nano từ canh trường lên men của vi sinh vật là công nghệ hoàn toàn xanh, chi phí thấp, quy trình được kiểm soát chặt chẽ, và có thể mở rộng quy mô sản xuất công nghiệp, đáp ứng được cho nhu cầu ứng dụng thực tế.

Trên thế giới đã có các nghiên cứu ứng dụng công nghệ lên men vi sinh vật nhằm tổng hợp vật liệu nano (Siddiqi *et al.*, 2018). Tuy nhiên, hướng nghiên cứu này tại Việt Nam còn hạn chế. Với mục tiêu tổng hợp xanh và hiệu quả nano bạc bằng công nghệ lên men, chúng tôi tiến hành phân lập và sàng lọc chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh tổng hợp nano bạc, tạo tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo tại địa phương. Các hạt nano bạc được tổng hợp bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy vi khuẩn và được đặc trưng bằng phân tích thông qua quang phổ UV-VIS, điện thế zeta, phân bố hạt, XRD và hình ảnh SEM và TEM.



**NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP****Nguyên liệu**

Các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp nano bạc được phân lập và tuyển chọn từ vườn Quốc gia Chư Yang Sin. Môi trường thương mại: NB (Nutrient Broth) của hãng Himedia, Ấn Độ với thành phần môi trường (Peptone 5,0 gam; Sodium chloride (NaCl) 5,0 gram; Meat extract B# (cao thịt) 1,5 gam; Yeast extract (cao nấm men) 1,5 gam; pH  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25^\circ\text{C}$ ). Bạc nitrat ( $\text{AgNO}_3$ , Sigma-Aldrich, độ tinh khiết 99,0%) là tiền chất để tổng hợp nano bạc, Agar (Robika Hải Long - Việt Nam). Glycerol (AR, GHTECH, Cas 56-81-5) của hãng GHTECH (JHD), tinh khiết 92,09%.

**Phương pháp****Phương pháp thu mẫu và phân lập vi khuẩn**

Thời gian thu mẫu đất tại vườn quốc gia Chư Yang Sin là tháng 8 năm 2023. Mẫu được thu thập ở đa dạng các khu vực đất nguyên sinh, vị trí lấy mẫu được lấy nhiều điểm quanh các gốc cây rừng tự nhiên và được trộn thành 1 mẫu chung với khối lượng 1 kg đất/mẫu đất, độ sâu lấy mẫu từ 0 - 30 cm từ mặt đất xuống. Các mẫu sau khi lấy được ghi nhãn nơi thu, ngày thu. Mẫu được đem tới phòng thí nghiệm, tiến hành phân lập và làm thuần các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp Nano bạc phân lập được. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn được hấp khử trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 30 phút. Cân 10 gam mẫu đất cho vào bình tam giác chứa 100 mL nước cất, khuấy đều trong hai phút. Sau đó pha loãng dung dịch ở nồng độ  $10^{-8}$  và  $10^{-9}$  dùng pipet Paster hút dịch từ ống đựng mẫu, nhỏ 1 - 2 giọt mẫu xuống đĩa thạch petri, dùng que gạt thủy tinh vô trùng dàn đều trên mặt thạch, úp lật đĩa để ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , sau 24 giờ quan sát các khuẩn lạc đơn. Sau đó, cấy ria các khuẩn lạc đơn có màu sắc khác nhau lên các đĩa thạch petri nhiều lần để làm thuần mẫu. Tiến hành lưu mẫu trong ống nghiệm và eppendorf 1,5 mL với glycerol. Chuẩn bị 300 mL môi trường NB trong ba bình tam giác 250 mL sau khi hấp khử trùng, cấy vi khuẩn và nhân nuôi trong 5 ngày ở tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau đó ly tâm canh trường lên men của vi khuẩn ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Lấy phần dịch nổi của canh trường lên men và bảo quản ở  $5^\circ\text{C}$  để tổng hợp nano bạc (Nguyễn Lân Dũng, 2003).

**Phương pháp sàng lọc và định danh chủng vi khuẩn tiềm năng**

Trong thử nghiệm này, khả năng sinh tổng hợp nano bạc của các chủng vi khuẩn được khảo sát đánh giá chỉ tiêu UV-VIS với phổ hấp thụ cực đại được phân tích trên phạm vi 200 - 800 nm, ở độ phân giải 1 nm và tốc độ quét 400 nm/phút. Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trong môi trường thương mại NB (Nutrient Broth) ở  $30^\circ\text{C}$  trong 5 ngày, thu phần dịch nổi canh trường lên men để tiến hành phản ứng tạo nano bạc. Quá trình nhân nuôi các chủng vi khuẩn, đo phổ UV-VIS được tiến hành tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk. Dựa vào phổ UV-VIS đặc trưng của dung dịch nano bạc được dung dịch canh trường tạo ra các hạt nano được biết là thể hiện dải cộng hưởng plasmon bề mặt đặc trưng ở 420 - 440 nm có thể được đo bằng phổ UV-VIS (Hồ Đình Quang *et al.*, 2020). Hiệu chỉnh đường cơ sở của máy quang phổ được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu trắng (nước cất). Phổ hấp thụ UV-VIS của tất cả các mẫu đã được ghi lại và dữ liệu số được vẽ và phân tích bằng Spekwin32.

Phương pháp định danh 16S rDNA của các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nano bạc, được thực hiện tại Phòng thử nghiệm - Công ty TNHH DV và TM Nam Khoa - 793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, quận 7, Thành phố Hồ Chí Minh.

**Phương pháp xác định một số điều kiện thích hợp tạo hạt nano (nồng độ bạc nitrat, nồng độ pha loãng canh trường lên men và thời gian phản ứng)**

**Ảnh hưởng của tỉ lệ dung dịch vi khuẩn/dung dịch bạc nitrat:** Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *Acinetobacter nosocomialis* được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Canh trường lên men pha loãng ở nồng độ 5% với nước cất. Tiến hành cho phản ứng với dung dịch  $\text{AgNO}_3$  2 mM, với các tỉ lệ dung dịch vi khuẩn/dung dịch bạc nitrat như sau: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 và 1:5 với thời gian phản ứng là 20 giờ.

**Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng độ pha loãng canh trường lên men đến phản ứng:** Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 ở mật độ  $18,2 \times 10^8$  CFU/mL ở  $30^\circ\text{C}$ , được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Lấy phần dịch nổi sau khi ly tâm, tiến hành pha loãng ở nồng độ 5%, 10%, 20% với nước cất tiến hành cho phản ứng với dung dịch  $\text{AgNO}_3$  2 mM ở tỉ lệ 1:3 trong thời gian phản ứng là 20 giờ.

**Ảnh hưởng của thời gian đến phản ứng:** Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 ở mật độ  $18,2 \times 10^8$  CFU/mL ở  $30^\circ\text{C}$ . Được pha loãng ở nồng độ 5% với nước cất tiến hành cho phản ứng với dung dịch  $\text{AgNO}_3$  2 mM ở tỉ lệ 1:3 trong thời gian 03, 25, 35 và 50 giờ.

**Phương pháp xác định đặc tính hạt nano**

**SEM:** Hình thái và cấu trúc bề mặt của các hạt nano được đánh giá bằng kính hiển vi điện tử quét để bàn (Phenom Pro Desktop SEM), độ phóng đại quang học ánh sáng 20 - 134 X, phóng đại quang học điện tử 160 - 350.000 X, độ phân giải  $\leq 6$  nm SED và  $\leq 8$  nm BSD, điện áp gia tốc chế độ nâng cao với phạm vi điều chỉnh

giữa chế độ hình ảnh 4,8 kV và 20,5 kV được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

**Phân bố hạt (SIZE):** Phân bố kích thước hạt nano được xác định bằng thiết bị đo SZ-100 (Hãng HORIBA) được thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

**Điện thế Zeta:** Được xác định bằng thiết bị đo SZ-100 (Hãng HORIBA). Tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk

**Phân tích (XRD):** Mẫu được phân tích XRD trên thiết bị D8 Advance Eco (Bruker, Đức) với điện áp 40 kV, cường độ dòng điện 25 mA, sử dụng bước sóng Cu K alpha 0,154 nm được thực hiện tại Bộ môn hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, Phường 4, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh.

**Quang phổ (IR):** Nguồn gốc JASCO, hệ thống dữ liệu, vị trí 1033, độ phân giải  $\Delta x = 0,964233$ , xunits 1/cm, yunits truyền firstx 399,1927, lastx 4000,6047, npoints 3736, firstly 82,14559, maxy 99,52848, miny 81,67912 được tiến hành tại Bộ môn hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, Phường 4, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh.

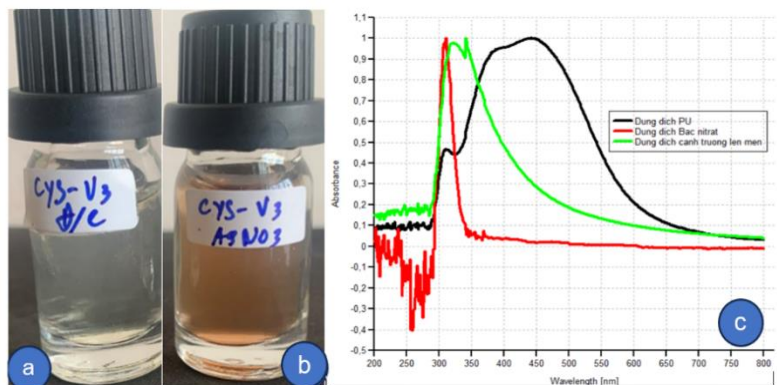
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập tuyển chọn và định danh chủng vi khuẩn có tiềm năng sinh tổng hợp nano bạc

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có tiềm năng tổng hợp nano bạc. Từ các mẫu đất thu thập tại vườn Quốc gia Chư Yang Sin, 15 chủng vi khuẩn đã được phân lập. Trong đó, canh trường lên men của chủng CYS-V3 cho tín hiệu tổng hợp nano bạc rõ ràng nhất (Hình 1) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Để tổng hợp xanh nano bạc (AgNPs), 2 mL dịch nuôi cấy các vi khuẩn bằng môi trường NA ở nồng độ pha loãng 20 lần, thêm 2 mL  $AgNO_3$  2 mM (lắc đều trong 10 giây, ở nhiệt độ phòng). Do đó, khối lượng bạc được sử dụng là 0,034 g tương ứng với 0,315 milimol bạc ban đầu.

Kết quả thí nghiệm sau 25 giờ chủng vi khuẩn CYS-V3 có khả năng sinh tổng hợp nano bạc thông qua sự thay đổi màu sắc của dung dịch từ màu trắng đục sang màu nâu (Hình 1 a và b) và dải cộng hưởng plasmon bề mặt thông qua đo phổ UV-VIS (Hình 1 c).

Cường độ màu thu được từ canh trường lên men phản ứng với bạc nitrat với tỉ lệ phối 1:3. Các hạt nano bạc được biết là thể hiện một dải cộng hưởng plasmon bề mặt đặc trưng ở  $\sim 436$  nm được đo bằng phổ UV-VIS đối với các hạt nano bạc (Ajith et al., 2019). Trong phổ UV-VIS (Hình 1 c) một đỉnh rộng, mạnh, nằm giữa 420 nm và 470 nm, đã được quan sát thấy đối với các hạt nano bạc được chuẩn bị bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu này, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kalishwaralal Kalimuthu và CS về khả năng sinh tổng hợp nano bạc của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* được công bố năm 2008 (Kalimuthu et al., 2008).



**Hình 1. Tổng hợp nano bạc từ canh trường lên men của chủng vi khuẩn CYS-V3; Trong đó: (a) Canh trường lên men; (b) Phổ UV-VIS của bạc nitrat; (c) Phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc**

Chủng vi khuẩn CYS-V3 được định danh 16S, bằng phương pháp giải trình tự Nucleotic. Sau khi tách chiết ADN, tiến hành PCR gen 16S. Trình tự 16S rRNA được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại vi khuẩn do 16S rRNA ở vi khuẩn có mức độ biến đổi cao giữa các loài gần gũi (Weisburg et al., 1991). Các mẫu PCR dương tính được tinh sạch và đọc trình tự bằng bộ kit Bigdye 3.1. Trình tự của chủng vi khuẩn CYS-V3 được so sánh với trình tự gen có sẵn trên ngân hàng gen (NCBI); xác định được chủng vi khuẩn CYS-V3 là *Acinetobacter nosocomialis*, với độ tương đồng 99,93% (Bảng 1).

**Bảng 1. Kết quả định danh bằng sinh học phân tử chủng vi khuẩn có khả năng tạo hạt nano bạc**

Ký hiệu mẫu	Kết quả định danh	Độ tương đồng	Địa điểm thu mẫu	Mẫu
CYS-V3	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99,93%	Chư Yang Sin, xã Yang Tao, huyện Lắk, tỉnh Đắk Lắk	Đất

Trình tự gen 16S của chủng vi khuẩn *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3:

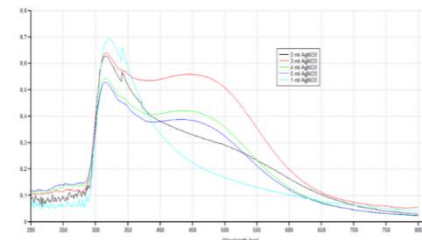
```

CCCCAGTCATCGGCCACACCGTGGTAACCGCCCTCTTGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGAACAAA
CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAG
ATTAGCATCACATCGCTGTGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTA
AGGGCCATGATGACTTGACGCTCGTCCCGCCTTCCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCC
GACATTACTCGTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTT
CTTACTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTG
CGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCAGCCGTAACCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTT
AGCTGCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGTCCCATGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTGTTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGC
CATCGGTAATTCCTCCAGATCTCAGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCACACTC
TAGTAACCGATTCGAATGCAATTCCTCAAGTTAAGCTCGGGGATTTACATTTGACTTAATTAGCCGCT
ACGCGCGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAAGCTTGACCCCTCTGTATTACCGCGGTGCTGGCACAG
AGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTATCTCTAGGTATTATCTAAAGTAGCCTCCTCCTCG
CTTAAAGTGCTTTACAACCATAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATT
GTCCAATATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCA
TCTCTCAGACCCGCTACAGATCGTCGCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAG
GCTCATCTATTAGCGCAAGGTCCGAAGATCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCATCC
CTTTCGAGATGTTGCCCCACTAATAGGCAGATTCCTAAGCATTACTACCCGTCGCGCGCTAGGTCCG
GTAGCAAGCTACCTTCCCCCGCT
    
```

*A. nosocomialis* là một vi khuẩn gram âm, hiếu khí. Cho đến thời điểm hiện tại chưa có bất kể một nghiên cứu nào ở trong nước và quốc tế công bố về khả năng sinh tổng hợp nano bạc. Như vậy, việc phân lập và tuyển chọn đã phát hiện chức năng mới của vi khuẩn *A. nosocomialis* có khả năng tạo ra các hạt AgNPs.

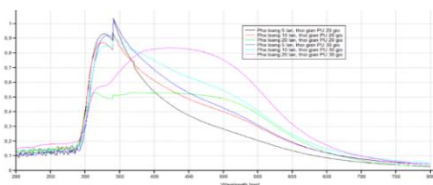
**Điều kiện thích hợp tạo nano bạc từ canh trường lên men**

**Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi canh trường/dung dịch bạc nitrat:** Ảnh hưởng tỷ lệ phối trộn đến quá trình tổng hợp AgNPs được thể hiện trên (Hình 2) trong đó phổ hấp thụ 325 nm là của gốc Fe<sup>3+</sup>, bước sóng từ 400 - 470 nm phổ hấp thụ của AgNPs. Phổ UV-VIS thể hiện đỉnh cao nhất ở nồng độ AgNO<sub>3</sub> là ở tỉ lệ 1 mL dung dịch vi khuẩn với 3 mL dung dịch AgNO<sub>3</sub> 2 mM, cho thấy điều kiện tổng hợp tối ưu. Điều này có thể được quy cho sự tạo mầm của NPs. Khi nồng độ muối Ag tăng lên, một phần ion Ag<sup>+</sup> bị khử thành nguyên tử Ag<sup>0</sup>, các nguyên tử Ag này đóng vai trò là trung tâm tạo mầm, tạo điều kiện cho quá trình khử các ion Ag<sup>+</sup> còn lại và tạo ra nhiều AgNPs hơn, do đó làm tăng độ hấp thụ. Ở các tỷ lệ phối trộn giữa dung dịch vi khuẩn khác đều cho thấy các đỉnh của phổ UV-VIS đều thấp hơn so với tỷ lệ 1:3. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng hiệu ứng tổng hợp và sự cạnh tranh giữa các NPs góp phần làm thay đổi dải SPR, không phụ thuộc vào sự gia tăng nồng độ Ag<sup>+</sup>. Ngoài ra, việc xử lý ở các tỷ lệ 1:4 và 1:5 dẫn đến sự kết tụ các NPs do tần số va chạm của các ion Ag<sup>+</sup> tăng lên. Vì vậy, trong số các tỷ lệ phối trộn giữa dung dịch vi khuẩn và dung dịch bạc nitrat, được thử nghiệm trong nghiên cứu này là tỷ lệ 1:3 (1 mL dung dịch vi khuẩn 3 mL dung dịch bạc nitrat) với dung dịch AgNO<sub>3</sub> 2 mM là tỷ lệ phù hợp nhất để tổng hợp AgNPs.



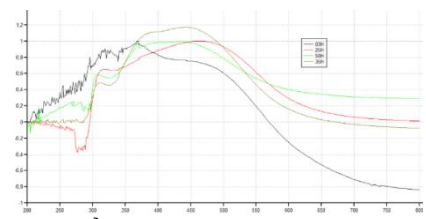
Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi canh trường/dung dịch bạc nitrat

**Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng canh trường lên men:** Nồng độ pha loãng canh trường lên men khác nhau đến quá trình tổng hợp AgNPs được thể hiện trên (Hình 3). Phổ UV-VIS thể hiện đỉnh cao nhất ở độ pha loãng với tỷ lệ 1/20 (1 mL dung dịch nuôi cấy pha với 19 mL H<sub>2</sub>O cất) cho thấy điều kiện tổng hợp tối ưu. Ở các tỷ lệ pha loãng 1:5; 1:10 dung dịch vi khuẩn khác đều cho thấy các đỉnh của phổ UV-VIS đều thấp hơn so với tỷ lệ 1:20. Vì vậy, trong số các tỷ lệ pha loãng canh trường lên men được thử nghiệm trong nghiên cứu ở 1:20 là phù hợp nhất để tổng hợp AgNPs.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng của canh trường lên men

**Ảnh hưởng thời gian phản ứng:** Thời gian phản ứng được khảo sát trong điều kiện: lượng dịch chiết của canh trường lên men trong thời gian 5 ngày, dịch nuôi cấy được li tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút, trong 15 phút, sau đó được pha loãng ở tỷ lệ 1:20 phản ứng với dung dịch AgNO<sub>3</sub> 2 mM, ở tỷ lệ phản ứng 1:3 (1 mL dung dịch canh trường, 3 mL dung dịch AgNO<sub>3</sub> 2 mM) trong 03, 25, 35 và



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến quá trình tạo nano Ag

50 giờ. Kết quả được thể hiện tại (Hình 4) các hạt nano Ag đã hình thành có các đỉnh hấp thụ trong khoảng bước sóng 421 - 450 nm. Có thể nhận thấy, cường độ hấp thụ có xu hướng tăng theo thời gian phản ứng, tương ứng với nồng độ nano bạc tăng lên. Tuy nhiên, ở 35 giờ phản ứng có đỉnh hấp thụ cao nhất, khi kéo dài thời gian phản ứng đến 50 giờ thì mật độ quang lại có xu hướng giảm. Điều này chứng tỏ khi thời gian phản ứng tăng thì có sự hình thành keo tụ song song với sự hình thành nano Ag làm cho đỉnh hấp thụ cực đại giảm xuống. Ở (Hình 4) cho thấy sau 35 giờ phản ứng tạo nano bạc từ canh trường lên men ở tỷ lệ pha loãng 20 lần là thích hợp.

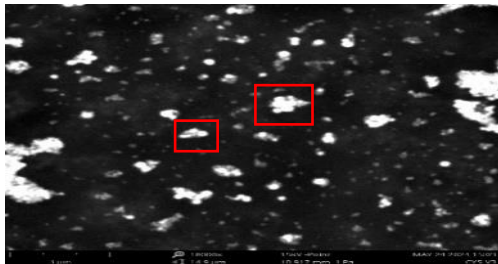
**Một số tính chất đặc trưng của nano bạc (AgNPs)**

**Ảnh SEM:** Các hình ảnh SEM ban đầu cho thấy, hình thái bề mặt và thành phần nguyên tố của AgNP được sinh tổng hợp từ chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3. Kết quả cho thấy các AgNPs hình cầu sắp xếp thành từng cụm do sự kết tụ của các hạt nhỏ hơn sau khi ly tâm tốc độ cao trong quá trình chuẩn bị mẫu. Sự kết tụ nhẹ của các hạt nano dựa trên kim loại đã được quan sát thấy trên ảnh SEM (Hình 5) (Rajivgandhi *et al.*, 2021).

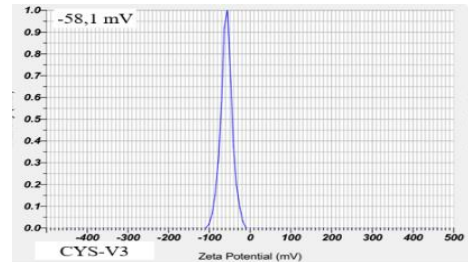
**Phân bố hạt:** Kích thước hạt nano bạc tạo ra càng nhỏ làm tăng diện tích tiếp xúc bề mặt, đặc biệt quan trọng trong quá trình diệt khuẩn, nấm và sâu bệnh hại. Tại (Hình 7) kích thước hạt nano bạc được phân bố từ 28 nm ~ 120 nm.

**Điện thế zeta:** Trong hệ sản phẩm dạng lỏng, thế zeta thường được sử dụng như là một ngưỡng để đánh giá cho sự ổn định. Điện thế zeta thể hiện mức độ đẩy giữa các hạt tích điện cùng dấu gần nhau trong hệ phân tán. Đối với các phân tử và các hạt đủ nhỏ, thế zeta cao (âm hoặc dương) sẽ cho độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ, kết đám. Tại thời điểm 72 giờ (Hình 6) sau phản ứng tạo hạt nano bạc, điện thế zeta là -58,1 mV. Như vậy, với kết quả đo được điện thế zeta khá tốt ưu, theo một số nghiên cứu được công bố thế zeta của nano bạc âm hoặc dương từ 25 - 26 mV đã cho thấy độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ, kết đám (Hồ Đình Quang *et al.*, 2020).

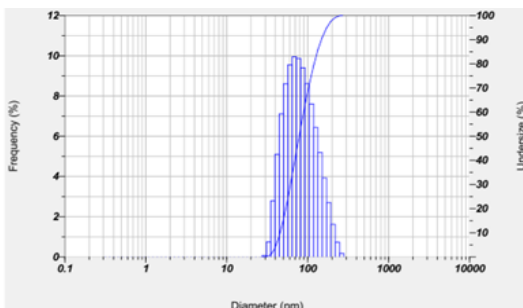
**Cấu trúc và vi cấu trúc của nano bạc (XRD):** Giản đồ XRD của nano bạc tạo thành ở điều kiện tối ưu được trình bày trên (Hình 8). Kết quả từ giản đồ XRD cho thấy có xuất hiện các giá trị góc nhiễu xạ  $2\theta$  là 27,81°; 32,16°; 38,12°; 46,21°; 54,83° và 57,39° tương ứng với các mặt (210), (122), (111), (231), (142) và (241) của cấu trúc lập phương tâm mặt trùng khớp với phổ chuẩn của Ag (JCPDS, file No. 04-0783). Kết quả này chứng tỏ các hạt nano bạc tạo ra trong nghiên cứu này có cấu trúc tinh thể.



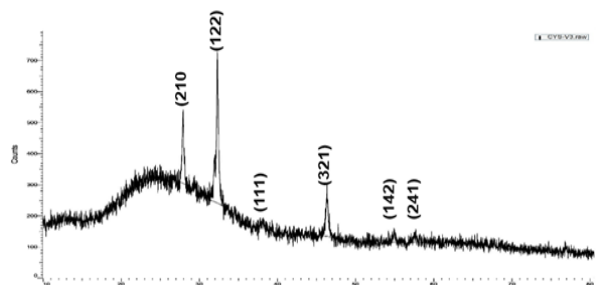
Hình 5. Ảnh của nano Ag qua kính hiển vi điện tử quét (SEM)



Hình 6. Điện thế zeta tại 72 giờ phản ứng

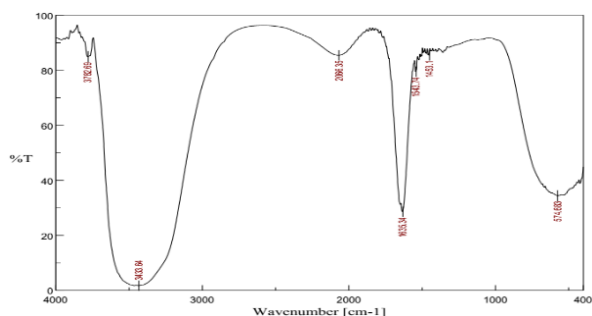


Hình 7. Phân bố hạt nano bạc

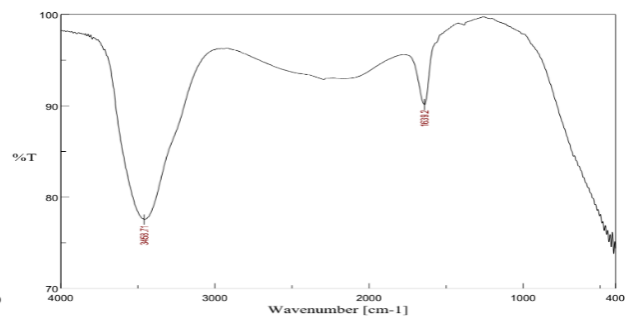


Hình 8. Giản đồ nhiễu xạ của nano Ag

**Phổ hồng ngoại (IR):** của nano bạc tạo thành ở điều kiện tối ưu được trình bày trên (Hình 9 và 10). Kết quả từ phổ IR của dịch canh trường ở (Hình 9) cho thấy có xuất hiện các peak đặc trưng của các nhóm -NH (3782,68  $\text{cm}^{-1}$ ), -OH (3433,64  $\text{cm}^{-1}$ ), -CH (2065,35  $\text{cm}^{-1}$ ), -CO (1635,34  $\text{cm}^{-1}$ ; 1543,74  $\text{cm}^{-1}$  và 1453,1  $\text{cm}^{-1}$ ). Tuy nhiên, phổ IR dung dịch nano bạc tại (Hình 10) chỉ xuất hiện các giải hấp thụ của các nhóm chức -OH (3463,71  $\text{cm}^{-1}$ ) còn lại một ít nhóm chức -CO (1635,2  $\text{cm}^{-1}$ ), kết quả này chứng tỏ các gốc bị mất đã tham gia phản ứng với bạc nitrat tạo ra các hạt nano bạc ở nghiên cứu này (Huang *et al.*, 2007).



Hình 9. Phổ hồng ngoại của canh trường lên men của vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3



Hình 10. Phổ hồng ngoại của nano Ag tạo ra từ chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3

## KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất thu thập tại vườn Quốc gia Chư Yang Sin, 15 chủng vi sinh vật đã được phân lập. Trong đó, tuyển chọn được chủng vi khuẩn CYS-V3 có tiềm năng sinh tổng hợp nano bạc. Chủng này được định danh là *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 theo phương pháp sinh học phân tử. Điều kiện tạo nano bạc thích hợp đã được nghiên cứu và đặc tính của hạt nano bạc được xác định thông qua phân tích quang phổ UV-VIS, hình SEM, TEM, thế zeta, XRD và IR. Kết quả phân tích cho thấy nano bạc tổng hợp được trong nghiên cứu này có dạng hình cầu, phổ UV-VIS hấp thụ trong khoảng 420 - 470 nm, vùng phân bố hạt nano từ 28 ~ 120 nm, có độ bền cao với thế Zeta -58,1 mV.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexander JW (2009). History of the medical use of silver. *Surgical infections*. 10:289-292.
- Ajith P, Murali AS, Sreehari H, Vinod BS, Anil A, Smitha CS. Green synthesis of silver nanoparticles using *Calotropis gigantea* extract and its applications in antimicrobial and larvicidal activity. *Mater Today Proc*. 2019;18:4987-91. doi: 10.1016/j.matpr.2019.07.491.
- Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM (2013). Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical reviews*. 113, 4708-4754.
- Dong XY, Gao ZW, Yang KF, Zhang WQ, Xu LW (2015). Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals. *Catalysis Science & Technology*. 5, 2554-2574.
- Nguyễn Lâm Dũng (2003). *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục. 517 tr.
- Kalimuthu K, Babu RS, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 150-153.
- Hồ Đình Quang, Chu Thị Thùy Dung, Nguyễn Thị Quỳnh Giang, Nguyễn Hoa Du, Lê Thế Tâm (2020). "Nghiên cứu chế tạo nano bạc - chitosan theo phương pháp bọc in-situ định hướng làm chế phẩm phòng bệnh trên cây trồng", *Tạp chí khoa học*, Tập 49 - Số A/2020, tr. 51-59.
- Solanki P, Bhargava A, Chhipa H, Jain N, and Panwar J (2015). Nano-fertilizers and Their Smart Delivery System. (*Chapter 4*), in *Nanotechnologies in Food and Agriculture*, 81-101.
- Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, He N, Hong J and Chen C (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 18 105104.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, Vol. 173, no. 2, pp. 697-703.
- Dandapat S, Kumar M, Ranjan R, Sinha MP (2022). *Ganoderma applanatum* extract mediated synthesis of silver nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.* 58, e19173. doi.org/10.1590/s2175-97902022e19173.
- Rajivgandhi GN, Ramachandran G, Kanisha CC, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Alanzi KF, Li WJ (2021). Effect of Ti and Cu doping on the structural, optical, morphological and anti-bacterial properties of nickel ferrite nanoparticles. *Results Phys*. 23:104065. doi: 10.1016/j.rinp.2021.104065.
- Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol*. 16, 14 https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5.

## BIOSYNTHESIS OF SILVER NANO PARTICLES VIA FERMENTATION TECHNOLOGY USING *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS* CYS-V3–A BACTERIAL STRAIN ISOLATED AT CHU YANG SINH NATIONAL PARK

Do Van Chung<sup>1</sup>, Phan Tu Quy<sup>3</sup>, Ho Nhat Duoc<sup>2</sup>, Nguyen Thi Huyen<sup>2</sup>, Nguyen Van Bon<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Western Highlands Agriculture and Forestry science Institute (WASI)

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, Dak Lak, Vietnam

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Tay Nguyen University, Dak Lak, Vietnam

### SUMMARY

Green nanotechnology is a simple, easy-to-implement, and reproducible method that provides nanoparticles with stable properties and good dispersion in aqueous solutions. Silver nanoparticles can be effectively synthesized by microorganisms. The goal of this study is to isolate and select bacterial strains to biosynthesize silver nanoparticles using fermentation technology. Among 15 microbial strains isolated from Chu Yang Sinh National Park, bacterial strain CYS-V3 was discovered and selected as a potential strain capable of biosynthesizing silver nanoparticles. Based on the 16S gene sequencing method, this strain was identified as *Acinetobacte nosocomialis* CYS-V3 with 99,93% similarity. In particular, the ability to biosynthesize nanosilver from this bacterium is a new record. Appropriate nanoparticle creation conditions were determined in terms of AgNO<sub>3</sub> solution (concentration 2 mM) mixed with fermentation broth (diluted 5%) at a ratio of 3:1 and the reaction time was 35 hours. Nanoparticle properties were determined through UV-VIS spectroscopy, SEM, XRD spectrum, IR spectrum and Zeta potential. The results show that the silver nanoparticles synthesized in this study have a spherical shape, the absorption UV-VIS spectrum is 420 - 470 nm, and the nanoparticle distribution area is from 28 ~ 120 nm, have high stability with a Zeta potential -58.1 mV.

**Keywords:** *Acinetobacter nosocomialis*, Indigenous bacteria, green synthesis; silver nanoparticles.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0842458283 Email: nvbon@ttn.edu.vn

## ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SẤY THĂNG HOA SẢN PHẨM SỮA CHUA BỔ SUNG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO LÊN MEN BỞI *Lactobacillus* spp.

Võ Sông Hương<sup>1</sup>, Trương Phước Thiên Hoàng<sup>2</sup>, Võ Trần Quốc Thắng<sup>2</sup>,  
Lê Hồ Thanh Thảo<sup>1</sup>, Lê Phước Thọ<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Sinh học, Trường đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>3</sup>Công ty TNHH Bio Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

### TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. và nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) được bổ sung vào quá trình lên men sữa chua nhằm gia tăng giá trị và lợi ích của sữa chua. Công nghệ sấy thăng hoa cũng được áp dụng để tạo ra các trạng thái mới cho sữa chua, nhằm mang lại trải nghiệm mới lạ cho người tiêu dùng. Khảo sát khả năng sinh acid lactic của 7 chủng *Lactobacillus* spp. (kí hiệu từ SH1 đến SH7) cho thấy các chủng SH1, SH6, và SH7 có khả năng sinh acid lactic cao với hàm lượng lần lượt là 2,04 mg/mL, 1,98 mg/mL và 1,81 mg/mL. Các chủng này được xác định là *Lactobacillus plantarum* thông qua định danh sinh học phân tử. Các chủng SH1, SH6, SH7 được ủ tăng sinh trong môi trường MRS broth, sau 24 giờ đạt mật số cao lần lượt là  $5,27 \times 10^9$ ;  $6,7 \times 10^9$ ;  $8,8 \times 10^{10}$  CFU/mL. Sau đó, lên men 3 chủng *Lactobacillus* spp. (tỷ lệ 0,5% và 1%) với sữa chua thương mại và bổ sung đông trùng hạ thảo (0,1% - 0,5%). Kết quả cho chủng SH1 tạo sữa chua mịn, kết khối dạng gel ở tỷ lệ bổ sung 0,5% sau 12 giờ lên men. Đánh giá cảm quan sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo 0,3% được ưa thích nhất đạt 4,2 điểm (mùi hương, vị, cấu trúc và màu sắc). Khảo sát đặc tính sinh học của sữa chua cho khả năng kháng oxy hóa đạt chỉ số IC<sub>50</sub> là 16,43 mg/mL và không có khả năng ức chế chủng *Escherichia coli* và *Salmonella* spp.. Sữa chua được làm đông ở -30°C, sấy thăng hoa ở 40°C trong môi trường chân không áp suất dưới 500 mTorr, sau đó sấy khan ở 45°C cho mật số vi khuẩn *Lactobacillus* spp. là  $1,3 \times 10^7$  CFU/g, với hàm lượng adenosine là 23,9 mg/kg và cordycepin 29,0 mg/kg. Sữa chua sấy thăng hoa đạt các chỉ tiêu an toàn về vi sinh nằm trong mức cho phép theo TCVN 7030:2016 và phù hợp với thị hiếu người tiêu dùng, mức ưa thích đạt 4,1/5,0 điểm.

**Từ khóa:** Đông trùng hạ thảo, *Lactobacillus* spp., kháng oxy hóa, sấy thăng hoa, sữa chua.

### MỞ ĐẦU

Sữa chua được biết đến không chỉ là món ăn ngon miệng mà còn mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe, cung cấp nguồn canxi dồi dào giúp duy trì sức khỏe của xương và răng. Đồng thời, sữa chua chứa hàng triệu lợi khuẩn giúp tăng cường hệ miễn dịch đường ruột, hỗ trợ hệ tiêu hóa và hỗ trợ giảm các nguy cơ mắc nhiều bệnh bao gồm cả béo phì (Ashraf *et al.*, 2022). Người tiêu dùng ngày càng nhận thức về giá trị và đẩy mạnh tiêu thụ sản phẩm bổ dưỡng này. Theo Statista thống kê năm 2023, doanh thu thị trường sữa chua toàn cầu đang trên đà tăng trưởng và dự kiến đạt 181,3 tỷ USD vào năm 2024. Nhu cầu gia tăng đã đặt ra nhiều cuộc cạnh tranh giữa các nhà sản xuất về hương vị, kết cấu, công dụng và chất lượng sản phẩm.

Mặt khác, công nghệ sấy thăng hoa là công nghệ tiên tiến được ứng dụng rộng rãi trong ngành thực phẩm những năm gần đây. Quá trình sấy thăng hoa bao gồm 3 bước: làm đông lạnh, sấy sơ cấp và sấy thứ cấp. Đầu tiên nguyên liệu được đông lạnh khi đông băng hoàn toàn, sau đó giảm áp suất môi trường xuống mức phù hợp và bắt đầu nâng nhiệt (-30°C đến 35 - 40°C). Giữ nguyên áp suất - nhiệt độ (35 - 40°C) sẽ tạo ra chênh lệch áp suất rất lớn trong lòng vật liệu sấy và qua đó hình thành dòng ẩm chuyển động từ trong lòng vật liệu sấy ra ngoài bề mặt (Nguyễn Tấn Dũng, 2016). Sấy thăng hoa giúp bảo quản các thành phần không bền với nhiệt (protein, hương vị và màu sắc), vẫn giữ được hình dạng và kích thước ban đầu. Trong khi sấy nhiệt thông thường sử dụng nhiệt độ cao làm thay đổi cấu trúc bên ngoài, đồng thời biến tính các thành phần dinh dưỡng quan trọng như enzyme. Đối với sữa chua sấy thăng hoa, không chỉ lưu giữ được các thành phần dinh dưỡng quan trọng và vi khuẩn có lợi, mà còn nâng cao vị giác. Ngoài ra, sản phẩm có thời gian bảo quản dài và người tiêu dùng không phải lo lắng về nhiệt độ bảo quản. Sữa chua thường được lên men bởi các chủng *Lactobacillus bulgaricus* và *Lactobacillus casei*, gần đây các chủng tiềm năng khác như *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* đang được nghiên cứu, ứng dụng rộng rãi hơn trong sản xuất thực phẩm (Gholamhosseinpour *et al.*, 2024). Xu hướng thị trường ngày càng chú trọng độ an toàn và ưa chuộng các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên đã thúc đẩy việc bổ sung các thành phần như đông trùng hạ thảo vào sữa chua.

Đông trùng hạ thảo được coi là dược liệu quý trong quan niệm của người châu Á, thường được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền phương Đông. Nấm đông trùng hạ thảo được đánh giá cao về giá trị dược liệu vì chứa các hợp chất như cordycepin, adenosine, có hoạt tính kháng oxy hóa, chống lão hóa, tính kháng viêm và khả năng kháng ung thư (Yu *et al.*, 2016). Hơn nữa, nhiều hợp chất sinh học có giá trị cao như cordycepin, ergosterol, myriocin, polysaccharides và vitamin tổng hợp đã được tách chiết và ứng dụng rộng rãi.

Nhằm mục đích mang lại trải nghiệm cho người tiêu dùng về sản phẩm sữa chua dạng sậy, tăng giá trị sản phẩm sữa. Đồng thời, nhận thấy lợi ích đông trùng hạ thảo mang lại và tiềm năng ứng dụng các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. trong chế biến thực phẩm. Từ những thực tiễn trên, đề tài “Ứng dụng công nghệ sấy thăng hoa sản phẩm sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo lên men bởi vi khuẩn *Lactobacillus* spp.” được tiến hành nghiên cứu. Sản phẩm sữa chua sấy thăng hoa bổ sung đông trùng hạ thảo sẽ có giá trị dinh dưỡng hơn các loại sữa chua khác chế biến từ sữa bò, tạo ra hương vị đặc trưng riêng và góp phần duy trì sức hút của sản phẩm sữa chua trên thị trường.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Các chủng vi sinh vật: *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, nấm men (*Candida albicans*), nấm mốc (*Aspergillus oryzae*) được lưu trữ trong ống stock glycerol 20% tại Phòng Vi sinh Ứng dụng - Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) được cung cấp bởi công ty TNHH Bio Nông Lâm.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Khảo sát khả năng sinh acid lactic của vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

**Phương pháp định tính khả năng phân giải  $\text{CaCO}_3$  trên đĩa thạch** (Nguyễn Ngọc Thạch *et al.*, 2015): các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. thuần được nuôi cấy tăng sinh trong 50 mL môi trường MRS ở 37°C trong 24 giờ. Hút 40  $\mu\text{l}$  dịch khuẩn nhỏ vào giếng đã tạo sẵn trên đĩa môi trường MRS agar (có bổ sung 1%  $\text{CaCO}_3$ , mỗi đĩa 3 giếng và ủ ở 37°C trong 48 giờ). Đo đường kính vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$  trên đĩa thạch. Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức:  $Df = ((D_1 + D_2 + D_3) - 3d)/3$ . Trong đó: D là đường kính vòng  $\text{CaCO}_3$  bị phân giải trên đĩa; d là đường kính lỗ giếng và Df: đường kính vòng phân giải (cm).

**Định lượng khả năng sinh acid lactic bằng phương pháp chuẩn độ Therner** (Phạm Thị Kim Thảo *et al.*, 2018). Sau khi tăng sinh, ly tâm thu 10 mL dịch nổi bổ sung 20 mL nước cất vô trùng và 1 - 2 giọt phenolphthalein (nồng độ 1% trong cồn 96°). Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Công thức tính độ acid:  $^{\circ}\text{T} = V_{\text{NaOH}} \text{ tiêu tốn} \times 10$ , % acid lactic =  $^{\circ}\text{T} \times 0,009$ . Trong đó:  $^{\circ}\text{T}$  là độ Therner (1 $^{\circ}\text{T}$  tương ứng với 9 mg acid lactic); 10: số mL dịch nuôi cấy dùng chuẩn độ.

#### Đánh giá đặc tính sinh học của sữa chua bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus* spp. và đông trùng hạ thảo

**Ủ tăng sinh vi khuẩn *Lactobacillus* spp.:** Tăng sinh *Lactobacillus* spp. trong môi trường MRS lỏng ở 37°C. Theo dõi mật số *Lactobacillus* spp. sau các thời gian ủ tăng sinh 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015).

**Phương pháp chuẩn bị sữa chua cái:** sữa tươi vinamilk (50%), sữa đặc (25%), nước (25%), gelatin 0,3% (w/v). Thanh trùng hỗn hợp dịch sữa ở 85°C trong 15 phút và làm nguội đến nhiệt độ 43°C (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015). Giống vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được tăng sinh, ly tâm dịch tăng sinh khuẩn 6000 vòng/phút trong 5 phút. Thêm nước cất từ 2 - 3 lần để loại bỏ hoàn toàn môi trường MRS, sinh khối thu được sẽ hoà với nước cất. Lên men cái lần 1: hút cho 1 mL dịch khuẩn vào 200 mL hỗn hợp dịch sữa. Lên men ở 37°C trong thời gian cho mật độ tốt nhất ở đến khi đạt lượng acid lactic đạt pH 4,6 (Nagaoka, 2019). Lên men cái lần 2: lấy 0,5% sữa chua cái lần 1 bổ sung vào 200 mL hỗn hợp dịch sữa. Lên men ở 37°C trong thời gian thí nghiệm ở lên men cái lần 1, sau đó bảo quản ở tủ mát 4°C.

**Khảo sát cảm quan người tiêu dùng đối với hàm lượng đông trùng hạ thảo bổ sung vào sữa chua** (Hà Duyên Tư, 2010): men cái lần 2 sẽ được phối trộn (tỷ lệ phối trộn 0,5% và 1%) cùng hỗn hợp dịch sữa và sữa chua cái thương mại (10%). Đông trùng hạ thảo được xay nhuyễn, hấp cách thuỷ và bổ sung theo tỷ lệ 0,1%; 0,3%; 0,5% vào sữa chua lên men. Đánh giá cảm quan sản phẩm dựa trên thang Hedonic 9 điểm, bao gồm màu sắc, vị, mùi hương và trạng thái.

**Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh đường ruột của sữa chua:** sữa chua được chọn sau đánh giá cảm quan sẽ pha trong nước cất vô trùng ở nồng độ 0,5 g/mL. Ngâm đĩa giấy whatman (6mm) trong dung dịch mẫu đã pha và kháng sinh. Hơ nóng đồ kẹp gấp rồi để nguội, gấp các đĩa giấy đặt lên môi trường thạch LB đã cấy trang chủng vi khuẩn bệnh *E. coli*, *Salmonella* spp.. Sau đó ủ 37°C trong 24 giờ, thực hiện thí nghiệm lặp lại 3 lần. Đọc kết quả và xác định đường kính kháng khuẩn. Đường kính vòng vô trùng  $D < 1$  mm không kháng, đường kính vòng vô trùng  $1 \text{ mm} \leq D < 5$  mm kháng yếu, đường kính vòng vô trùng  $6 \text{ mm} \leq D < 10$  mm kháng trung bình, đường kính vòng vô trùng  $D \geq 10$  kháng mạnh.



**Khảo sát khả năng chống oxy hóa:** phương pháp thử nghiệm gốc tự do DPPH (1,1 – Diphenyl – 2 picrylhydrazyl) (Júnior *et al.*, 2023). Sữa chua hoà tan vào ethanol đến nồng độ 100 mg/mL, ly tâm thu dịch. Bổ sung 1 mL dung dịch DPPH (0,1 mM, pha trong ethanol 99,5%) vào ống nghiệm chứa 4 mL dung dịch sữa chua ở các nồng độ 5 mg/mL, 10 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL và 25 mg/mL. Ủ trong vòng 30 phút ở điều kiện không có ánh sáng, tiến hành đo mật độ quang OD ở bước sóng 517 nm. Tính phần trăm bắt gốc tự do được tính theo công thức:

$$SA_{DPPH} (\%) = ((1 - Abs \text{ mẫu}) / Abs \text{ đối chứng}) \times 100$$

Trong đó:  $SA_{DPPH} (\%)$  là tỷ lệ bắt gốc tự do (Scavenging Activity) của mẫu nghiên cứu; Abs mẫu là mật độ quang của mẫu khảo sát; Abs đối chứng là mật độ quang của dung dịch DPPH.

**Ứng dụng công nghệ sấy thăng hoa tạo viên sữa chua**

Mẫu sữa chua bổ sung đồng trùng hạ thảo sẽ được cho vào khuôn tạo viên vuông, viên trái tim và viên hình sao. Sau đó sẽ được đưa vào buồng máy sấy thăng hoa được cấp đông ở - 30°C trong 90 phút để đông băng sữa chua hoàn toàn. Máy sấy thăng hoa tạo môi trường chân không trong buồng sấy bằng cách giảm áp suất về dưới 500 mTorr trong 45 phút. Tiến hành sấy thăng hoa ở nhiệt độ 40°C. Thí nghiệm được thiết kế khảo sát nhiệt độ sấy khan 40°C, 43°C, 45°C, 50°C để thu nhận sản phẩm sữa chua ở trạng thái rắn. Chỉ tiêu theo dõi là mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. và xác định tỷ lệ nước trong sữa chua ban đầu biểu thị bằng (%) theo khối lượng.

**Các chỉ tiêu vi sinh vật trong sữa chua:** theo quy định Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7030:2016 về Sữa lên men (năm 2016).

**Bảng 1. Giới hạn vi sinh vật trong sản phẩm**

Chỉ tiêu	Giới hạn	
	Sữa lên men	Sữa chua, sữa chua dùng chủng thay thế, sữa acidophilus
<i>E. coli</i>	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử
<i>Salmonella</i> spp.	Không phát hiện trong 25 mL hoặc 25 g mẫu thử	Không phát hiện trong 25 mL hoặc 25 g mẫu thử
<i>Coliforms</i>	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử
<i>S. aureus</i>	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử
Nấm men, nấm mốc	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử

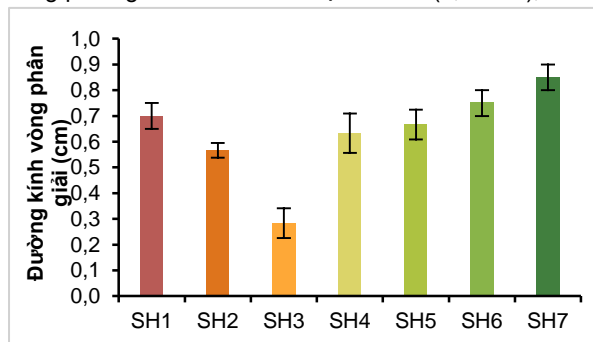
**Xác định hàm lượng hoạt chất trong sữa chua:** sữa chua bổ sung đồng trùng hạ thảo sẽ được phân tích 2 hoạt chất cordycepin và adenosine bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Mẫu sẽ được gửi cho công ty cổ phần công nghệ Vietlabs phân tích theo phương pháp thử VLAB-CH-TP-687:2022.

**Khảo sát thị hiếu người tiêu dùng (Hà Duyên Tư, 2010):** sản phẩm được đánh giá cảm quan dựa trên thang Hedonic 9 điểm: đánh giá về cấu trúc (giòn, xốp) màu sắc, vị ngọt hoặc vị chua, mùi hương, hình dạng (hình khối vuông). Đồng thời, khảo sát thị hiếu 60 người tiêu dùng ưa thích sản phẩm của 3 nhóm độ tuổi (10 - 16; 17 - 25; 26 trở lên).

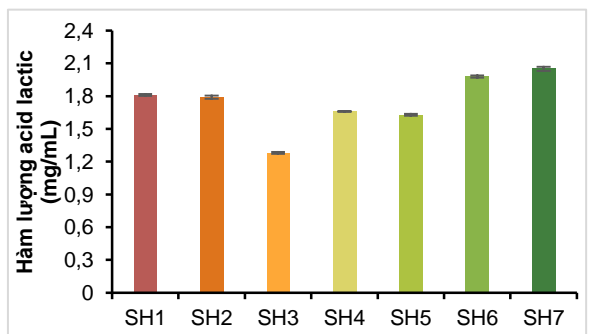
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Kết quả khảo sát khả năng sinh acid lactic của vi khuẩn *Lactobacillus* spp.**

Sau 48 giờ ủ, tất cả các chủng đều có khả năng sinh acid và phân giải CaCO<sub>3</sub> trên đĩa thạch. Kết quả chủng có vòng phân giải lớn nhất lần lượt là SH7 (0,85 cm), SH6 (0,75 cm), SH1 (0,7 cm).



**Hình 1. Khả năng sinh acid lactic các chủng**



**Hình 2. Hàm lượng sinh acid lactic các chủng**

Trên cơ sở kết quả định tính khả năng sinh acid lactic, tiến hành định lượng acid lactic cho kết quả các chủng SH7, SH6, SH1 có hàm lượng acid lactic sinh ra cao nhất lần lượt là 2,04 mg/mL, 1,98 mg/mL và 1,81 mg/mL. Kết quả ghi nhận ở cùng 48 giờ tăng sinh tương đồng với nghiên cứu của Phạm Thị Kim Thảo và đồng tác giả (2018) (Phạm Thị Kim Thảo *et al.*, 2018). Trong quá trình sinh trưởng, *Lactobacillus* spp. chuyển hóa đường thành acid lactic thông qua con đường Embden - Meyerhof - Parnas (EMP). Ngoài ra, *Lactobacillus* còn sản xuất acid lactic theo con đường pentose - phosphate oxy hóa (PPO) (lên men dị hình). Như vậy, các chủng SH1, SH6, SH7 có tiềm năng ứng dụng cao trong lên men.

**Đánh giá đặc tính sinh học của sữa chua bổ sung *Lactobacillus* spp. và đông trùng hạ thảo**

**Ủ tăng sinh vi khuẩn *Lactobacillus* spp.**

Sau 24 giờ tăng sinh ở nhiệt độ 37°C các chủng SH1, SH6, SH7 đạt mật số cao nhất lần lượt là  $5,27 \times 10^9$  CFU/mL;  $6,7 \times 10^9$  CFU/mL;  $8,8 \times 10^{10}$  CFU/mL (bảng 2). Kết quả mật độ tế bào vi khuẩn tăng sinh ở 24 giờ cao hơn so với các thời điểm 16 giờ, 48 giờ, 72 giờ. Nghiên cứu của Đoàn Anh Dũng và đồng tác giả (2015) cũng cho thấy tăng sinh *L. plantarum* đạt mật số cao nhất ở 24 giờ (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015). Như vậy, ủ tăng sinh 24 giờ ở 37°C là phù hợp để thu sinh khối vi khuẩn lên men sữa.

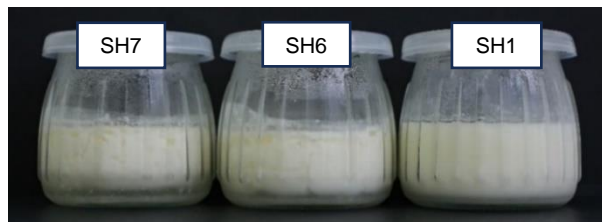
**Bảng 2. Mật độ tế bào các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. chọn lọc**

Ký hiệu chủng	Mật độ khuẩn (Log10 CFU/mL)			
	16 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
SH1	9,09 <sup>b</sup> ± 0,00	9,72 <sup>a</sup> ± 0,06	8,18 <sup>c</sup> ± 0,03	7,22 <sup>d</sup> ± 0,01
SH6	9,29 <sup>b</sup> ± 0,02	9,83 <sup>a</sup> ± 0,02	7,76 <sup>c</sup> ± 0,05	7,17 <sup>d</sup> ± 0,01
SH7	9,91 <sup>b</sup> ± 0,01	10,94 <sup>a</sup> ± 0,02	8,61 <sup>c</sup> ± 0,05	6,92 <sup>d</sup> ± 0,02

Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

**Lên men sữa chua cái**

Khi bổ sung khuẩn *Lactobacillus* spp. tỷ lệ 0,5% và 1% lên men cùng sữa chua cái thương mại cho kết quả sữa chua bổ sung chủng SH1 sau 12 giờ lên men có khả năng tạo thành khối đặc, mịn, không tách nước. Tuy nhiên, ở tỷ lệ 1% chủng SH1 sữa chua bị tách nước nhẹ do sự gia tăng mật số của SH1 nhanh hơn sữa chua cái thương mại. Hàm lượng acid lactic trong sữa chua đạt pH 4,6 thì sữa đông tụ tạo khối (Nagaoka, 2019) nhưng *L. plantarum* (SH1) chuyển hóa acid lactic theo con đường pentose - phosphate nên acid lactic sinh ra chỉ đạt 50%, kèm theo ethanol sinh ra ảnh hưởng đến mùi hương và tách nước. Bên cạnh đó, *L. bulgaricus* làm chủ quá trình lên men khi sữa chua đạt pH 4,2 - 4,4; sản sinh acid lactic theo con đường EMP (acid lactic chiếm 90% sản phẩm sinh ra), giảm pH xuống 4,5 - 4,6 và sữa đông tụ. Theo nghiên cứu của Đoàn Anh Dũng và đồng tác giả (2015) với tỷ lệ 6% chủng *L. plantarum* kết hợp cùng men khô thương mại cho độ cứng sản phẩm tốt, nhưng bổ sung 8% thì độ cứng giảm (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015). Vì vậy, tỷ lệ bổ sung chủng vi khuẩn SH1 (*L. plantarum*) ở 0,5% là phù hợp để tạo sản phẩm sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo.

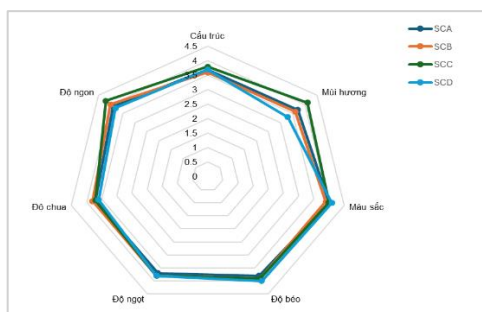


**Hình 3. Lên men cái với tỷ lệ khuẩn *Lactobacillus* spp. 0,5%**

**Khảo sát cảm quan người tiêu dùng đối với hàm lượng đông trùng hạ thảo bổ sung vào sữa chua**

Sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo theo các tỷ lệ có màu vàng nhạt ở tỷ lệ 0,5%, cấu trúc dạng gel sệt, mịn và mùi hương dễ chịu. Mức độ ưa thích sản phẩm được khảo sát với sự tham gia 60 người tiêu dùng đánh giá 7 thuộc tính, sữa chua bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo (SCC) được người tiêu dùng ưa thích ở tất cả các thuộc tính (độ ngon đạt 4,2 điểm),

kế đến là sữa chua bổ sung 0,1% đông trùng hạ thảo, xếp sau cùng là sữa chua bổ sung 0,5% đông trùng hạ thảo (Hình 4).



Hình 4. Cảm quan người tiêu dùng về sữa chua

Bảng 3. Mức độ ưa thích sản phẩm theo giới tính

Sản phẩm	Nam	Nữ
SCA*	3,9 ± 0,81	3,9 ± 0,76
SCB*	4,0 ± 0,72	3,9 ± 0,74
SCC*	4,3 ± 0,69	4,1 ± 0,66
SCD*	4,0 ± 0,64	3,8 ± 0,7

\* SCA sữa chua không bổ sung đồng trùng hạ thảo.

\* SCB sữa chua bổ sung 0,1% đồng trùng hạ thảo.

\* SCC sữa chua bổ sung 0,3% đồng trùng hạ thảo.

\* SCD sữa chua bổ sung 0,5% đồng trùng hạ thảo.

Xét ở giới tính, sự khác biệt mức ưa thích sản phẩm không khác biệt đối với 4 sản phẩm sữa chua (nam chiếm 37% tổng số người tiêu dùng). Dựa vào bảng 3 và hình 4, cho thấy tất cả người tiêu dùng đều ưa chuộng mẫu sữa chua bổ sung đồng trùng hạ thảo 0,3% và không khác biệt độ ưa thích về giới tính.

### Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh đường ruột của sữa chua

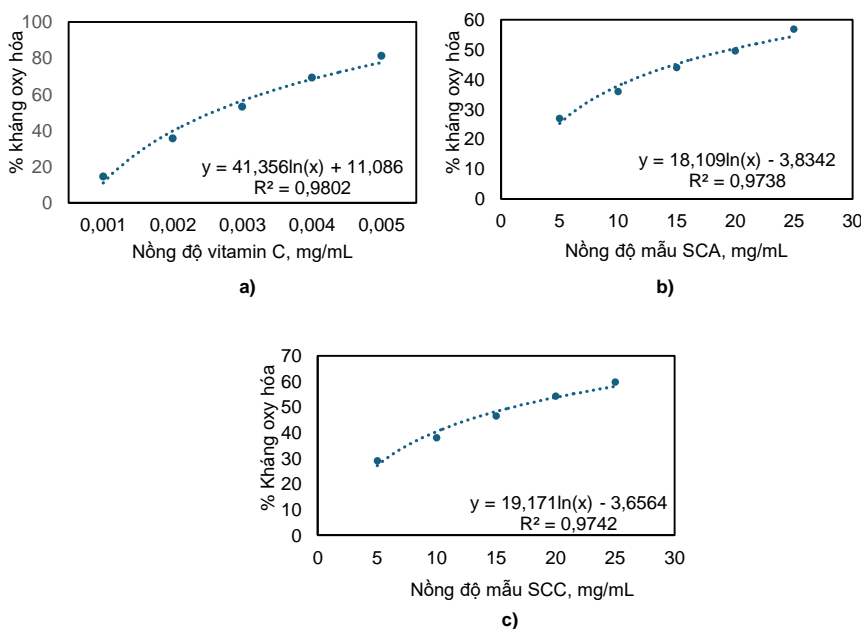
Khảo sát khả năng kháng khuẩn của sữa chua bổ sung 0,3% đồng trùng hạ thảo thực hiện trên 2 chủng vi khuẩn là *E. coli* và *Salmonella* spp. cho kết quả hoạt tính kháng khuẩn của sữa chua không hiệu quả đối với việc ức chế 2 chủng vi sinh vật đã thử nghiệm (bảng 4). Gholamhosseinpour và đồng tác giả (2024) khi thực hiện thêm *E. coli* ở mật độ  $1,2 \times 10^4$  -  $1,6 \times 10^6$  CFU/mL vào sữa và ủ cùng *L. plantarum*. Sau 8 giờ lên men (40°C) mật số vi khuẩn *E. coli* giảm đáng kể. Sữa chua không chỉ chứa hàm lượng acid lactic cao, mà còn chứa một số chất chuyển hóa khác (bacteriocin, diacetyl) cũng tham gia kháng khuẩn (Gholamhosseinpour et al., 2024). Do đó cần thực hiện thí nghiệm để khảo sát thêm về khả năng này khi bổ sung thêm đồng trùng hạ thảo và chủng *L. plantarum*.

Bảng 4. Vòng kháng vi sinh vật của sữa chua đồng trùng hạ thảo

VSV	Đường kính trung bình (mm)	Kết luận
<i>E. coli</i>	6,00 ± 0,00	Không kháng
<i>Salmonella</i> spp.	6,00 ± 0,00	Không kháng

### Khảo sát khả năng chống oxy hóa

Khả năng kháng oxy hóa bằng xác định bằng giá trị IC<sub>50</sub>, kết quả cho giá trị IC<sub>50</sub> của sữa chua là 19,55 mg/mL chứng tỏ sữa chua có khả năng chống oxy hóa (hình 5). Khả năng chống oxy của sữa chua có được nhờ quá trình thủy phân các thành phần sữa của vi khuẩn *Lactobacillus* spp..



Hình 5. Đồ thị biểu diễn % kháng oxy hóa của vitamin C và mẫu sữa chua

(a) Vitamin C, (b) Sữa chua (SCA), (c) Sữa chua bổ sung 0,3% đồng trùng hạ thảo (SCC).

Khi bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo, sữa chua có giá trị IC<sub>50</sub> giảm xuống còn 16,43 mg/mL. Đồng thời, giá trị IC<sub>50</sub> của vitamin C là 2,56 µg/mL, đây là một chất oxy hóa mạnh, vì vậy giá trị IC<sub>50</sub> càng thấp thì khả năng kháng oxy hóa càng mạnh. Ở nghiên cứu của Lê Thị Lan Thảo (2023), khi bổ sung 9% bột đông trùng hạ thảo vào viên hoàn kết hợp với nghệ vàng đã thể hiện khả năng chống oxy hóa cao nhất có giá trị IC<sub>50</sub> bằng 6,1 mg/mL (Lê Thị Lan Thảo, 2023). Kết quả trên chỉ ra đông trùng hạ thảo đã bổ sung thêm một số hoạt chất chống oxy hóa như cordycepin và polysaccharide cho sữa chua, từ đó ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm và giúp nâng cao giá trị kinh tế của sản phẩm sữa chua.

**Ứng dụng công nghệ sấy thăng hoa tạo viên sữa chua**

**Mật độ vi khuẩn sau sấy thăng hoa**

Khối lượng sữa chua trước khi sấy thăng hoa là 620 g và sau khi sấy thu lại được 316 g. Như vậy, hàm lượng nước trong sữa chua ban đầu chiếm 49% tổng khối lượng. Sau khi lên men sữa chua, mật số vi sinh đạt 1,1 x 10<sup>8</sup> CFU/mL. Tiến hành khảo sát sấy thăng hoa ở nhiệt độ sấy khan 40°C, 43°C, 45°C, 50°C để thu nhận sản phẩm sữa chua ở dạng viên.

**Bảng 5. Mật số vi khuẩn sau sấy thăng hoa**

Nhiệt độ sấy	Mật độ vi khuẩn (Log10 CFU/g)
40°C	7,25 <sup>a</sup> ± 0,55
43°C	7,23 <sup>a</sup> ± 0,55
45°C	7,12 <sup>a</sup> ± 0,55
50°C	5,53 <sup>b</sup> ± 0,03

**Bảng 6. Các chỉ tiêu vi sinh vật trong sữa chua sấy**

Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
<i>E. coli</i>	CFU/g	Không phát hiện
<i>Salmonella</i> spp.	CFU/25g	Không phát hiện
<i>Coliforms</i>	CFU/g	Không phát hiện
<i>S.aureus</i>	CFU/g	Không phát hiện
Nấm men, nấm mốc	CFU/g	Không phát hiện

*Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% (α = 0,05).*

Mật độ vi khuẩn của sữa chua sau khi sấy không chênh lệch nhiều đối với nhiệt độ 40°C, 43°C, 45°C (1,7 x 10<sup>7</sup> CFU/g, 1,6 x 10<sup>7</sup> CFU/g, 1,3 x 10<sup>7</sup> CFU/g) và đáp ứng tiêu chí mật độ khuẩn có lợi ít nhất đạt 10<sup>7</sup> (Castellone et al., 2021). Vậy nhiệt độ sấy khan ở 45°C là phù hợp nhất khi vẫn giữ mật độ vi sinh đạt 10<sup>7</sup> và thời gian sấy ngắn hơn so với ở nhiệt độ 40 - 43°C. Dựa kết quả bảng 6 cho thấy các vi sinh vật gây bệnh và hư hỏng cho sản phẩm đều không hiện diện trong sữa chua sấy, điều này đảm bảo an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng.

**Hàm lượng hoạt chất trong sữa chua**

Đông trùng hạ thảo ban đầu chứa 3190 mg/kg adenosine và 5507 mg/kg cordycepin, khi bổ sung 0,3% vào sữa chua thì hàm lượng adenosine xấp xỉ 10 mg/kg và 17 mg/kg cordycepin. Sau sấy thăng hoa khối lượng sản phẩm còn lại 51%, nên sữa chua sấy theo lý thuyết sẽ khoảng 20 mg/kg adenosine và 33 mg/kg cordycepin. Thực tế, kết quả phân tích hàm lượng cordycepin và adenosine trong sữa chua sấy lần lượt là 29,0 mg/kg và 23,9 mg/kg. Như vậy, hiệu suất của quá trình phân tích thì hàm lượng adenosine là 115% và cordycepin là 88%. Kết quả cho thấy, không có sự hao hụt đáng kể hai hoạt chất trên trong quá trình lên men và sấy thăng hoa sữa chua. Do vậy, việc bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo vào sữa chua sấy đã giúp tăng thành phần hoạt chất tốt cho người sử dụng, tăng giá trị dinh dưỡng cho sản phẩm.

**Khảo sát thị hiếu người tiêu dùng:**

Khảo sát thị hiếu được thực hiện tại Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM với sự tham gia của 60 người tiêu dùng. Mức độ ưa thích của người tiêu dùng đối với 2 mẫu sữa chua có sự khác biệt (Bảng 7). Sản phẩm sữa chua sấy bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo được chấp nhận nhiều nhất với mức ưa thích đạt 4,08 điểm (tương ứng với mức thích sản phẩm).

**Bảng 7. Thị hiếu người tiêu dùng với sữa chua sấy**

Sản phẩm	Thuộc tính				
	Cấu trúc	Hình dạng	Mùi hương	Vị	Mức ưa thích
Sản phẩm bổ sung ĐTHT	4,10 <sup>a</sup> ± 0,78	3,70 <sup>a</sup> ± 0,7	4,02 <sup>a</sup> ± 0,85	4,50 <sup>a</sup> ± 0,68	4,08 <sup>a</sup> ± 0,44
Sản phẩm thương mại	3,87 <sup>a</sup> ± 0,7	3,47 <sup>b</sup> ± 0,57	3,35 <sup>b</sup> ± 0,6	3,83 <sup>b</sup> ± 0,74	3,63 <sup>b</sup> ± 0,43

*Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% (α = 0,05). ĐTHT: Đông trùng hạ thảo.*

**Bảng 8. Mức ưa thích sữa chua sấy theo độ tuổi**

Sản phẩm	10 - 16 tuổi	17 - 25 tuổi	26 tuổi trở lên
Sản phẩm bổ sung ĐTHT	4,16 <sup>a</sup> ± 0,46	4,08 <sup>a</sup> ± 0,47	4,00 <sup>a</sup> ± 0,39
Sản phẩm thương mại	3,65 <sup>a</sup> ± 0,34	3,63 <sup>a</sup> ± 0,54	3,61 <sup>a</sup> ± 0,39

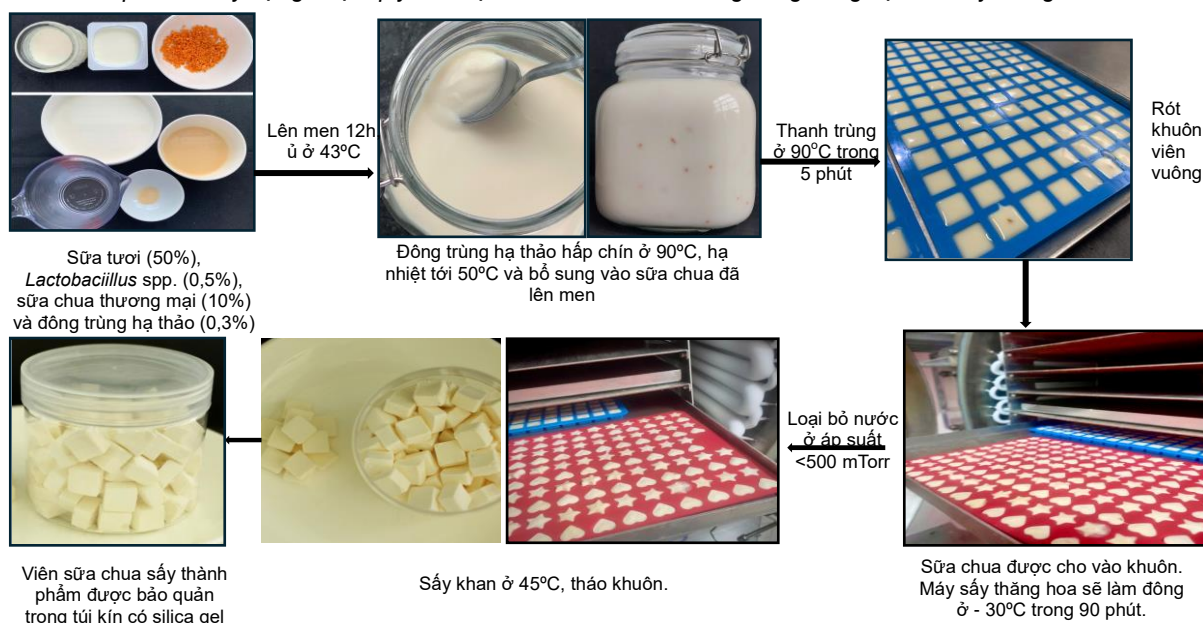
**Bảng 9. Mức ưa thích sữa chua sấy theo giới tính**

Sản phẩm	Nam	Nữ
Sản phẩm bổ sung ĐTHT	4,03 ± 0,37	4,10 ± 0,47
Sản phẩm thương mại	3,76 ± 0,39	3,55 ± 0,43

Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

Đối với khía cạnh độ tuổi, mức ưa thích sản phẩm sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo không chênh lệch nhiều, tuy nhiên ở độ tuổi 10 - 16 tuổi vẫn ưa chuộng sản phẩm nhất (4,16 điểm). Kết quả mức ưa thích sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo theo giới tính không có sự khác biệt nhiều, về sản phẩm thương mại thì nam ưa thích hơn so với nữ (nam chiếm 36,7%). Vậy sản phẩm sữa chua sấy bổ sung đông trùng hạ thảo phù hợp thị hiếu với đa số người tiêu dùng, cả nam và nữ đều ưa thích sản phẩm bao gồm các độ tuổi khác nhau.

Từ các kết quả trên xây dựng được quy trình tạo viên sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo sấy thăng hoa như sau:



**Hình 6. Quy trình tạo viên sữa chua sấy thăng hoa bổ sung đông trùng hạ thảo**

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên cho thấy sữa chua được bổ sung đông trùng hạ thảo (0,3%) và chủng *L. plantarum* cho chất lượng sản phẩm tốt, ổn định, tạo khối sữa chua dẻo mịn, chất lượng cảm quan cao (4,2 điểm) với điều kiện thời gian ủ tăng sinh khuẩn thích hợp lên men sữa ở 24 giờ ( $5,27 \times 10^7$  CFU/mL); bổ sung giống *L. plantarum* tỷ lệ 0,5% với sữa chua cái thương mại là 10%. Sản phẩm sữa chua sấy thăng hoa nguyên vẹn, không bị vỡ, mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. đạt  $1,3 \times 10^7$  CFU/g ở nhiệt độ sấy khan 45°C. Bên cạnh đó, sữa chua sấy chứa hàm lượng cordycepin và adenosine lần lượt là 29,0 mg/kg và 23,9 mg/kg; cũng như tăng khả năng chống oxy hóa (IC<sub>50</sub> đạt 16,43 mg/mL). Như vậy, sữa chua sấy bổ sung đông trùng hạ thảo phù hợp thị hiếu người tiêu dùng, làm phong phú thêm sản phẩm sữa chua hiện có và nâng cao giá trị dinh dưỡng của sữa chua.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashraf SA, Elkhailifa AEO, Ahmad MF, Patel M, Adnan M, Sulieman AME (2022). Probiotic Fermented Foods and Health Promotion. *African Fermented Food Products - New Trends*, Springer, 59 - 88.
- Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B (2021). Eating fermented: Health benefits of LAB-fermented foods. *Foods*, 10: 26 - 39.
- Đoàn Anh Dũng, Nguyễn Công Hà, Lý Nguyên Bình, Lê Nguyễn Đoàn Duy (2015). Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum* trong chế biến sữa chua. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 36: 14-20.

- Gholamhosseinpour A, Hashemi SMB, Safari F, Kerboua K (2024). Impact of ultrasonicated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactiplantibacillus plantarum* AF1 on the safety and bioactive properties of stirred yoghurt during storage. *Ultrasonics sonochemistry*, 102: 106 - 726.
- Hà Duyên Tư (2010). *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Júnior MES, Araújo MVRL, Martins ACS, Lima MS, Silva FLHD, Converti A, Maciel MIS (2023). Microencapsulation by spray-drying and freeze-drying of extract of phenolic compounds obtained from ciriguela peel. *Scientific Reports*, 13(1): 15222.
- Lê Thị Lan Thảo (2023). Nghiên cứu công thức tạo viên hoàn kết hợp nghệ vàng (*Curcuma longa*) và đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*). Khóa luận tốt nghiệp. *Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*.
- Nagaoka S (2019). Yogurt Production. Kanauchi M, Eds. *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols*, 45 - 54.
- Nguyễn Ngọc Thạch, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Thị Việt Trinh, Huỳnh Thị Thu Ba, Bùi Hoàng Đăng Long, Ngô Thị Phương Dung (2015). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic ứng dụng trong lên men sữa chua bổ sung tảo Spirulina. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (40): 8-14.
- Nguyễn Tấn Dũng (2016). Quá trình và thiết bị công nghệ hóa học và thực phẩm: Kỹ thuật và công nghệ sấy thăng hoa. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- Phạm Thị Kim Thảo, Nguyễn Thị Anh Tú, Lê Lý Thùy Trâm, 2018. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic ứng dụng ủ chua bã đậu nành làm thức ăn chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 1: 81 - 122
- Shahbandeh M (2023). Global yogurt industry market revenue forecast 2018 - 2028. *Statista*, 870893.
- TCVN 7030:2016 (2016). Sữa lên men. Bộ Khoa học và Công nghệ.
- Yu LJ, Feng CP, Li X, Chang MC, Meng JL, Xu LJ (2016). Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 594 - 598.

## APPLICATION OF FREEZE-DRYING TECHNOLOGY PRODUCTS DRIED YOGURT SUPPLEMENTED WITH *Cordyceps militaris* FERMENTED BY *Lactobacillus* spp.

Vo Song Huong<sup>1</sup>, Truong Phuoc Thien Hoang<sup>2</sup>, Vo Tran Quoc Thang<sup>2</sup>,  
Le Ho Thanh Thao<sup>1</sup>, Le Phuoc Tho<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology and Environmental Research, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>Bio Nong Lam Company Limited, Ho Chi Minh City, Vietnam

### SUMMARY

The bacterial strains *Lactobacillus* spp. and *Cordyceps militaris* are added to the yogurt fermentation process to enhance its value and benefits. The freeze-drying technology is also applied to create new states for yogurt, aiming to bring a novel experience to consumers. Surveying the lactic acid production ability of 7 strains of *Lactobacillus* spp. (designated from SH1 to SH7) shows that strains SH1, SH6, and SH7 exhibit high lactic acid production capabilities with concentrations of 2.04 mg/mL, 1.98 mg/mL, and 2.19 mg/mL, respectively. These strains are identified as *Lactobacillus plantarum* through molecular biological identification. The strains SH1, SH6, and SH7 were cultured in MRS broth, and after 24 hours, their respective high cell counts were  $5.27 \times 10^9$  CFU/mL,  $6.7 \times 10^9$  CFU/mL, and  $8.8 \times 10^{10}$  CFU/mL. Subsequently, these 3 *Lactobacillus* spp. strains were fermented (at 0.5% and 1% ratios) with commercial yogurt and supplemented with *Cordyceps militaris* (0.1 - 0.5%). Results showed that SH1 produced smooth yogurt with a gel - like texture at the 0.5% supplementation ratio after 12 hours of fermentation. Sensory evaluation preferred yogurt supplemented with 0.3% *Cordyceps militaris*, scoring 4.2 points (based on aroma, taste, texture, and color). Biological characterization of the yogurt indicated antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> value of 16.43 mg/mL and showed no inhibitory effects against *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.. The yogurt is frozen at - 30°C, freeze-dried at 40°C under vacuum pressure below 500 mTorr, and then further dried at 45°C, resulting in a bacterial count of *Lactobacillus* spp. at  $1.3 \times 10^7$  CFU/g, with adenosine content of 23.9 mg/kg and cordycepin content of 29.0 mg/kg. The freeze-dried yogurt met safety standards for microbiological criteria according to TCVN 7030:2016 and was well-received by consumers, achieving a preference score of 4.1 out of 5.

**Keywords:** Antioxidant, *Cordyceps militaris*, freeze-drying, *Lactobacillus* spp., yogurt.

\* Author for correspondence: Tel: 0909575223; Email: phuoctho022010@gmail.com

# KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN TIỀN XỬ LÝ VỚI SÓNG SIÊU ÂM ĐẾN QUY TRÌNH CHIẾT CHẤT TẠO GEL TỪ RONG SỤN (*Kappaphycus alvarezii*)

Huỳnh Thị Hà Anh, Mai Thị Ngọc Lan Thanh\*

Đại học Thủ Dầu Một

## TÓM TẮT

Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) là loại rong biển có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học. Chất tạo gel như alginate, carrageenan, agar có nhiều ứng dụng trong thực tiễn, alginate được sử dụng đặc biệt trong việc chữa lành vết thương, phân phối thuốc và ứng dụng kỹ thuật mô, carrageenan ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm với các tính chất như tạo gel, làm dày, ổn định, do khả năng liên kết tốt với các protein thực phẩm. Quy trình chiết chất tạo gel từ rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) hiện nay chủ yếu dùng các chất hóa học như kiềm hoặc acid, phương pháp chiết chất tạo gel thân thiện với môi trường còn chưa được nghiên cứu cụ thể. Phương pháp chiết bằng sóng siêu âm thân thiện với môi trường vì không sử dụng hóa chất được đề xuất thực hiện trong nghiên cứu này. Đề tài khảo sát dãy tỷ lệ khối lượng rong : thể tích nước cất (m/v), thời gian tiền xử lý bằng sóng siêu âm, và dãy tần số xử lý bằng sóng siêu âm, kết quả xác định chất tạo gel thu nhận từ rong sụn với hiệu suất bằng  $77,82^a \pm 0,79$  (%), quy trình chiết tối ưu với các thông số được xác định tỷ lệ khối lượng rong : thể tích nước cất bằng 1 : 60, tiền xử lý bằng sóng siêu âm với tần số 35 Hz trong 30 phút.

*Từ khóa:* Chất tạo gel, *Kappaphycus alvarezii*, nhiệt độ, quy trình chiết, tần số.

## MỞ ĐẦU

Việt Nam có khoảng 800 loài rong biển đã được công bố trên thế giới (Trần Đình Toại, 2006), rong biển nằm trong danh mục các nguồn tài nguyên quý, có giá trị về mặt kinh tế, ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực như chế biến thực phẩm, dược phẩm, cải thiện chất lượng môi trường nước... Rong biển chứa nhiều nhóm hợp chất polysaccharide (agar, alginate, carrageenan...) là những thành phần quan trọng có giá trị (Mai, 2015), ước tính doanh thu hàng năm khoảng trên 5 tỷ USD do có tính chất đặc biệt và được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp, nông nghiệp, y học, sinh học và thực phẩm (Din *et al.*, 2019; Huyền *et al.*, 2019).

Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) thuộc ngành tảo đỏ, nguồn nguyên liệu giàu dinh dưỡng, giàu những thành phần chức năng và an toàn cho người sử dụng, và có giá trị kinh tế cao (Huyền *et al.*, 2019; Mai, 2015). Trong rong sụn, hàm lượng nước chiếm 77-91% còn lại là phần trăm chất khô (Huyền *et al.*, 2019). Trong chất khô hàm lượng carbohydrate dao động từ 50-60% và thường tập trung chủ yếu ở thành tế bào gồm có cellulose và các loại đường có hoạt tính sinh học, có thể kể đến các chất có thuộc tính tạo gel (Nishino *et al.*, 1991).

Chất tạo gel như alginate, carrageenan, agar có nhiều ứng dụng trong thực tiễn. Alginate có nhiều ứng dụng trong khoa học và kỹ thuật y sinh do khả năng tương thích sinh học và dễ tạo gel, thu nhận từ rong nâu như *Laminaria hyperborea*, *Laminaria Digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* và *Macrocystis pyrifera*. Hydrogel alginate được sử dụng đặc biệt trong việc chữa lành vết thương, phân phối thuốc và ứng dụng kỹ thuật mô, gel này giữ được sự tương đồng về cấu trúc với ngoại bào trong mô (Lee & Mooney, 2012).

Carrageenan là một nhóm galactan sunfat được chiết xuất từ một số loài tảo đỏ. Carrageenan tạo thành các polysaccharide cấu trúc chính của một số loại rong biển. Hàm lượng carrageenan trong rong biển thương mại thường chiếm khoảng từ 30 % đến 60 % trọng lượng khô. Carrageenan nằm trong thành tế bào và gian bào của mô thực vật. Carrageenan được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm với đặc tính quan trọng như tạo gel, làm dày, ổn định. Ứng dụng quan trọng của phụ gia này là trong các sản phẩm thịt và sữa, do khả năng liên kết tốt với các protein thực phẩm (Whistler, 2012).

Các phương pháp chiết chất tạo gel hiện nay có nhiều phương pháp chủ yếu sử dụng như phương pháp xử lý kiềm – acid (Jönsson *et al.*, 2020), phương pháp này sử dụng hóa chất để phá màng tế bào thu chất tạo gel nên không thân thiện với môi trường. Phương pháp chiết dựa vào enzyme, mặc dù là phương pháp xanh, nhưng khó sử dụng vì yêu cầu kỹ thuật và chi phí cao, quá trình chiết phức tạp và cần thời gian vì phụ thuộc vào thành phần hóa học trong rong (Tarman *et al.*, 2020). Phương pháp chiết có sự hỗ trợ sóng siêu âm được sử dụng trong nhiều thập kỷ để chiết xuất nhiều loại nguyên liệu thô tự nhiên. Phương pháp này gần đây đã trở nên phổ biến bởi vì nó đòi hỏi ít thiết bị và quy trình đơn giản hơn, được coi là thân thiện với môi trường, so sánh với các phương pháp xanh khác, phương pháp chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm dễ dàng hơn đáng kể, mất ít thời gian hơn và ít phụ thuộc hơn vào thành phần sinh hóa của rong, tảo như phương pháp chiết có sự hỗ trợ enzyme (Rupert *et al.*, 2022). Vì vậy mà phương pháp tiền xử lý bằng sóng siêu âm được chú ý nghiên cứu. Từ

những ý kiến trên đề tài đã nghiên cứu chiết tách chất tạo gel từ rong sụn bằng phương pháp chiết có sự hỗ trợ sóng siêu âm, không dùng dung môi hóa học, thân thiện với môi trường, được đề xuất tiến hành.

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Vật liệu**

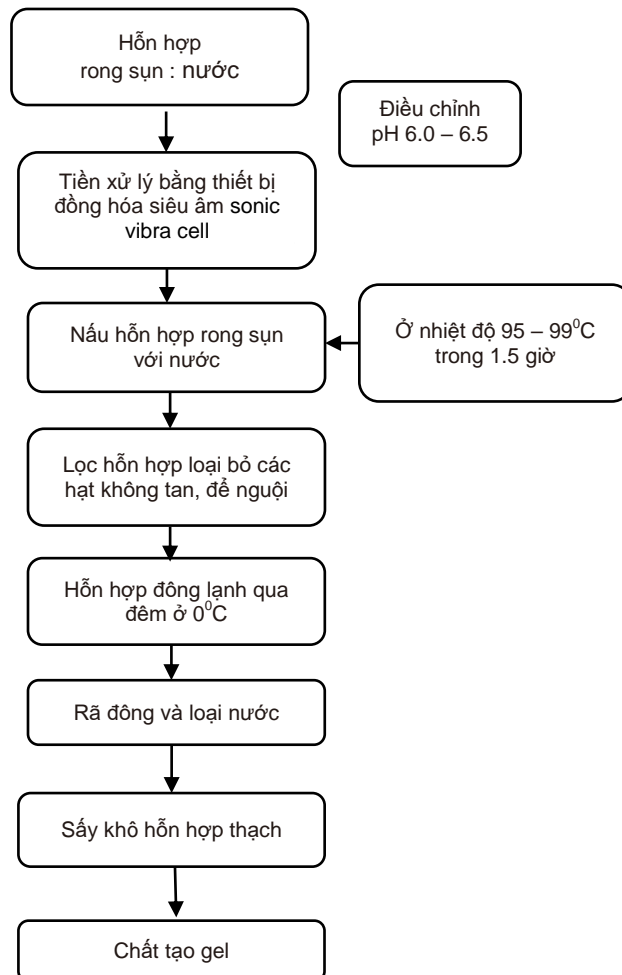
Rong sụn tươi (*Kappaphycus alvarezii*) cung cấp từ công ty nông sản Lâm Hồng Phát, Đồng Nai. Rong được rửa lại bằng nước cất để loại bỏ bụi bẩn và muối biển, sau đó để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng khoảng 30 °C ± 2 °C, trong thời gian khoảng 14 ngày (rong sụn được xác định khô khi khối lượng rong được xác định không đổi trong ba lần cân liên tiếp/trong ba ngày).

**Xác định độ ẩm của Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*)**

Cho vào chén cân dùng để xác định độ ẩm, đã được cân bì trước, cân 5- 10 g rong. Cho vào tủ sấy, sấy ở nhiệt độ 50 °C cho đến khi khối lượng 3 lần cân không vượt quá 0,5 mg. Độ ẩm (%) của rong được tính theo công thức (1). Trong đó: m<sub>1</sub> là khối lượng của mẫu rong sụn trước khi sấy, tính bằng gram; m<sub>2</sub> là khối lượng của mẫu rong sụn sau khi sấy, tính bằng gram (Bộ Y tế, 2009).

$$\text{độ ẩm (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

**Chất tạo gel từ Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) được chiết bằng phương pháp nhiệt độ cao kết hợp tiên xử lý bằng sóng siêu âm (Din et al., 2009)**



**Hình 1. Sơ đồ chiết rút chất tạo gel từ rong sụn**

Phương pháp chiết chất tạo gel từ rong sụn bằng nhiệt độ cao kết hợp tiên xử lý bằng sóng siêu âm có một số thay đổi trong quy trình như sau: Rong biển tươi sau khi rửa sạch để khô sẽ được chiết với nước cất theo các tỷ lệ khối lượng rong: thể tích nước cất (m/v). Độ pH hỗn hợp rong - nước được điều chỉnh trong khoảng 6,0 – 6,5, kiểm tra bằng giấy quỳ. Sau đó, hỗn hợp rong - nước tiên xử lý bằng máy đồng hóa siêu âm (Sonic, Hoa Kỳ) ở



tần số bằng 35 Hz trong 30 phút (30 giây, nghỉ 10 giây). Tiếp theo, hỗn hợp rong - nước sau khi được đồng hóa sẽ được chiết nước nóng ở 95 °C– 99 °C trong thời gian 1,5 giờ. Sau đó, dịch chiết rong sụn được lọc để loại bỏ các hạt không hòa tan, dịch lọc để nguội đến nhiệt độ khoảng 40 °C, dịch chiết được đông lạnh nhanh ở nhiệt độ nhỏ hơn 0 °C, trong 24 giờ. Dịch chiết rong sụn sau khi đông đặc thành dạng rắn sẽ được rã đông ở nhiệt độ phòng tách thành 2 phần bao gồm nước và thạch. Thạch được thu nhận, sẽ tiếp tục được sấy khô ở nhiệt độ bằng 55 °C (khi khối lượng không đổi), chất tạo gel được thu nhận. Hiệu suất chiết chất tạo gel được tính theo công thức

$$H (\%) = \frac{m_1 (g)}{m_2 (g)} \times 100\% ; m_1 \text{ là khối lượng chất tạo gel thu được; } m_2 \text{ là khối lượng rong, tính bằng gram}$$

### Tối ưu hóa quy trình chiết chất tạo gel từ Rong sụn

Bước tối ưu hóa quy trình chiết chất tạo gel từ Rong sụn theo phương pháp của Din và đồng tác giả (2019) có một số thay đổi sau: Thí nghiệm được tiến hành khảo sát lần lượt các thông số bao gồm tỷ lệ rong sụn và nước, tần số siêu âm trong bước tiền xử lý, và thời gian xử lý bằng sóng siêu âm, theo quy trình Hình 1.

Trong đó, dãy tỷ lệ khảo sát khối lượng rong : thể tích nước (m/v) lần lượt như sau 1:30; 1:40; 1:50; 1:60; 1:70. Dãy tần số siêu âm được lựa chọn khảo cho bước tiền xử lý có thông số lần lượt là: 30 Hz; 35 Hz; 40 Hz; 45 Hz; 50 Hz. Dãy thời gian xử lý bằng siêu âm là 30 phút; 45 phút; 60 phút; 75 phút; 90 phút (30 giây, nghỉ 10 giây).

### Kiểm tra thời gian đông của chất tạo gel thu nhận từ Rong sụn

Thời gian gel hóa của chất tạo gel thu nhận từ rong sụn được kiểm tra theo phương pháp của Yuliarti và đồng tác giả (2023) có một số thay đổi sau: 2 gam chất tạo gel hòa với 80 ml nước, tiếp theo đun sôi hỗn hợp trên đến khi chất tạo gel hòa tan hoàn toàn với nước. Sau đó, để nguội dung dịch chất tạo gel và nước, bắt đầu tính thời gian đông đặc của dung dịch, ghi nhận kết quả theo phút.

### Thử nghiệm tạo thạch lá dứa từ chất tạo gel thu nhận từ Rong sụn

Lá dứa chọn mua những lá không quá già, còn tươi tại chợ Bến Thố, phường Tân An, thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương. Lá dứa được cắt bỏ phần gốc. Sau đó, nguyên liệu được xử lý, làm sạch và xay (nghiền) mịn và chiết với nước theo phương pháp của Nguyễn Thanh Hải và Bùi Thị Tho (2013). Tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:1 (w/v). Hỗn hợp được tiến hành ngâm trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó, đem đi lọc thu dịch chiết. Dung dịch chiết được siêu âm trong 30 phút ở điều kiện lạnh. Tiếp tục li tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 20 phút, sau đó hút lấy dịch trong thu được dịch chiết lá dứa. Dịch chiết lá dứa thu được bổ sung vào quá trình tạo thạch của chất tạo gel thu được từ rong sụn theo tỷ lệ 2 gam chất tạo gel hòa với 80 ml nước, với dãy dịch chiết lá dứa là 4 ml; 12 mL; 20 mL dịch chiết lá dứa, kết quả thạch lá dứa được đánh giá cảm quan thông qua màu sắc, trạng thái và mùi vị (Nguyễn Thanh Hải và Bùi Thị Tho, 2013).

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được xử lý bằng phần mềm STATGRAPHICS Centurion XV.

## KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

### Hàm lượng nước của rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*)

Hiện nay các nghiên cứu về độ ẩm của nguyên Rong sụn chưa được công bố, chủ yếu là độ ẩm của các chất chiết từ Rong sụn để tính hiệu quả chiết như nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Thủy và Lê Thị Liên Thanh (2015), vì vậy việc xác định hàm lượng nước trong rong sụn để tính toán đến hiệu suất chiết chất tạo gel từ rong sụn là cần thiết. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1. Hàm lượng nước trong Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*)**

Mẫu	Hàm lượng nước (%)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	68,525 ± 0,35

Hàm lượng nước trong rong sụn chiếm 68,525 ± 0,35 (%) so với tổng khối lượng rong tươi. Kết quả được so sánh với TCVN 10371:2014 về Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) khô dùng làm thực phẩm hoặc dùng để chế biến carrageenan, yêu cầu chi tiêu hóa lý trong rong sụn khô, cụ thể là Độ ẩm, phần trăm khối lượng, không lớn hơn 40 %, kết quả xác định hàm lượng nước trong rong sụn tươi, đã xác định nguyên liệu rong sụn khô cho thí nghiệm chiết chất tạo gel đạt theo TCVN 10371:2014 (Cục Chế biến Nông lâm thủy sản và nghề muối, 2014).

### Tối ưu hóa quy trình chiết chất tạo gel từ Rong sụn

Khảo sát lần lượt các thông số bao gồm tỷ lệ rong sụn và nước, tần số siêu âm trong bước tiền xử lý, và thời gian xử lý bằng sóng siêu âm, theo quy trình Hình 1. Kết quả chất tạo gel được thu nhận từ rong sụn được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2. Hiệu suất chiết chất tạo gel từ Rong sụn**

Mẫu	Hiệu suất (%)	
Tỷ lệ khảo sát khối lượng rong : thể tích nước (m/v)	1 : 30	33,00 ± 0,14 <sup>a</sup>
	1 : 40	37,26 ± 0,38 <sup>b</sup>
	1 : 50	46,33 ± 0,79 <sup>c</sup>
	1 : 60	64,35 ± 0,65 <sup>d</sup>
	1 : 70	82,19 ± 0,78 <sup>e</sup>
Tần số siêu âm trong bước tiền xử lý (Hz)	30	69,32 ± 0,84 <sup>a</sup>
	35	74,56 ± 0,79 <sup>b</sup>
	40	64,01 ± 0,69 <sup>c</sup>
	45	59,39 ± 0,86 <sup>d</sup>
	50	62,98 ± 0,71 <sup>e</sup>
Thời gian xử lý với sóng siêu âm (Phút)	30	77,82 ± 0,79 <sup>a</sup>
	45	67,16 ± 0,21 <sup>b</sup>
	60	68,36 ± 0,47 <sup>c</sup>
	75	67,85 ± 0,64 <sup>b</sup>
	90	57,02 ± 0,73 <sup>d</sup>

Đối với nghiệm thức về tỷ lệ khối lượng rong sụn và nước, hiệu suất chiết chất tạo gel thu nhận từ rong sụn cao nhất được thể hiện trong Bảng 2 bằng 64,35 ± 0,65 (%) và 82,19 ± 0,78 (%) lần lượt tương ứng với tỷ lệ khối lượng rong sụn và nước là 1:60 và 1:70 (m/v). Ở tỷ lệ khối lượng rong sụn và nước bằng 1:70 (m/v) có hiệu suất chiết chất tạo gel cao hơn ở tỷ lệ 1:60 (m/v) nhưng khả năng đông (khả năng gel hóa) của chất tạo gel thu được từ tỷ lệ 1:70 thấp hơn so với khả năng đông của chất tạo gel thu được từ tỷ lệ 1:60, kết quả được trình bày ở Bảng 3, cụ thể chất tạo gel thu được từ tỷ lệ 1:70 không thể đông đặc lại hay mất khả năng gel hóa, điều này có thể là do quá trình thu nhận chất tạo gel các chất đã bị biến tính do hàm lượng nước trong quá trình chiết cao nên không hoàn lại trạng thái ban đầu được. Ở tỷ lệ 1:60 (m/v) chất tạo gel thu được có khả năng đông đặc lại sau 20 phút hay khả năng gel hóa có khả năng hoàn lại, thời gian đông đặc tương đương với các chất tạo gel thu được từ các nghiệm thức tỷ lệ khối lượng rong sụn và nước chiết khác. Vì vậy dựa vào kết quả ở Bảng 3, tỷ lệ 1: 60 (m/v) khối lượng rong sụn (gram) : thể tích nước cất (mL) được chọn làm tỷ lệ tối ưu cho quy trình chiết chất tạo gel từ rong sụn.

**Bảng 3. Thời gian đông đặc của chất tạo gel theo tỷ lệ rong : nước**

Tỷ lệ rong sụn : nước (m/v)	1: 30	1 : 40	1 : 50	1 : 60	1 : 70
Thời gian đông (phút)	18	19	20	20	không đông

Đối với nghiệm thức về tần số siêu âm được khảo sát trong bước tiền xử lý mẫu, kết quả được trình bày trong Bảng 2. Hiệu suất chiết chất tạo gel cao nhất bằng 74,56 ± 0,79 (%) tương ứng với tần số bằng 35 Hz, khi tăng tần số sóng siêu âm xử lý mẫu thì hiệu suất thu nhận chất tạo gel giảm. Kiểm tra lại khả năng đông đặc của chất tạo gel, kết quả thời gian đông của tất cả các nghiệm thức trong khoảng thời gian 20 phút. Như vậy không có sự thay đổi về khả năng đông đặc của chất tạo gel thu được khi thay đổi tần số. Vì vậy tần số tối ưu trong quy trình chiết chất tạo gel từ rong sụn được chọn bằng 35 Hz.

Đối với nghiệm thức thời gian xử lý hỗn hợp Rong-nước bằng sóng siêu âm, kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Kết quả xác định được thời gian 30 phút có hiệu suất thu hồi cao nhất 77,36 ± 0,46 (%), thời gian xử lý bằng 90 phút có hiệu suất thu nhận chất tạo gel thấp nhất, kết quả này xác định sóng siêu âm có khả năng ảnh hưởng đến quy trình chiết chất tạo gel từ rong sụn, thời gian xử lý mẫu bằng sóng siêu âm càng lâu có khả năng làm biến đổi cấu trúc chất trong rong nên hiệu suất thu chất giảm. Kiểm tra khả năng đông đặc của chất thu được kết quả được trình bày ở Bảng 4. Thời gian đông đặc của chất tạo gel thu được có giá trị tương đương từ 18 phút đến 20 phút. Vì vậy, thông số tối ưu về thời gian xử lý mẫu bằng sóng siêu âm được xác định bằng 30 phút.

**Bảng 4. Thời gian đông đặc của chất tạo gel theo thời gian xử lý mẫu bằng sóng siêu âm**

Thời gian xử lý mẫu bằng sóng siêu âm (phút)	30	45	60	75	90
Thời gian đông (phút)	18	18	18	20	17

Sau khi tối ưu hóa các thông số về tỷ lệ khối lượng rong và thể tích nước, thời gian xử lý mẫu rong - nước bằng sóng siêu âm và tần số xử lý mẫu, kết quả xác định hiệu suất chiết chất tạo gel từ rong sụn cao nhất bằng  $77,82^a \pm 0,79$  (%), kết quả này được so sánh với kết quả của Din và đồng tác giả (2019), trong nghiên cứu này tác giả đã tiến xử lý mẫu bằng sóng siêu âm kết hợp hấp khử trùng với thời gian xử lý 30 phút ở rong *Euचेuma cottonii* và *Gelidium amansii*, kết quả hiệu suất thu nhận chất tạo gel lần lượt bằng 52,70% và 10,37% (Din et al., 2019). Nguyễn Thị Thu Thủy và Lê Thị Liên Thanh (2015) tách chiết chất tạo gel (carrageenan) từ rong sụn, kết quả rong sụn Ninh Thuận được ngâm trong dung dịch KOH nồng độ 6,5 % trong thời gian 80 phút và nấu chiết ở 95 °C trong thời gian 60 phút với tỷ lệ khối lượng nước so với rong bằng 10/1 cho hiệu suất chiết tách bằng 48,31 % ( Nguyễn Thị Thu Thủy và Lê Thị Liên Thanh, 2015), so sánh với hai nghiên cứu trước kết quả trong đề tài này được xác định có hiệu suất chiết chất tạo gel cao hơn, dung môi chiết tách thân thiện với môi trường là nước cất với tỷ lệ khối lượng rong sụn:nước bằng 1:60 (m/v), thời gian tiến xử lý bằng sóng siêu âm nhanh hơn, cụ thể thời gian tiến xử lý bằng sóng siêu âm trong 30 phút, tần số xử lý bằng 35 Hz được báo cáo. Kết quả tối ưu quy trình chiết chất tạo gel từ rong sụn của đề tài này tương đồng với nghiên cứu Din và đồng tác giả (2019) về thời gian xử lý và tần số xử lý, tuy nhiên khác nhau về tỷ lệ khối lượng rong/nước, điểm khác biệt này có thể là do trong nghiên cứu của Din và đồng tác giả (2019) là quan tâm đến agar và đối tượng khác là rong *Euचेuma cottonii* và *Gelidium amansii*, còn trong nghiên cứu này đối tượng là rong sụn.

Như vậy quy trình chiết chất tạo gel từ rong sụn được tối ưu thông số tỷ lệ khối lượng rong/nước 1:60 (m/v), thời gian tiến xử lý bằng sóng siêu âm nhanh hơn ở 30 phút, tần số xử lý bằng 35 Hz lần đầu được báo cáo.

Chất tạo gel thu được sau khi sấy khô đều cho ra màu vàng nâu, có mùi rong nhẹ trình bày ở Hình 2.



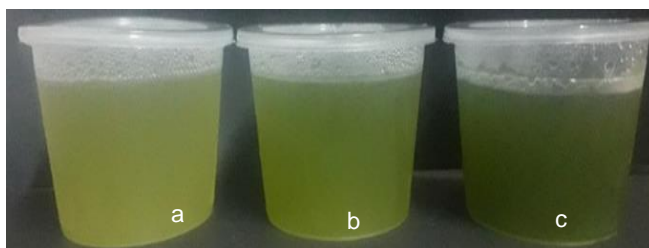
Hình 2. Chất tạo gel tu được từ rong sụn được xử lý ở các tần số khác nhau

(A) 30 Hz, (B) 35 Hz, (C) 40 Hz, (D) 45 Hz, (E) 50 Hz.

### Thử nghiệm tạo thạch lá dứa từ chất tạo gel thu nhận từ Rong sụn ứng dụng trong quy trình tạo sữa chua

Thạch được tạo từ chất tạo gel bổ sung dịch chiết lá dứa có màu sắc, mùi vị, trạng thái được trình bày trong Hình 3.

Thạch lá dứa thu nhận được có màu xanh đồng đều đặc trưng của sản phẩm, cụ thể dịch chiết lá dứa bổ sung 4 mL, thạch có màu xanh nhạt, hơi ngả vàng, mùi thơm nhẹ, độ gel hóa ổn định; Dịch chiết lá dứa bổ sung 12 mL, thạch có màu xanh đậm, màu xanh đặc trưng của lá dứa, mùi thơm đặc trưng, độ gel hóa ổn định; Dịch chiết lá dứa bổ sung 20 mL, thạch có màu xanh đậm, mùi thơm nồng, độ gel hóa ổn định đồng đều. Thử nghiệm này xác định được tỷ lệ tối ưu tạo sản phẩm thạch lá dứa ứng dụng làm sữa chua được đề xuất như sau 2 gam chất tạo gel hòa với 80 ml nước, dịch chiết lá dứa bổ sung có thể tích bằng 12 mL.



Hình 3. Thạch lá dứa thu được với tỷ lệ dịch chiết lá dứa bổ sung bằng 4 (a), 12 (b), 20 (c) (mL)

### KẾT LUẬN

Rong sụn tươi (*Kappaphycus alvarezii*) làm nguyên liệu cho thí nghiệm chiết chất tạo gel đạt theo TCVN 10371:2014 về quy định yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) đã được loại bỏ tạp chất, cát sạn và làm khô, dùng làm thực phẩm hoặc dùng để chế biến carrageenan. Quy trình chiết chất tạo gel từ rong sụn đã được tối ưu thông số gồm tỷ lệ khối lượng rong/nước bằng 1: 60 (m/v), thời gian tiến xử lý bằng sóng siêu âm nhanh trong 30 phút với tần số sóng bằng 35 Hz thu được chất tạo gel có hiệu suất chiết bằng  $77,82^a \pm 0,79$  (%).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2009). *Dược điển Việt Nam IV*. NXB Y học, Hà Nội, Việt Nam.
- Cục Chế biến Nông lâm thủy sản và nghề muối (2014). Tiêu Chuẩn Quốc Gia (TCVN 10371 : 2014) rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) khô - yêu cầu kỹ thuật (Dried seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) - Technical requirements). *Bộ Khoa học và Công nghệ, Hà Nội, Việt Nam*.
- Din SS, Chew KW, Chang YK, Show PL, Phang SM, Juan JC (2019). Extraction of agar from *Eucheuma cottonii* and *Gelidium amansii* seaweeds with sonication pretreatment using autoclaving method. *Journal of Oceanology and Limnology*, 37(3): 871-880.
- Huyền ĐT, Chi NTM, Tiên NPC, Nhơn HTN (2019). Nghiên cứu tinh sạch và xác định hoạt tính miễn dịch của fucoidan từ rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*). *Tạp chí Khoa học Đại học Văn Hiến*, 6(3): 112-119.
- Jönsson M, Allahgholi L, Sardari RRR, Hreggviðsson GO, and Karlsson EN (2020). Extraction and modification of macroalgal polysaccharides for current and next-generation applications. *Molecules*, 25:930, doi: 10.3390/molecules25040930
- Lee KY, Mooney DJ (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1): 106-126.
- Mai TTN (2015). Nước uống dinh dưỡng từ rong sụn *Kappaphycus alvarezii*. *Dong Thap University Journal of Science*, (17): 79-83.
- Nishino T, Nagumo T, Kiyohara H, Yamada H (1991). Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate research*, 211(1): 77-90.
- Hải NT, Tho BT (2013). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn in vitro của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với *E.coli* gây bệnh và kháng ampicillin, kanamycin. *Tạp chí khoa học và phát triển*, 11 (6): 804-808.
- Rupert R, Rodrigues KF, Thien VY, Yong WTL (2022). Carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae): Metabolism, structure, production, and application. *Frontiers in plant science*, 13: 859635.
- Tarman K, Sadi U, Santoso J, Hardjito L (2020). Carrageenan and its enzymatic extraction. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 1: 147-159.
- Thùy NTT, Thanh LTL (2015). Nghiên cứu chiết tách carrageenan từ rong sụn Ninh Thuận. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 11(96): 114-119.
- Toại TD (2006). *Carrageenan từ rong biển sản xuất và ứng dụng*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Whistler R (2012). Industrial gums: polysaccharides and their derivatives. *Elsevier, Amsterdam, Hà Lan*.
- Yuliarti O, Sentana AD, Ong CY, Yassin ZAR, Ng L, Koh WM (2023). Structural properties of cottonii seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) gels in the presence of coconut milk. *Food Hydrocolloids*, 145: 109087.

## SCREENING OF SONICATION PRETREATMENT CONDITION ON *Kappaphycus alvarezii* TOWARDS GEL EXTRACTION

Huynh Thi Ha Anh, Mai Thi Ngoc Lan Thanh\*

Thu Dau Mot University

### SUMMARY

*Kappaphycus alvarezii* is a type of seaweed that contains many biologically active compounds. Gelling agents such as alginate, carrageenan, and agar have many practical applications. Alginate is especially used in wound healing, drug delivery, and tissue engineering applications, and carrageenan is widely used in the food industry with properties such as gelling, thickening, and stability due to its ability to bind well with food proteins. The current process of extracting gel-forming substances from seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) mainly uses alkali or acid. Environmentally friendly methods of extracting gel-forming substances have not been specifically researched. An ecologically friendly ultrasonic extraction method because it does not use chemicals is proposed in this study. The topic investigates the range of seaweed mass ratios: distilled water volume (m/v), ultrasonic pretreatment time, ultrasonic treatment frequency range, and the results of determining the creating substances. Gel was obtained from seaweed with a yield of  $77.82 \pm 0.79$  (%), an optimal extraction process with parameters specified by the ratio of seaweed mass: distilled water volume of 1:60, and pretreatment treated with ultrasound waves at a frequency of 35 Hz for 30 minutes.

**Keywords:** Frequency, gel, process, *Kappaphycus alvarezii*, temperature.

\* Author for correspondence: Tel: 0947361139; Email: thanhmtnl@tdmu.edu.vn.

## HOẠT TÍNH PECTINASE TỪ CHỦNG *BACILLUS LICHENIFORMIS* V114: ỨNG DỤNG XỬ LÝ NƯỚC ÉP HOA QUẢ VÀ BÓC VỎ CÂY

Nguyễn Nhật Linh<sup>1</sup>, Đỗ Thị Tuyên<sup>1,2</sup>, Lê Thanh Hoàng<sup>1</sup>, Vu Thanh Tùng<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ánh Tuyết<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hiền Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Sỹ Lê Thanh<sup>1</sup>, Lưu Minh Đức<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Trung<sup>2</sup>, Đào Thị Mai Anh<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Minh Phương<sup>1</sup>, Phan Thị Hồng Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Liên<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội

### TÓM TẮT

Pectinase là một enzyme đóng vai trò vô cùng quan trọng trong các ngành công nghiệp xanh. Trong nghiên cứu này, dịch nuôi cấy *Bacillus licheniformis* V114 được tinh sạch sơ bộ bằng các phương pháp kết tủa protein khác nhau, kết quả cho thấy phương pháp tủa muối amonium sulfat với nồng độ 60% cho hoạt tính pectinase cao nhất đạt  $1319,656 \pm 63,688$  U/L. Điều kiện phản ứng thích hợp của pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 là 60°C trong pH trung tính. Không những vậy, enzyme này tương đối bền trong khoảng nhiệt độ từ 25 – 50°C khi giữ được hoạt tính trên 90% sau 75 phút ủ, tuy nhiên lại kém bền trong pH acid hoặc base. Với các chất dễ gây ảnh hưởng đến độ bền và hoạt tính của enzyme, pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 gần như không bị ảnh hưởng bởi DMSO và tăng nhẹ khi ủ với Tween 80 (115,4%), nhưng lại bị ức chế mạnh bởi CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, và EDTA với hoạt tính còn lại lần lượt là 65,3%, 48,8% và 37,6%. Trong khi đó, SDS, HgCl<sub>2</sub> và FeSO<sub>4</sub> gây mất hoạt tính xúc tác phân hủy pectin của enzyme này chỉ sau 1 giờ ủ. Nước ép dưa được ủ với pectinase đạt được hiệu quả tốt nhất về hiệu suất thu hồi và độ trong ở nồng độ 10% trong 120 phút; trong đó, dịch enzyme tinh sạch sơ bộ cho hiệu quả tốt hơn. Kết quả thử nghiệm khả năng thủy phân của pectinase trên lớp cambi cho thấy hoạt tính cao nhất đạt  $141,665 \pm 28,114$  U/L sau 30 phút ủ với vỏ cây, lượng đường khử tăng dần theo thời gian nhưng tốc độ phản ứng giảm dần trong khoảng thời gian ủ từ 30 phút đến 4 giờ.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis* V114, bóc vỏ cây, pectinase, xử lý nước ép hoa quả.

### MỞ ĐẦU

Hiện nay, với sức tàn phá nặng nề từ các hóa chất, chất thải độc hại từ các nhà máy, xí nghiệp, trái đất đang phải đối mặt với hàng loạt các vấn đề nghiêm trọng như ô nhiễm không khí, thiếu hụt nước sạch, giảm đa dạng sinh học do ô nhiễm và mất nơi cư trú... Hệ lụy là biến đổi khí hậu khiến cho con người phải hứng chịu thời tiết khắc nghiệt và thiên tai với tần suất và hậu quả ngày càng lớn. Bởi vậy, vấn đề bảo vệ môi trường và phát triển bền vững đang là một tiêu điểm trong những thập kỷ gần đây. Enzyme, một chìa khóa xanh mang lại giải pháp cho các vấn đề môi trường đang ngày càng được quan tâm và ứng dụng. Một trong những enzyme được thương mại hóa và tiêu thụ lớn nhất chính là pectinase. Pectinase có ý nghĩa đặc biệt do chúng có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực quan trọng như thực phẩm, dệt may, đồ uống, bột giấy và giấy và các ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học, khả năng tận dụng các chất thải nông nghiệp làm cơ chất và xử lý nước thải cho các ngành công nghiệp (Haile and Ayele, 2022). Các pectinase có nguồn gốc vi sinh vật chiếm 25% quy mô enzyme công nghiệp và thực phẩm trên toàn thế giới cũng như sự gia tăng thị trường theo thời gian. Pectinase, một enzyme thuộc nhóm hydrolase, là tập hợp của các enzyme thủy phân hợp chất pectic, chủ yếu có trong vi sinh vật và thực vật bậc cao. Các chất pectic là các polysaccharide phức tạp dạng keo, có tính acid, với mạch acid galacturonic dài và được liên kết với nhau bằng liên kết glycoside. Trong đó, pectin là một polysaccharide giàu đường rất quan trọng với thành phần chính là acid galacturonic và methanol, là một trong những thành phần chính của ngũ cốc, rau, trái cây và chất xơ. Pectinase tham gia vào quá trình trao đổi chất của thành tế bào cũng như sự phát triển của tế bào, sự lão hóa, quá trình chín của quả, quá trình sinh bệnh và rụng quả. Pectinase có thể được chiết xuất từ thực vật hay các loài vi sinh vật trong tự nhiên. Từ những năm 1970, pectinase đã được sản xuất thương mại từ vi sinh vật, đặc biệt là từ nấm (Haile and Ayele, 2022). Ngoài ra, vi khuẩn cũng là một nguồn pectinase tiềm năng. Trong đó, *Bacillus licheniformis* đã được báo cáo là vi khuẩn phân giải pectin rất tiềm năng với hoạt tính 341 U/mL, được phân lập từ rau củ đã hỏng (Rehman *et al.*, 2015). Tuy nhiên, độ bền và sự kém ổn định của enzyme được coi là một trong những hạn chế chính để đưa vào ứng dụng trong sản xuất. Tăng cường tính ổn định và duy trì mức độ hoạt động mong muốn trong thời gian dài là hai điểm quan trọng được xem xét khi lựa chọn pectinase. Bởi vậy, để góp phần tìm ra những ứng viên phù hợp, chúng tôi tiến hành nghiên cứu các đặc tính của pectinase từ chủng *Bacillus licheniformis* V114. Sau khi khám phá ra điều kiện thích hợp cho khả năng xúc tác

của pectinase, chúng tôi tiếp tục khảo sát tiềm năng của enzyme này vào ứng dụng làm trong nước hoa quả và bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Chủng giống:** Chủng *Bacillus licheniformis* V114 được cung cấp từ phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**Vật liệu:** Các mẫu vỏ cây được thu từ nhà máy giấy Bãi Bằng-Phú Thọ và An Hòa-Tuyên Quang. Dứa giống Queen (*Ananas comosus*) cung cấp bởi vựa dứa Ninh Bình, mua tại siêu thị WinMart. Các hóa chất sử dụng từ hãng Sigma-Aldrich (Mỹ), Merck, Serva (Đức), Himedia (Ấn Độ). Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều đạt tiêu chuẩn phân tích, ở dạng tinh khiết, được sử dụng trực tiếp hoặc pha loãng theo nồng độ phù hợp.

**Môi trường nghiên cứu:** Môi trường lên men pectinase (M2) (g/L): pectin 3,0; cao nấm men 5,0; ammonium sulphate 2,5;  $K_2HPO_4$  2,5;  $KH_2PO_4$ , 2,0 (pH 7,0) (Ghani *et al.*, 2013). Quá trình lên men sinh pectinase của chủng vi khuẩn được thực hiện ở 37°C trong 3 ngày với tốc độ lắc 180 vòng/phút. Dịch sau lên men được ly tâm 10000 vòng/phút, trong 10 phút, loại bỏ sinh khối thu dịch enzyme thô.

### Tinh sạch sơ bộ bằng phương pháp kết tủa protein

**Phương pháp tủa bằng dung môi:** Sử dụng 4 loại dung môi khác nhau: methanol, ethanol, buthanol và acetone để tủa protein từ dịch enzyme thô của chủng *B. licheniformis* V114 theo tỷ lệ dung môi/dịch chiết là 4:1 (v/v). Giữ tủa trong điều kiện -20°C trong ít nhất 30 phút rồi ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút để thu lấy tủa.

**Phương pháp tủa bằng muối ammonium sulfate:** Tủa protein ở 3 nồng độ muối: 30%, 60% và 80% (w/v). Cân một lượng muối đã tính toán theo nồng độ rồi đổ từ từ muối vào dung dịch protein trong điều kiện 0°C rồi để tủa ở -20°C qua đêm. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút rồi thu tủa (Wingfield, 2001). Tiến hành thẩm tích ở 0°C trong khoảng 8 - 9 giờ hoặc cho đến khi thử với  $BaCl_2$  không còn tạo kết tủa trắng.

**Điện di:** Gel polyacrylamid được sử dụng để điện di protein với nồng độ 12,5% (Laemmli *et al.*, 1970). Mẫu protein được bổ sung đệm xử lý mẫu dye 5x với tỷ lệ mẫu/ dye là 5/1, biến tính ở 95°C trong 10 phút, sau đó để ở -20°C trong 1 phút. Tiến hành điện di bản gel rồi nhuộm bằng dung dịch nhuộm PAGE trong 1,5 - 2 giờ. Bản gel được tẩy màu bằng dung dịch tẩy PAGE đến khi hết màu xanh.

**Xác định hoạt lực enzyme pectinase:** Hoạt lực pectinase được xác định bằng phương pháp đo lượng đường khử sinh ra từ 0,5% (w/v) pectin phản ứng với 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA) hấp thụ cực đại ở 540 nm. Một đơn vị hoạt độ pectinase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1  $\mu$ mol galacturonic acid trong điều kiện thí nghiệm (Alqahtani *et al.*, 2021).

### Nghiên cứu tính chất lý hóa của pectinase

**Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính pectinase:** Phản ứng của dịch enzyme và cơ chất pectin 0,5% (w/v) ở 50°C trong 30 phút được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau từ 25 - 60°C. Hoạt tính pectinase được xác định theo phương pháp quang phổ (Alqahtani *et al.*, 2021).

**Khảo sát ảnh hưởng của pH lên hoạt tính và độ bền của pectinase:** Dịch enzyme được pha loãng bởi đệm natri acetat 0,1 M pH 5,0; đệm 0,1 M Na citrate pH 6,5, đệm Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, sau đó tiến hành xác định hoạt tính theo phương pháp quang phổ (Alqahtani *et al.*, 2021). Với độ bền, dịch enzyme được ủ với đệm với các pH trên sau các khoảng thời gian 50 phút và 80 phút ở nhiệt độ phòng rồi xác định hoạt tính còn lại.

**Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền của pectinase:** Dịch enzyme được ủ từ 30 phút và 75 phút ở các nhiệt độ khác nhau từ 25 - 50°C. Xác định hoạt tính enzyme còn lại (Alqahtani *et al.*, 2021).

**Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa lên hoạt tính của pectinase:** Dịch enzyme được ủ với một số chất thường được sử dụng trong tẩy rửa như dimethyl sulfoxid (DMSO), Tween 80, SDS và EDTA với nồng độ 2% (v/v) trong 1 giờ. Xác định hoạt tính enzyme còn lại (Alqahtani *et al.*, 2021).

**Ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính của pectinase:** Dịch enzyme được ủ với các ion kim loại như  $FeSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $HgCl_2$  và  $CaCl_2$  với nồng độ 2% (w/v) trong 1 giờ. Xác định hoạt tính enzyme còn lại (Alqahtani *et al.*, 2021).

### Khảo sát ảnh hưởng của enzyme pectinase lên nước ép hoa quả

Các chỉ tiêu về chất lượng được khảo sát qua 5 nồng độ enzyme (0% - đối chứng, 4%, 6%, 8%, 10%) với 2 khoảng thời gian ủ là 60 phút và 120 phút trên mỗi 80 g nguyên liệu nước ép dứa. Tiến hành bất hoạt enzyme ở 85 - 90°C trong 5 phút, ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút, thu lấy dịch để đánh giá các tính chất tiếp theo.

Hiệu suất thu hồi: Là phần trăm khối lượng dịch ép hoa quả thu được sau khi xử lý bằng enzyme so với khối lượng ban đầu.

Độ trong: Đo quang phổ hấp thụ dịch quả ở bước sóng 450 nm: % Độ trong =  $(OD_{DC} - OD_{TN}) / OD_{DC} \times 100\%$

Trong đó:  $OD_{TN}$ : OD của dịch quả đã xử lý enzyme

$OD_{DC}$ : OD mẫu đối chứng (không xử lý enzyme)

### Ảnh hưởng của enzyme đến quá trình bóc vỏ cây

Dịch enzyme pha loãng đến nồng độ 50 - 100 U/L, ủ với lớp cambi của vỏ cây theo tỷ lệ 500 mL/100 g. Mẫu đối chứng thay enzyme bằng nước máy. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ, lấy mẫu 30 phút/lần, đo pH dịch ngâm, kiểm tra hoạt lực enzyme còn lại và hàm lượng đường khử (glucose) (Raettoe *et al.*, 1993).

**Xử lý số liệu:** Các số liệu được xử lý bằng phần mềm MS excel 2016, Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các giá trị được biểu diễn dưới dạng  $\bar{A} \pm SD$  ( $\bar{A}$  là giá trị trung bình).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

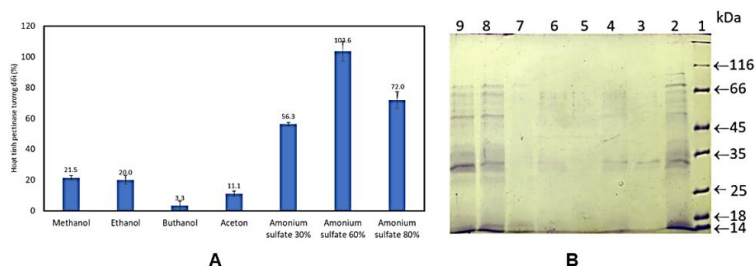
### Kết quả nghiên cứu thu nhận enzyme pectinase từ dịch lên men

Các dịch enzyme thô được tinh sạch sơ bộ bằng 2 phương pháp: Phương pháp tủa bằng dung môi và phương pháp tủa muối amonium sulfate bão hòa. Kết quả được trình bày trong Bảng 1 và Hình 1.

**Bảng 1. Hoạt tính pectinase sau khi tủa bằng các phương pháp khác nhau**

Phương pháp tủa	Hoạt tính pectinase (U/L)	Hoạt tính tương đối (%)	Hàm lượng protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hiệu suất (%)
Dịch enzyme thô	1268,445 $\pm$ 63,672	100 $\pm$ 1,4	161,949 $\pm$ 8,159	100,0 $\pm$ 5,0
Methanol	274,143 $\pm$ 14,244	21,5 $\pm$ 2,8	47,590 $\pm$ 3,082	29,4 $\pm$ 1,9
Ethanol	254,382 $\pm$ 13,738	20,0 $\pm$ 3,1	62,974 $\pm$ 1,269	38,9 $\pm$ 0,8
Buthanol	42,242 $\pm$ 2,303	3,3 $\pm$ 1,6	40,538 $\pm$ 0,363	25,0 $\pm$ 0,2
Aceton	141,363 $\pm$ 7,365	11,1 $\pm$ 1,1	72,077 $\pm$ 2,176	44,5 $\pm$ 1,3
Amonium sulfate nồng độ 30%	717,136 $\pm$ 34,762	56,3 $\pm$ 6,4	88,308 $\pm$ 2,901	54,5 $\pm$ 1,8
Amonium sulfate nồng độ 60%	1319,656 $\pm$ 63,688	103,6 $\pm$ 5,5	230,359 $\pm$ 15,230	142,2 $\pm$ 9,4
Amonium sulfate nồng độ 80%	916,620 $\pm$ 44,931	72,0 $\pm$ 1,5	233,949 $\pm$ 29,010	144,5 $\pm$ 17,9

Pectinase được chia thành ba nhóm: (1) Hydrolase bao gồm polygalacturonase, PG; (2) Lyase/trans-eliminase bao gồm pectin lyase, PNL và pectate lyase, PL và (3) Pectin esterase, PE. Các pectinase từ các chủng khác nhau cũng có các khối lượng phân tử khác nhau như pectinase từ chủng *Bacillus* sp. DT7 (thuộc nhóm pectin lyase) nặng 106 kDa (Kashyap *et al.*, 2000), một loại pectinase lyase khác từ *B. subtilis* có khối lượng phân tử là 38 kDa (Saharan and Sharma, 2019), một báo cáo khác về pectinase bền nhiệt và chịu được acid có khối lượng 36 kDa (Demir *et al.*, 2011). Ngoài ra, cũng có các nghiên cứu báo cáo khối lượng phân tử pectinase nhỏ hơn, chẳng hạn như chủng *Bacillus subtilis* BK-3 với kích thước chỉ khoảng 33kDa (Prajapati *et al.*, 2021). Các mẫu tủa dung môi và tủa muối đều xuất hiện một băng đậm có khối lượng < 35kDa, tuy nhiên các mẫu tủa khác nhau thì thu được hàm lượng protein là khác nhau, đậm nhất ở mẫu tủa muối amonium sulfate nồng độ 60% và 80% (w/v) (Hình 1).



**Hình 1. Pectinase tủa bằng các phương pháp khác nhau**

A. Hoạt tính tương đối của pectinase so với ban đầu; B. Điện di đồ SDS-PAGE các mẫu tủa protein: 1-Marker; 2-Pectinase gốc; 3-tủa methanol; 4-tủa ethanol; 5-tủa buthanol; 6-tủa aceton; 7-tủa muối 30%; 8-tủa muối 60%; 9-tủa muối 80% (w/v).

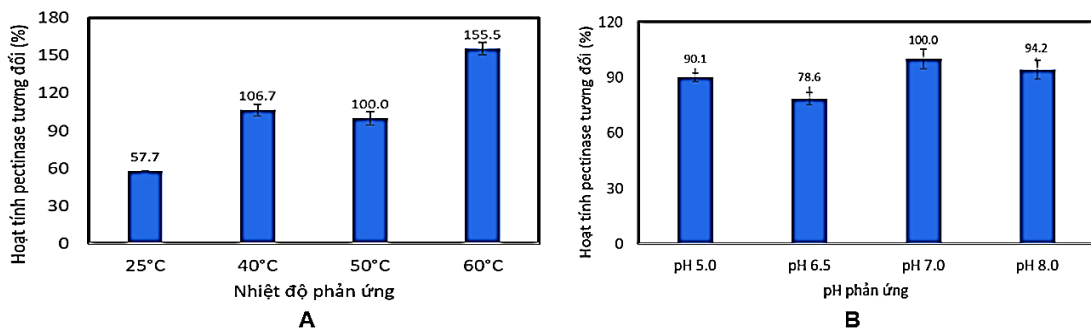
Phương pháp tủa muối đã không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme và là bước tinh sạch sơ bộ ban đầu thu nhận enzyme (Hình 1B). Từ những số liệu thu được, nhận thấy phương pháp tủa bằng muối amonium sulfate với nồng độ 60% (w/v) cho hoạt tính cao nhất, đạt 1319,656  $\pm$  63,688 U/L, tương đương với 103,6  $\pm$  5,5% so với

hoạt tính của dịch nuôi cấy ban đầu. Như vậy, phương pháp rửa muối amonium sulfate nồng độ 60% (w/v) được lựa chọn để thu dịch tinh sạch sơ bộ để đánh giá một số tính chất lý hóa trong các nghiên cứu tiếp theo.

**Nghiên cứu một số tính chất của enzyme pectinase**

**Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH phản ứng lên hoạt tính pectinase**

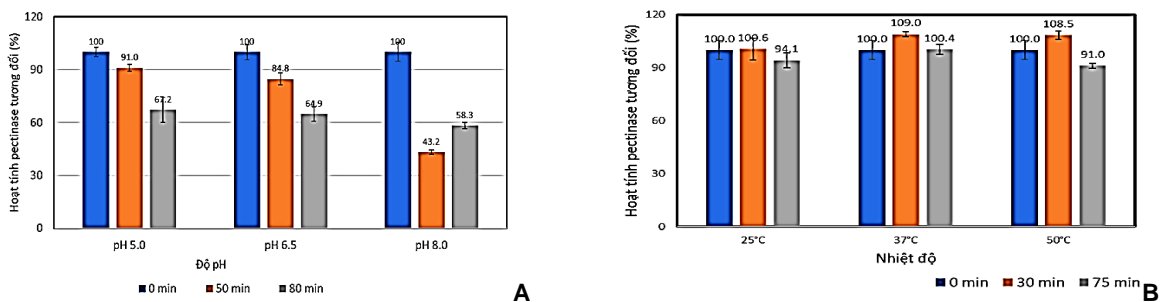
Phản ứng của dịch enzyme sau rửa muối amonium sulfate ở nồng độ 60% (w/v) và cơ chất pectin 0,5% (w/v) được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau từ 25 - 60°C để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính của pectinase. Song song, khảo sát pH phản ứng tối ưu sử dụng dịch enzyme pha loãng trong các đệm 0,1 M pH 5,0 - 8,0. Hoạt tính tương đối ở nhiệt độ 25°C tương đối thấp, chỉ còn 57,7%; trong khi đó, ở 60°C, hoạt tính của pectinase tăng mạnh đến trên 155% so với nhiệt độ phản ứng ở phương pháp gốc (50°C). Như vậy, nhiệt độ thích hợp cho phản ứng thử hoạt tính pectinase là 60°C. Một số nhóm nghiên cứu trước đây cho rằng pectinase từ chi *Bacillus*, hoạt động tối ưu trong khoảng nhiệt độ 45 - 60°C ((Rehman *et al.*, 2015), nhưng thấp hơn so với pectinase của *B. licheniformis* UNP-1 khi phản ứng ở 80°C (Jadhav and Pathak, 2019). Khảo sát pH phản ứng thích hợp, cho thấy hoạt tính pectinase tương đối đạt trên 70% trong khoảng pH phản ứng 5,0 - 8,0, Hoạt tính pectinase đạt cực đại ở pH trung tính 7,0. Kết quả này tương đồng với pectinase từ *Bacillus* hoạt động trong khoảng pH thích hợp 5,0 - 8,0 (Alqahtani *et al.*, 2021, Prajapati *et al.*, 2021).



Hình 2. Ảnh hưởng của điều kiện phản ứng lên hoạt tính pectinase  
A. Ảnh hưởng của nhiệt độ; B. Ảnh hưởng của Ph.

**Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến độ bền của pectinase**

Pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 tương đối bền sau 50 phút ủ ở pH acid, ngược lại, enzyme kém bền hơn khi được ủ với pH 8,0 với hoạt tính giảm mạnh còn 43,2%; tuy nhiên sau 75 phút, hoạt tính còn lại đều không đến 70%. Như vậy, pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 không bền trong môi trường base cũng như môi trường acid khi tiếp xúc một khoảng thời gian dài.



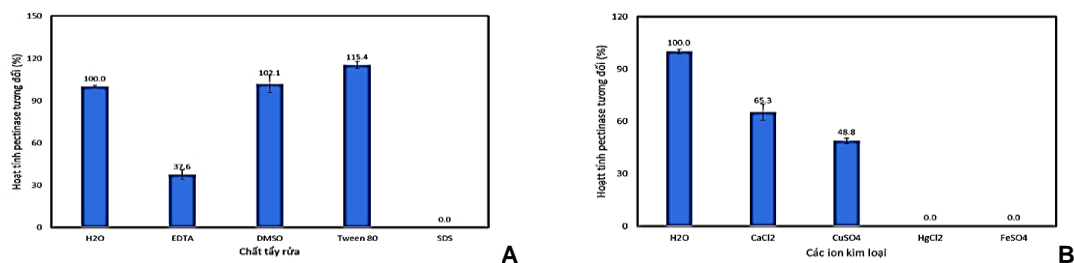
Hình 3. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên độ bền của pectinase  
A: Ảnh hưởng của pH; B: Ảnh hưởng của nhiệt độ.

Trong khi đó, *B subtilis* BK-3 sản xuất được pectinase bền trong dải pH rộng từ 4,0 - 10,0 (Prajapati *et al.*, 2021), độ bền pH của pectinase từ *B. licheniformis* KIBGE-IB21 lại nằm trong vùng base 8,0 - 10,0 (Rehman *et al.*, 2015). Pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 tương đối bền ở nhiệt độ từ 25°C đến 50°C khi giữ được hoạt tính trên 90% sau khi ủ 75 phút ở cả 3 nhiệt độ (Hình 3B), kết quả này đồng thuận với các pectinase khác có nguồn gốc từ *Bacillus* (Rehman *et al.*, 2015, Prajapati *et al.*, 2021).

**Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa và ion kim loại lên hoạt tính của pectinase**

Dịch enzyme được ủ với một số chất thường được sử dụng trong tẩy rửa như dimethyl sulfoxid (DMSO), Tween 80, SDS và EDTA nồng độ 2% (w/v); ủ với FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub> và CaCl<sub>2</sub> nồng độ 2% (w/v) trong 1 giờ.





Hình 4. Ảnh hưởng của các chất ức chế lên hoạt tính pectinase

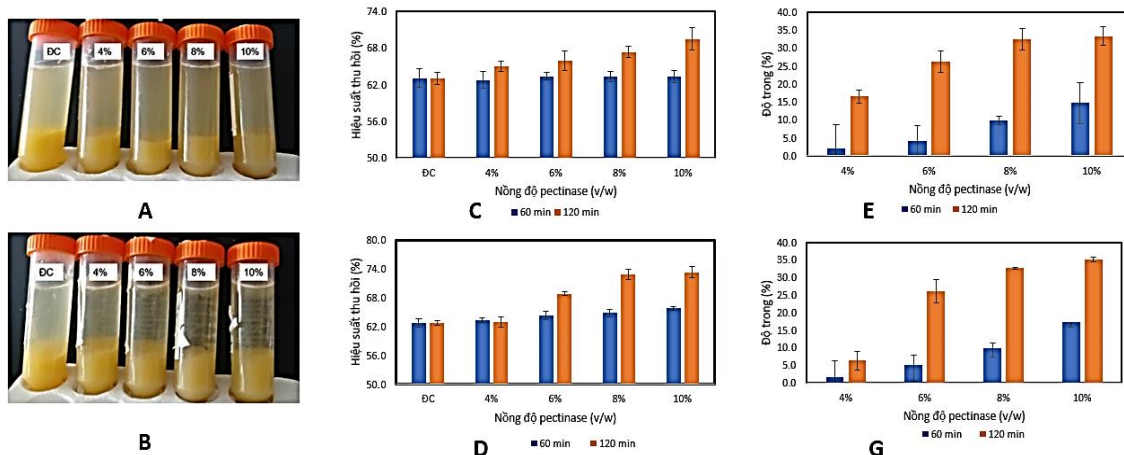
A. Chất tẩy rửa; B. Ion kim loại.

Trong các loại chất diện hoạt, SDS làm mất khả năng phân giải pectin sau 1 giờ ủ và EDTA gây giảm hoạt tính đáng kể, còn 37,6 ± 3,4 %. Mặt khác, DMSO gần như không ảnh hưởng hoạt tính pectinase còn Tween 80 có xu hướng giúp tăng hoạt tính của pectinase. Dựa vào tính chất này, có thể phối hợp pectinase vào các chất hoạt động bề mặt để tăng hiệu quả làm sạch (trong tẩy rửa) hay bóc vỏ (trong công nghiệp nhẹ) cũng như ứng dụng trong các ngành công nghiệp thích hợp. Kết quả cũng cho thấy ion Ca<sup>2+</sup> và Cu<sup>2+</sup> làm giảm đáng kể hoạt tính của pectinase sau 1 giờ ủ, trong khi HgCl<sub>2</sub> và FeSO<sub>4</sub> làm mất hoàn toàn hoạt tính của enzyme. Một số nghiên cứu pectinase từ *Bacillus* khác lại cho thấy Ca<sup>2+</sup> không ảnh hưởng hoặc làm tăng hoạt tính của pectinase, trong khi Hg, Fe, Cu và một số kim loại nặng khác đều có tác động tiêu cực đến hoạt tính của enzyme này (Alqahatani *et al.*, 2021, Prajapati *et al.*, 2021).

### Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pectinase lên nước ép hoa quả

Sau khi ủ pectinase với dịch ép dứa 60 phút và 120 phút, hiệu suất thu hồi được thể hiện trong hình 5. Qua hình 5A và 5B, nồng độ pectinase 8% và 10% (w/v) trong 120 phút làm cho dịch ép dứa trở nên trong suốt rõ rệt. Điều này cũng được chứng minh thông qua với kết quả đo độ thu hồi và độ trong của dịch ép sau khi xử lý bằng pectinase.

Với dịch pectinase thô, trừ mẫu đối chứng không thay đổi hiệu suất thu hồi theo thời gian ủ, các mẫu nước ép dứa có ủ với pectinase đều có hiệu suất và độ trong tăng dần theo thời gian. Trong đó, hiệu suất tốt nhất đạt được ở nồng độ 10% sau khi ủ 120 phút, cao hơn mẫu đối chứng 6,4% (Hình 5C); cũng tại nồng độ này, độ trong cao nhất đạt 33,4% sau 120 phút ủ (Hình 5E). Xu hướng tương tự cũng xảy ra khi sử dụng pectinase tủa muối ở nồng độ 60%. Nồng độ và thời gian tối ưu cho xử lý nước ép trái cây là 10% trong 120 phút, với độ trong đạt 35,1% và độ thu hồi đạt 73,3%, cao hơn so với kết quả của dịch enzyme ban đầu (Hình 5D và 5G).



Hình 5. Ảnh hưởng của pectinase lên nước ép dứa

A, B: Cảm quan dịch ép dứa sau khi ủ với các nồng độ khác nhau ở lần lượt 60 phút và 120 phút; C: Hiệu suất thu hồi khi ủ với pectinase thô; D: Hiệu suất thu hồi sau khi ủ với pectinase tinh sạch sơ bộ; E: Độ trong dịch ép dứa khi ủ với pectinase thô; G: Độ trong của dịch ép dứa khi ủ với pectinase tinh sạch sơ bộ.

Mặt khác, hiệu suất thu hồi dịch dứa khi ủ với pectinase Fluka ở nồng độ 0,03% (w/w) đạt 85,29%; còn độ trong có thể lên đến gần 40% (Tochi *et al.*, 2009). Như vậy, khả năng làm trong của pectinase từ *B. licheniformis* V114 tương đối tốt khi sử dụng ở nồng độ cao, giúp tăng giá trị thẩm mỹ và hiệu quả trong xử lý nước ép hoa quả.

### Ảnh hưởng của pectinase đến khả năng bóc vỏ cây

Để có thể ứng dụng pectinase vào quá trình bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng ở quy mô pilot và nâng lên quy mô công nghiệp, cần có đánh giá ban đầu về tác động của pectinase đến vỏ cây. Thử nghiệm khả năng thủy phân pectin trên lớp cambi của vỏ cây gỗ keo, sử dụng pectinase ban đầu có hoạt lực là 54,782 ± 1,368 U/L.

Lượng đường khử mà pectinase tạo ra ở mẫu thí nghiệm (có enzyme) tăng dần theo thời gian và luôn cao hơn so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, tốc độ phản ứng giảm dần và hoạt tính pectinase chỉ còn  $61,251 \pm 1,235$  U/L sau 4 giờ ủ. Hoạt tính cao nhất đạt  $141,665 \pm 28,114$  U/L sau 30 phút ủ với với vỏ cây theo tỷ lệ 50mL enzyme/10 g vỏ cây ở nhiệt độ phòng, cao hơn nhiều so với hoạt tính ban đầu khi phân hủy cơ chất pectin ở 50°C. Như vậy, pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 hoàn toàn có khả năng thủy phân pectin trong lớp cambi của vỏ cây gỗ keo, cho thấy tiềm năng ứng dụng pectinase trong quá trình bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng. Mặt khác, Raetoe và đồng tác giả (1993) khi sử dụng pectinase nồng độ 185 nkat/mL, năng lượng tiêu thụ trong quá trình bóc vỏ cây vãn sam đã giảm tới 80% (Raetoe *et al.*, 1993). Do thành phần phức tạp của lớp cambi, có thể cần phối hợp với các hydroxylase khác thủy phân các thành phần vỏ bên trong khác nhau để tách vỏ cây hiệu quả hơn.

**Bảng 2. Kết quả hoạt tính pectinase phân hủy lớp cambi của vỏ cây**

Thời gian (phút)	Nồng độ đường khử ( $\mu\text{mol/mL}$ )		Hoạt tính (U/L)
	Mẫu enzyme	Mẫu đối chứng	
30	$11,092 \pm 1,066$	$7,352 \pm 0,306$	$141,665 \pm 28,114$
60	$15,648 \pm 0,720$	$8,212 \pm 0,300$	$123,934 \pm 12,002$
120	$19,497 \pm 1,038$	$9,765 \pm 0,388$	$81,104 \pm 8,647$
180	$19,323 \pm 0,319$	$6,933 \pm 0,242$	$68,833 \pm 1,773$
240	$21,531 \pm 0,296$	$6,831 \pm 0,296$	$61,251 \pm 1,235$

## KẾT LUẬN

Pectinase từ chủng *Bacillus licheniformis* V114 được tinh sạch sơ bộ bằng phương pháp tủa muối amonium sulfate nồng độ 60% để thu được hoạt tính cao nhất đạt  $103,6 \pm 5,5\%$ . Enzyme này tương đối bền trong khoảng nhiệt độ từ 25 – 50°C, tuy nhiên kém bền trong pH acid hoặc base. Ngoài DMSO và Tween 80 không làm giảm hoạt tính, SDS, EDTA và các ion kim loại đều ức chế hoạt tính phân hủy pectin sau 1 giờ ủ. Trong xử lý nước ép hoa quả, ở nồng độ 10% và sau 2 giờ ủ, pectinase từ *B. licheniformis* V114 cho hiệu quả làm trong tốt nhất. Bên cạnh đó, khi ngâm với lớp cambi của vỏ cây, hoạt tính phân hủy pectin hoạt động hiệu quả với hoạt tính cao nhất đạt được sau 30 phút ủ ( $141,665 \pm 28,114$  U/L) và tốc độ phản ứng giảm dần theo thời gian.

**Lời cảm ơn:** Công trình được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu quy trình công nghệ và mô hình thiết bị sản xuất chế phẩm enzyme pectinase và hemicellulase ứng dụng bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng” mã số ĐTKHCN.017/22 cấp Bộ Công thương và trang thiết bị của Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alqahtani F, Aly M, Bokhari F, El-Nouet B, Alshehri W (2021). Isolation and Characterization of Exopectinase from *Bacillus licheniformis* FMB9 Isolated from Agricultural Soil. *J Contemp Med Sci*, 7(5): 308-314.
- Demir N, Nadaroglu H, Tasgin E, Adiguzel A & Gulluce M (2011). Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production. *Ann Microbiol*, 61: 939-946.
- Ghani M, Ansari A, Aman A, Zohra RR, Siddiqui NN, Qader SAU (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak J Pharm Sci*, 26(4): 691-697.
- Haile S and Ayele A (2022). Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *Sci World J*, Article ID 1881305, 15 pages.
- Jadhav SR, Pathak AP (2019). Production and characterization of a thermo-pH stable pectinase from *Bacillus licheniformis* UNP-1: A novel strain isolated from Unapdev hot spring. *Indian J Geo Mar Sci*, 48(5): 670-677.
- Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R (2000). Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J Microbiol Biotechnol*, 16: 277-282.
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*, 47(1): 69-85.
- Prajapati J, Dudhagara P and Patel K (2021). Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification. *Biocatal Agric Biotechnol*, 35: 102063.
- Raetoe M, Kantelinen A, Bailey A, Viikari L (1993). Potential of enzymes for wood debarking. *Tappi J* (United States), 76:2.
- Rehman HU, Aman A, Nawaz MA, Qader SA (2015). Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. *Food Hydrocoll*, 43: 819-824.
- Saharan R and Sharma KP (2019). Production, purification and characterization of pectin lyase from *Bacillus subtilis* isolated from moong beans leaves (*Vigna radiata*). *Biocatal Agric Biotechnol*, 21: 101306.
- Tochi BN, Wang Z, Xu SY and Zhang W (2009). The Influence of a Pectinase and Pectinase/hemicellulases Enzyme Preparations On percentage Pineapple Juice Recovery, Particulates and Sensory Attributes. *Pak J Nut*, 8: 1184-1189.
- Wingfield P (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci*, Appendix 3: p. Appendix 3F.

## PECTINASE ACTIVITY FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS* V114 STRAIN: APPLICATION IN FRUIT JUICE TREATMENT AND WOOD DEBARKING

Nguyen Nhat Linh<sup>1</sup>, Do Thi Tuyen<sup>1,2</sup>, Le Thanh Hoang<sup>1</sup>, Vu Thanh Tung<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thao<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Anh Tuyet<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hien Trang<sup>1</sup>, Nguyen Sy Le Thanh<sup>1</sup>, Luu Minh Duc<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Trung<sup>2</sup>, Dao Thi Mai Anh<sup>3</sup>, Nguyen Thi Minh Phuong<sup>1</sup>, Phan Thi Hong Thao<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hong Lien<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Hanoi University of Pharmacy

### SUMMARY

Pectinase is an enzyme that is of crucial importance in ecologically responsible industries. In this study, *Bacillus licheniformis* V114 culture supernatant was preliminarily purified utilizing several protein precipitation techniques, ammonium sulfate salt precipitation at 60% concentration resulted in the highest pectinase activity of  $1319.656 \pm 63.688$  U/L, which retained the initial activity with  $103.6 \pm 5.5\%$ . Pectinase from *B. licheniformis* strain V114 reacted optimally at 60°C and neutral pH. After 75 minutes of incubation, this enzyme maintained about 90% of its activity at 25–50°C; however, its stability decreased at acidic or basic pH. *B. licheniformis* strain V114 pectinase was unaffected by DMSO and activated by Tween 80 (115.4%). While CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, and EDTA severely inhibited this enzyme, yielding 65.3%, 48.8%, and 37.6% residual activity; SDS, HgCl<sub>2</sub>, and FeSO<sub>4</sub> totally inhibited the catalytic activity. The highest recovery efficiency and clarity were achieved by incubating pineapple juice with 10% pectinase enzymes for 120 minutes, in which, the initially purified enzyme solution yielded improved outcomes. The pectinase hydrolysis capability on the cambium layer peaked at  $141.665 \pm 28.114$  U/L after 30 minutes. During the 30 minutes to 4 hours incubation period, the reducing sugar concentration increased but the response rate decreased.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis* V114, fruit juice treatment, pectinase, wood debarking.

---

\* Author for correspondence: Tel: 024.37916882; Email: nhlien@ibt.ac.vn

## NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN LACTIC SINH TỔNG HỢP VITAMIN K2 ỨNG DỤNG LÊN MEN DỊCH ÉP RAU QUẢ

Đinh Huy Sơn, Đặng Thu Hương\*, Lộc Tú Anh, Nguyễn La Anh

Viện Công nghiệp Thực phẩm

### TÓM TẮT

Xu hướng phát triển thực phẩm giàu vitamin K2 đang được quan tâm bởi vai trò quan trọng của nó trong việc kích hoạt các quá trình liên quan tới khả năng nhận thức ở não bộ, vận chuyển canxi vào chất nền xương và loại bỏ mảng bám canxi ở mạch máu. Nghiên cứu tập trung vào tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng tổng hợp vitamin K2 và an toàn, làm giống khởi động cho lên men nước ép từ một số loại thực vật. Khảo sát 29 chủng vi khuẩn lactic (LAB) cho thấy, chỉ 10 chủng có khả năng tổng hợp được vitamin K2, với hàm lượng từ 0,46 – 7,56 mg/g sinh khối khô. Tám chủng có hiệu quả tổng hợp cao, không có độc lực gây tan huyết, có kiểu hình kháng với các kháng sinh: kanamycin, streptomycin, gentamicin và ampicilin; nhạy cảm với erythromycin, chloramphenicol nhưng 6/8 chủng này mang ít nhất một trong các gen kháng kháng sinh: *tetM* (kháng tetracycline); *parC*, *gyrA* (kháng ciprofloxacin); *vanX* (kháng vancomycin) và *aac(6)Ie-aph(2)Ia* – kháng gentamicin. Hai chủng *Lb. fermentum* PK1 và *Lb. plantarum* LD3, không mang gen kháng kháng sinh, được sử dụng để lên men nước ép từ đu đủ, rau bina, bông cải xanh, bắp cải và cần tây. Sau 48 giờ lên men, chủng PK1 tạo ra lượng vitamin K2 (1,30 – 2,52 µg/mL) từ nước ép các loại rau cao hơn đáng kể so với chủng LD3 (0,26 – 1,01 µg/mL).

Từ khóa: Giống khởi động, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, vitamin K2.

### MỞ ĐẦU

Trong tự nhiên, vitamin K tồn tại dưới hai dạng, vitamin K1 (phyloquinone), một hợp chất đơn lẻ, phổ biến ở thực vật và vitamin K2 (menaquinone), gồm một nhóm các hợp chất có chung vòng 2-methyl-1,4-naphthoquinone, khác nhau về số lượng đơn vị isoprenoid (4 – 13) chuỗi bên ở vị trí C3 của vòng naphthoquinone, chủ yếu được tổng hợp bởi vi khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn đường ruột. Do sự khác biệt về cấu trúc, vitamin K2 được cho là có hoạt tính sinh khả dụng tốt hơn và thời gian bán hủy dài hơn vitamin K1. Ở người, vitamin K2 là tác nhân kích hoạt Osteocalcin – một protein được tạo bởi các nguyên bào xương, có tác dụng hấp thụ và vận chuyển canxi vào chất nền xương và protein MGP (Matrix Gla protein) – có ái lực cao với ion  $Ca^{2+}$  trong mạch máu, ngăn ngừa tình trạng vôi hóa mạch máu. Ngoài ra, vitamin K2 có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư gan; bảo vệ các tế bào thần kinh khỏi độc tính của  $\beta$ -amyloid peptide – một trong những tác nhân gây ra bệnh Alzheimer và kích hoạt hai protein liên quan tới quá trình nhận thức trong não: protein Gas6 và protein S. Nhiều dạng menaquinone (MK5 – MK10) đã được tìm thấy ở các vi khuẩn lactic (Morishita *et al.*, 1999). Đây là nhóm vi khuẩn có ý nghĩa quan trọng đối với con người, cả về mặt tự nhiên và công nghệ. Bên cạnh ứng dụng lên men và bảo quản thực phẩm, các vi khuẩn này góp phần tích cực vào cải thiện sức khỏe vật chủ khi đi vào đường tiêu hóa, thông qua sản phẩm lên men hoặc probiotic.

So với các sản phẩm sữa lên men, các sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật có ưu thế loại bỏ được những lo ngại liên quan đến tình trạng không dung nạp lactose, hàm lượng cholesterol, chất béo cao, đồng thời làm hài lòng những người tiêu dùng thuần chay hoặc dị ứng với sữa. Các lợi ích khác đối với sức khỏe của những sản phẩm này bao gồm, cung cấp các axit hữu cơ, vitamin, hợp chất hoạt tính sinh học và khoáng chất, cũng như tăng cường khả năng hấp thu các flavonoid – giúp cải thiện sức khỏe đường ruột, tăng cường hoạt tính chống oxy hóa và chức năng miễn dịch, được giải phóng ra bởi các hoạt động của vi khuẩn. Hơn nữa, việc sản xuất các đồ uống lên men từ thực vật bởi vi khuẩn lactic (LAB) không chỉ làm tăng giá trị của các sản phẩm mà còn như là một giải pháp hạn chế sự lãng phí nhiều loại rau và trái cây, bằng cách tăng thời hạn sử dụng của chúng. Mục đích của nghiên cứu này nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp vitamin K2, đánh giá tính an toàn và khả năng lên men nước ép từ một số loại thực vật, nhằm tạo giống khởi động, ứng dụng trong sản xuất sản phẩm giàu vitamin K2.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu

Các chủng vi khuẩn lactic chủ yếu phân lập từ thực phẩm, ngoại trừ hai chủng PK1 và SH2, có nguồn gốc từ con người, được lấy từ Bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm (Bảng 1).

**Bảng 1. Danh sách chủng vi khuẩn lactic và nguồn phân lập**

Tên loài	Chủng	Nguồn phân lập	Tên loài	Chủng	Nguồn phân lập
<i>Lb. brevis</i>	HL1	Tương ớt	<i>Lb. plantarum</i>	0-17	Nem chua Thanh Hóa
	LDB4	Chuối tiêu		SNC2	Sữa chua
	NCTH24	Nem chua Thanh Hóa		BAC52	Nem chua Thanh Hóa
<i>Lb. casei</i>	AHOP1	Sữa lên men		NCDC3	Nem chua Đội Cung
<i>Lb. fermentum</i>	SYG1	Sữa chua		DL2	Men rượu
	PK1	Phân trẻ sơ sinh		6-4	Nem chua Thanh Hóa
	SBV2	Sữa chua		LD12	Dưa muối
<i>Lb. farraginis</i>	EMP3	Thực vật lên men		LD2	Vỏ cam
<i>Lb. nuruki</i>	LDB1	Chuối tiêu		LD3	Dưa muối
<i>Lb. paracasei</i>	BLTV	Sữa lên men		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	MAI416
	SH2	Sữa mẹ	MG1114		Sữa lên men
<i>Lb. pentosus</i>	NCDN4	Nem chua Đà Nẵng	VNC1		Sữa lên men
<i>Lb. rhamnosus</i>	SELV1	Sữa chua	BD4		Bã đậu
<i>Lb. spicheri</i>	LDB2	Chuối tiêu	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	VNC53	Sữa lên men
			<i>Str. thermophilus</i>	T21	Sữa lên men

Các loại thực vật: đu đủ, rau bina, bông cải xanh, bắp cải và cần tây (WinMart, Hà Nội), sau khi rửa sạch bằng nước máy, xay (Supermum, HF2001PS, Đà Loan) với nước cất (tỷ lệ 1:2, w/v), lọc qua vải lọc và thanh trùng ở 100°C/ 10 phút, được dùng để lên men.

**Phương pháp nghiên cứu**

*Phương pháp xác định vitamin K2*

Khả năng sinh tổng hợp vitamin K2 của các chủng LAB, được khảo sát trên môi trường MRS (Merck, Đức), theo mô tả của Morishita và đồng tác giả (1999). Vitamin K2 (có trong sinh khối tế bào và nước ép rau quả lên men, đông khô bởi thiết bị Virtis, Mỹ) được tách chiết và làm sạch theo mô tả của Collins (1985), với pha tĩnh - TLC silica gel 60 F254 (Merck) và pha động - hỗn hợp dung môi hexane/diethyl ether (Trung Quốc), tỷ lệ 9:1. Sau tinh sạch, vitamin K2 được định lượng theo mô tả Junying và đồng tác giả (2014), sử dụng máy đo quang phổ (Ultrospec 7000, Biochrom). Hàm lượng vitamin K2 được tính dựa trên giá trị mật độ quang ở bước sóng 248 nm và phương trình tuyến tính với chất chuẩn là menaquinone-4 (Sigma-Aldrich). Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

*Phương pháp xác định sự tương tác với kháng sinh*

Tính nhạy cảm hay kháng của các vi khuẩn lactic đối với 10 loại kháng sinh, theo hướng dẫn của Ủy ban an toàn thực phẩm Châu Âu (EFSA), gồm erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, ampicillin, kanamycin, vancomycin và streptomycin (Sigma-Aldrich), được xác định như trong mô tả trước đó của chúng tôi (Đặng Thu Hương *et al.*, 2023).

**Bảng 2. Giá trị cắt vi sinh của các loài vi khuẩn lactic và dải nồng độ kháng sinh khảo sát**

Kháng sinh		Giá trị cắt vi sinh (µg/mL)				Dải nồng độ kháng sinh khảo sát (µg/mL)
Loại	Kí hiệu	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	
Erythromycin	ERY	1	1	1	1	0,125 - 16
Chloramphenicol	CHL	4	8	4	8	0,5 - 64
Tetracycline	TET	8	32	4	4	0,5 - 64
Clindamycin	CLI	4	4	4	1	0,125 - 16
Ciprofloxacin	CIP	nr(*)	nr	nr	nr	0,5 - 64
Gentamicin	GEN	16	16	32	32	1 - 128
Ampicillin	AMP	2	2	4	2	0,125 - 16
Kanamycin	KAN	64	64	64	64	1 - 128
Vancomycin	VAN	nr	nr	nr	4	0,25 - 32
Streptomycin	STR	64	nr	64	32	2 - 128

(\*) nr: not required – không yêu cầu.

**Phương pháp tách chiết DNA và sàng lọc gen kháng kháng sinh**

Hệ gen của các chủng LAB được tách chiết và tinh sạch theo kit G – Spin™ (Hàn Quốc). Gen kháng kháng sinh, 23 gen, quy định sự kháng đối với 10 loại kháng sinh trên, gồm gen *ermB*, *ermB-I*, *ermC* (erythromycin); *catA*, *cat* (chloramphenicol), *tetM*, *tetK*, *tetN* (tetracycline); *lnuA*, *lnuB* (clindamycin); *gyrA*, *parC* (ciprofloxacin); *aph(6'')-aph(2'')*, *aac(6'')le-aph(2'')*la (gentamicin); *blaZ*, *mecA*, *bla* (ampicillin); *ant(2'')-I* (kanamycin); *vanE*, *vanX* (vancomycin) và *ant(6)*, *aadA*, *aadE* (streptomycin), được khuếch đại bằng phương pháp PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu tương ứng (IDT, USA), mô tả như trong nghiên cứu trước của chúng tôi (Đặng Thu Hương *et al.*, 2023).

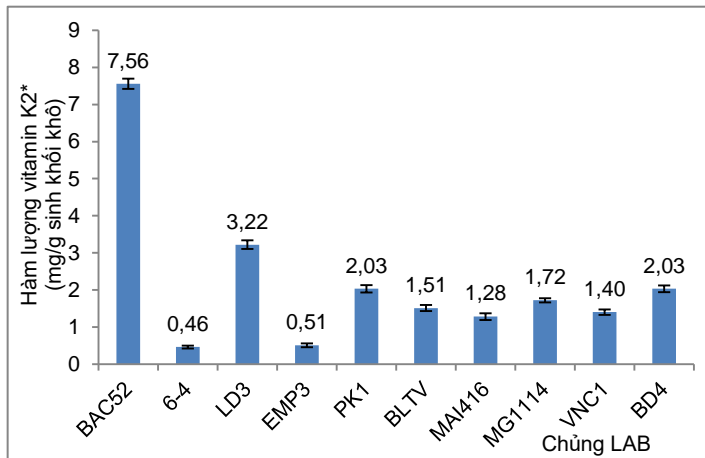
**Phương pháp xác định khả năng gây tan huyết**

Các vi khuẩn lactic được kiểm tra hoạt tính gây tan huyết trên môi trường thạch máu (7% v/v sheep blood), theo mô tả của Simone và đồng tác giả (2013).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

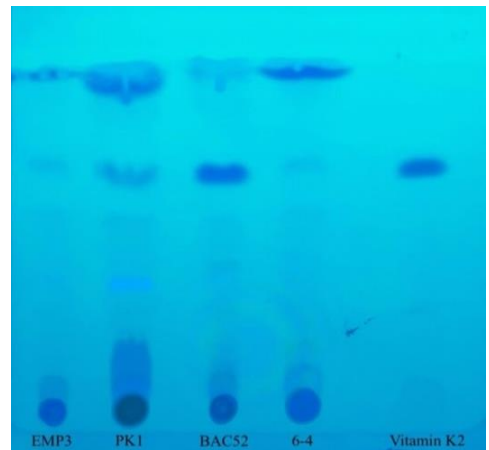
**Khả năng sinh tổng hợp vitamin K2 ở các chủng vi khuẩn lactic**

Kết quả sàng lọc khả năng sinh tổng hợp vitamin K2 (Hình 1) cho thấy đặc điểm này phụ thuộc vào từng loài và nguồn phân lập các chủng của loài. Trong số 29 chủng được khảo sát, hầu hết chủng *Lactococcus lactis* đều có sự hiện diện của băng vitamin K2 trên bản TLC, nhưng chỉ có 7/24 chủng *Lactobacillus* có khả năng tổng hợp vitamin K2. Kết quả này khá tương đồng với báo cáo của Morishita và đồng tác giả (1999), trong 21 chủng được khảo sát, tất cả các chủng *Lactococcus lactis* và 1/3 chủng *Lactobacillus* tổng hợp được vitamin K2. Khả năng này ở các chủng *Lactobacillus* cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu khác (Lim *et al.*, 2011).



Hình 1. Hàm lượng vitamin K2\* ở các chủng LAB

(\*) Hàm lượng vitamin K2, tính theo menaquinone-4 (MK4).



Hình 2. Sự hiện diện của băng vitamin K2 trên bản TLC dưới đèn UV

Hàm lượng vitamin K2 cao được quan sát thấy ở các chủng *Lactobacillus*, bao gồm *Lb. plantarum* BAC52, LD3 và *Lb. fermentum* PK1 với hàm lượng lần lượt 7,56; 3,22 và 2,03 (mg/g sinh khối khô). Trong khi đó, lượng vitamin K2 được tổng hợp bởi các chủng *Lc. subsp. lactis* không có sự khác biệt rõ ràng, dao động từ 1,28 – 2,03 mg/g sinh khối đông khô (tương đương 107,6 – 163,0 µg/L dịch lên men), tương đồng với lượng vitamin K2 (142 µg/L) được tạo ra bởi chủng *Lactobacillus lactis* MG1363 (Brooijmans *et al.*, 2009) và cao hơn chủng *Lc. subsp. lactis* YIT2027, 39 µg/L (Morishita *et al.*, 1999).

**Tính an toàn của các chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp vitamin K2**

**Sự kháng kháng sinh ở các chủng vi khuẩn lactic**

Các chủng vi khuẩn lactic trên, mặc dù được phân lập từ các nguồn an toàn (thực phẩm, sữa mẹ, trẻ sơ sinh) vẫn có thể chứa yếu tố tiềm ẩn, ảnh hưởng tới sức khỏe người tiêu dùng, trong đó sự kháng kháng sinh là yếu tố cần được xem xét. Kháng kháng sinh là một chiến lược sinh tồn tự nhiên của tất cả các vi sinh vật, bao gồm cả LAB. Trong khi kháng nội tại, không có khả năng truyền gen, được coi là lợi thế của vi khuẩn, đặc biệt là ở vi khuẩn probiotics, khi sử dụng đồng thời với kháng sinh (chẳng hạn như trong điều trị viêm loét dạ dày do vi khuẩn *Helicobacter pylori*), kháng kháng sinh do thu nhận gen, gây ra những lo ngại về mặt lâm sàng do có thể truyền ngang gen kháng kháng sinh cho các vi khuẩn gây bệnh khác, khi đi vào đường tiêu hóa. Theo Ủy ban an toàn thực phẩm châu Âu, chủng vi khuẩn được chọn làm probiotic, giống khởi động phải không mang gen kháng kháng sinh có thể truyền ngang (EFSA, 2018).

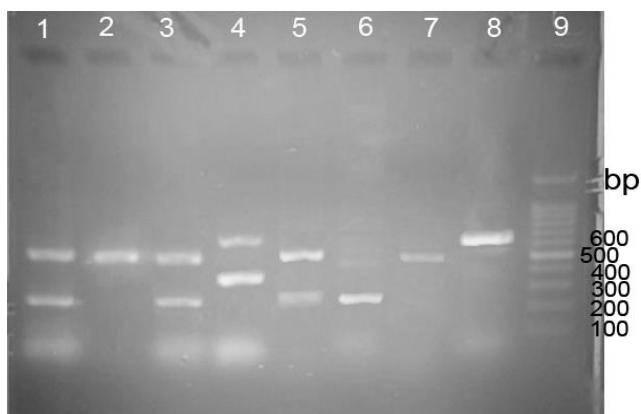
**Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu và kiểu gen kháng kháng sinh ở các chủng LAB**

Chủng	Nồng độ ức chế tối thiểu (µg/mL)										Kiểu gen kháng kháng sinh
	ERY	CHL	TET	CLI	CIP	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	
<i>Lb. fermentum</i> PK1	1	4	32	0,125	>64	>16	>32	>128	>128	>128	-
<i>Lb. paracasei</i> BLTV	0,25	2	64	4	>64	>16	>32	>128	>128	>128	parC
<i>Lb. plantarum</i> LD3	0,5	2	4	16	>64	>16	8	>128	>128	>128	-
<i>Lb. plantarum</i> BAC52	1	4	>64	1	>64	>16	>32	>128	>128	>128	parC, gyrA, vanX
<i>Lc. subsp. lactis</i> BD4	0,25	2	32	>16	32	>16	4	>128	>128	128	tetM, gyrA
<i>Lc. subsp. lactis</i> VNC1	0,125	0,5	2	0,125	16	8	2	>128	128	128	tetM; aac(6')Ie-aph(2'')Ia
<i>Lc. subsp. lactis</i> MAI416	1	2	1	0,25	16	>16	2	>128	>128	>128	parC, gyrA
<i>Lc. subsp. lactis</i> MG1114	1	2	4	0,25	>64	>16	8	>128	>128	>128	parC, gyrA

Chú thích: Số liệu in đậm thể hiện sự kháng với kháng sinh; (-): không phát hiện gen kháng kháng sinh.

Dữ liệu Bảng 3 cho thấy, 8 chủng sinh tổng hợp vitamin K2 cao, có kiểu hình nhạy cảm với erythromycin, chloramphenicol và kháng lại ampicillin, gentamicin, kanamycin và streptomycin. Sự kháng với aminoglycoside của các loài *Lactobacillus* và *Lactococcus* đã được ghi nhận trong nhiều báo cáo, được coi là kháng nội tại, chủ yếu liên quan tới tính thấm thấu kém của màng tế bào và sự vắng mặt của các kênh vận chuyển điện tử qua trung gian tế bào chất (Rachael *et al.*, 2023; Ammor *et al.*, 2007). Các chủng *Lactobacillus* được khảo sát đều có giá trị MIC vượt ngưỡng khảo sát đối với ciprofloxacin - ức chế tổng hợp DNA và vancomycin (ngoại trừ chủng LD3), ngược lại, trong 4 chủng *Lactococcus*, chỉ có chủng MG1114 có kiểu hình kháng vancomycin và giá trị MIC cao đối với ciprofloxacin.

Kết quả sàng lọc gen quy định tính kháng kháng sinh cho thấy, gen *parC*, *gyrA* mã hóa cho sự kháng ciprofloxacin được tìm thấy ở 5/8 chủng; gen *tetM* (kháng tetracycline) được phát hiện ở chủng *Lc. subsp. lactis* VNC1 (có kiểu hình nhạy cảm với tetracycline) và chủng BD4. Gen *vanX*, quy định sự kháng vancomycin và gen *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* – kháng gentamicin lần lượt được tìm thấy ở các chủng *Lb. plantarum* BAC52 và *Lc. subsp. lactis* VNC1. Các chủng này, trước khi được sử dụng vào chuỗi thực phẩm, cần được nghiên cứu thêm để xác định khả năng truyền ngang gen, như vị trí của gen kháng kháng sinh, sự có mặt của các yếu tố di truyền di động trong hệ gen.



**Hình 3. Đoạn khuếch đại gen kháng kháng sinh trên gel agarose 1%**

Chú thích giêng: 1: Chủng MAI416, gen *gyrA* (451bp) và *parC* (286bp); 2: Chủng BAC52, gen *vanX* (454bp); 3: Chủng BAC52, gen *gyrA* và *parC*; 4: Chủng VNC1, gen *tetM* (576bp) và *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* (348bp); 5: Chủng MG1114, gen *gyrA* và *parC*; 6: Chủng BLTV, gen *parC*; 7: Chủng BD4, gen *gyrA*; 8: Chủng BD4, gen *tetM*; 9: Thang DNA.



**Hình 4. Chủng *Lb. plantarum* LD3 trên môi trường thạch máu**

Hai chủng *Lb. fermentum* PK1 và *Lb. plantarum* LD3 không mang gen kháng kháng sinh, cho thấy đặc điểm kháng kháng sinh ở các chủng này là nội tại và không có khả năng truyền ngang sang các vi khuẩn khác.

**Độc lực gây tan huyết ở các chủng vi khuẩn lactic**

Một yếu tố khác liên quan đến độc lực là khả năng sản xuất cytolysin, một ngoại độc tố có hoạt tính tan huyết β. Phân tử này được coi là một chất kháng khuẩn (lantibiotic bacteriocin), nhưng cũng là một yếu tố độc lực khi xem

xét hoạt động chống lại các tế bào nhân chuẩn như hồng cầu và tế bào biểu mô ở người, gây ra sự khởi phát bệnh nhiễm trùng như viêm nội tâm mạc. Trong nghiên cứu này, cả 8 chủng đều không có hoạt tính gây tan huyết  $\beta$ .

**Khả năng lên men nước ép rau quả của các chủng sinh tổng hợp vitamin K2**

Hai chủng *Lb. fermentum* PK1 và *Lb. plantarum* LD3, không có hoạt tính tan huyết và không mang gen kháng kháng sinh, được dùng để khảo sát khả năng lên men nước ép từ một số loại thực vật, bao gồm đu đủ, rau bina, bông cải xanh, cần tây và bắp cải. So với chủng LD3, chủng PK1 có khả năng lên men tốt cả 5 loại thực vật và tổng hợp được lượng vitamin K2 cao hơn. Trong đó, nước ép rau bina lên men, có hàm lượng vitamin K2 cao nhất đạt 2,52  $\mu\text{g/mL}$  và mật độ tế bào chủng PK1 đạt  $4,50 \times 10^8$  CFU/ml, tương đồng với kết quả của Sang-Hee và đồng tác giả (2022), nước ép rau bina lên men bởi chủng *Lactococcus lactis*, có hàm lượng vitamin K2 đạt 1,89  $\mu\text{g/mL}$ .

**Bảng 4. Khả năng lên men nước ép rau quả của chủng *Lb. fermentum* PK1 và *Lb. plantarum* LD3**

Chủng giống	Thực vật	Trước lên men				Sau lên men			
		pH	Mật độ tiếp giống, CFU/mL	Đường tổng, g/L	Vitamin K2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	pH	Đường tổng, g/L	Mật độ tế bào, CFU/mL	Vitamin K2 ( $\mu\text{g/mL}$ )*
LD3	Đu đủ	5,3	$2,63 \pm 0,12 \times 10^6$	$31,07 \pm 1,31$	nd	3,7	$21,55 \pm 0,91$	$2,25 \pm 0,1 \times 10^7$	$0,43 \pm 0,01$
	Rau bina	6,0		$3,05 \pm 0,09$		3,7	$1,37 \pm 0,08$	$3,5 \pm 0,09 \times 10^7$	$0,35 \pm 0,01$
	Bông cải xanh	5,4		$5,50 \pm 0,16$		4,0	$2,89 \pm 0,10$	$1,75 \pm 0,1 \times 10^7$	$0,59 \pm 0,02$
	Bắp cải	5,3		$8,79 \pm 0,2$		4,2	$7,34 \pm 0,15$	$6,50 \pm 0,19 \times 10^6$	$1,01 \pm 0,04$
	Cần tây	5,2		$3,64 \pm 0,13$		4,5	$2,91 \pm 0,13$	$4,50 \pm 0,2 \times 10^7$	$0,26 \pm 0,01$
PK1	Đu đủ	5,3	$1,56 \pm 0,1 \times 10^6$	$31,07 \pm 1,31$	nd	3,1	$13,80 \pm 0,55$	$2,63 \pm 0,1 \times 10^8$	$0,55 \pm 0,01$
	Rau bina	6,0		$3,05 \pm 0,09$		4,6	$1,88 \pm 0,09$	$4,50 \pm 0,21 \times 10^8$	$2,52 \pm 0,10$
	Bông cải xanh	5,4		$5,50 \pm 0,16$		4,2	$2,03 \pm 0,10$	$2,00 \pm 0,08 \times 10^8$	$1,30 \pm 0,05$
	Bắp cải	5,3		$8,79 \pm 0,2$		3,4	$2,38 \pm 0,11$	$6,25 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,93 \pm 0,09$
	Cần tây	5,2		$3,64 \pm 0,13$		4,6	$0,93 \pm 0,05$	$3,45 \pm 0,14 \times 10^8$	$1,65 \pm 0,03$

Chú thích: nd: Không có sự hiện diện bằng vitamin K2 trên bản TLC; \* Hàm lượng vitamin K2, tính theo menaquinone-4 (MK4).

Nước ép rau bắp cải có thể không thích hợp cho cả hai chủng phát triển (thể hiện qua mật độ tế bào thấp) nhưng lượng vitamin K2 được hai chủng tạo ra tương đối cao, đạt 1,93  $\mu\text{g/mL}$  (chủng PK1) và 1,01  $\mu\text{g/mL}$  (chủng LD3). Hàm lượng vitamin K2 của các loại nước ép lên men này cao hơn đáng kể so với một số loại phomat, 0,5 – 32  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (Jensen et al., 2021), cho thấy tiềm năng của sản phẩm này trong việc thay thế các sản phẩm từ sữa, cung cấp vitamin K2 cho người tiêu dùng.

**KẾT LUẬN**

Trong 29 chủng LAB được khảo sát, chỉ 10 chủng có khả năng sinh tổng hợp vitamin K2, trong đó, hai chủng *Lb. plantarum* BAC52 và LD3 tổng hợp lượng vitamin K2 cao, tương ứng 7,56 và 3,22 mg/g sinh khối khô. Mặc dù không có nguy cơ gây tan huyết nhưng 6/8 chủng tổng hợp vitamin K2 cao, mang ít nhất một trong các gen kháng kháng sinh: *tetM*, *parC*, *gyrA*, *vanX* và *aac(6)'Ie-aph(2)''la*. Hai chủng *Lb. fermentum* PK1 và *Lb. plantarum* LD3, có đặc điểm kháng nội tại kháng sinh, được sử dụng để lên men nước ép từ một số thực vật gồm đu đủ, rau bina, bông cải xanh, bắp cải, cần tây. Chủng PK1 có khả năng tổng hợp vitamin K2 cao (1,30 – 2,52  $\mu\text{g/mL}$ ) khi lên men nước ép từ các loại rau, trong đó, nước ép rau bina lên men có hàm lượng cao nhất, 2,52  $\mu\text{g/mL}$ . Ngược lại, lượng vitamin K2 tạo bởi chủng LD3 tương đối thấp, chỉ đạt 1,01  $\mu\text{g/mL}$  ở mẫu nước ép rau bắp cải và dao động từ 0,26 – 0,59  $\mu\text{g/mL}$  ở các mẫu còn lại.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Ammor MS, Ana BF, Baltasar M (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Micro*, 24: 559–570.

Brooijmans R, Smit B, Santos F, van Riel J, de Vos W M and Hugenholtz J (2009). Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Micro Cell Fact*, 8: 1-11.

Collins M D (1985). Analysis of Isoprenoid Quinones. Methods in Microbiology, vol 18. Academic Press, USA.

Đặng Thu Hương, Đinh Huy Sơn, Lộc Tú Anh, Nguyễn La Anh (2023). Đặc điểm kháng kháng sinh của một số vi khuẩn lactic phân lập từ các sản phẩm sữa lên men. Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc, 521-526.

European Food Safety Authority (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms, *EFSA J*, 16(3): 5206-5230.

Jensen MB, Andrius D and Jette J (2021). Content and Bioaccessibility of Vitamin K (Phylloquinone and Menaquinones) in Cheese *Foods*, 10: 2938-2950.



- Junying S, Hongxia L, Li W, Jun D, Yan L, Hui L, Genhai Z, Peng W and Zhiming Z (2014). Enhanced production of vitamin K2 from *Bacillus subtilis* (natto) by mutation and optimization of the fermentation medium. *Braz Arch of Bio and Tech*, 57: 606-612.
- Morishita T, Tamura N, Makino T, Kudo S (1999). Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 82: 1897–1903.
- Rachael TD, Anamika S, Arundhati GW, Vikas S, Manvesh KS, Tochukwu NTN, Harsh P, Lewis IE (2023). Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. *BMC Micro*, 23: 142-160.
- Lim SD, Kim KS, and Do JR (2011). Physiological Characteristics and Production of Vitamin K2 by *Lactobacillus fermentum* LC272 Isolated from Raw Milk. *Korean J. Food Sc Ani Resour*, 31(4): 513-520.
- Sang-Hee L, Ah-Ram H, Byoung-Mok K, Mi JS and Sun-Mee H (2022). *Lactococcus lactis*-fermented spinach juice suppresses LPS-induced expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines through the NF- $\kappa$ B pathway in HUVECs. *Exp and Therap Med*, 23: 390-399.
- Simone P, Robson A, Thiago A, Flávio C, Adriano B (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37(1): 25-256.

## SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA AS POTENTIAL STARTER CULTURE PRODUCING VITAMIN K2 FOR PLANT-BASED JUICE FERMENTATION

Dinh Huy Son, Dang Thu Huong<sup>\*</sup>, Loc Tu Anh, Nguyen La Anh

Food Industries Research Institute

### SUMMARY

The demand for various foods rich in vitamin K2 has increased due to its essential role in numerous physiological processes involving the carboxylation of osteocalcin engaged in the formation of bone, matrix Gla protein (the most potent modulator of vascular calcification), and protein Gas6, protein S associated with brain cell development and survival. This study aimed to characterize several lactic acid bacteria to select strains producing vitamin K2 and being safe to use as starter cultures for plant-based juice fermentation. Among surveyed 29 lactic acid bacteria strains (LAB), ten strains were capable of synthesizing vitamin K2 with the content of 0.46 - 7.56 mg/g lyophilized cells, in which 8 strains showing a high content of vitamin K2 were analyzed for antibiotic susceptibility, the presence of antibiotic resistance genes, and hemolytic activity. All tested strains were phenotypically resistant to antibiotics: kanamycin, streptomycin, gentamicin, and ampicillin; sensitive to erythromycin and chloramphenicol; and did not exhibit  $\beta$ -hemolysis activity. However, six out of these strains carried at least one of the antibiotic resistance genes: *tetM* (tetracycline resistance); *parC*, *gyrA* (ciprofloxacin resistance); *vanX* (vancomycin resistance), and *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, responsible for the gentamicin resistance. *Lb. fermentum* PK1 and *Lb. plantarum* LD3 strains, did not carry any antibiotic resistance genes, were used to ferment papaya, spinach, broccoli, cabbage, and celery juices. After 48 hours, the content of vitamin K2 (1.30 - 2.52  $\mu$ g/mL) in vegetable juices fermented by *Lb. fermentum* PK1 was significantly higher than that by strain LD3 (0.26 - 1.01  $\mu$ g/mL).

**Keywords:** Starter culture, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, vitamin K2.

<sup>\*</sup> Author for correspondence: Tel: 0904398264; Email: huongdt@firi.vn

## SÀNG LỌC VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH L-LACTIC ACID CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Lactobacillus plantarum* P7

Lê Thị Ánh Tuyết<sup>1,2</sup>, Hoàng Phương Hà<sup>1,2</sup>, Nguyễn Kim Thoa<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Minh<sup>1,2</sup>,  
Bùi Hương Giang<sup>1,2</sup>, Trần Xuân Khôi<sup>1</sup>, Đào Thị Ngọc Ánh<sup>1</sup>, Hoàng Minh Khuê<sup>3</sup>, Chu Nhật Huy<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường THCS & THPT Nguyễn Tất Thành, Hà Nội

### TÓM TẮT

L-lactic acid là nguyên liệu chính được sử dụng trong sản xuất nhựa sinh học. L-lactic acid thường được sản xuất thông qua quá trình lên men vi sinh vật, vừa tiết kiệm chi phí vừa thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, trong quá trình lên men, vi khuẩn thường tổng hợp ra hỗn hợp hai đồng phân L và D của lactic acid, để xác định thành phần của hai đồng phân này, các phương pháp như phân tích sắc ký trao đổi ion, sắc ký lỏng hiệu năng cao,... được sử dụng rộng rãi. Nhưng hầu hết các phương pháp này đều có nhược điểm về yêu cầu tiền xử lý phức tạp, dụng cụ đắt tiền làm tăng chi phí và thời gian. Mặt khác, L-lactic acid có thể tạo phức với boric acid, ngăn chặn sự ức chế của boric acid đối với phản ứng màu giữa enzyme tyrosinase và L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), giúp cho phản ứng được diễn ra tạo nên dung dịch màu nâu đỏ. Trong nghiên cứu này, 17 chủng vi khuẩn được phân lập có khả năng sinh lactic acid tổng số với nồng độ 28 - 40 g/L. Khi sử dụng phương pháp phản ứng màu của enzyme để sàng lọc khả năng sinh L-lactic acid, chủng P7 đã được xác định có thể tổng hợp L-lactic acid với hàm lượng cao nhất đạt 32,26 g/L sau 48 giờ lên men, chiếm 94,5% hàm lượng lactic acid tổng số tạo thành. Thông qua giải trình tự 16S-rRNA, chủng P7 được xác định là *Lactobacillus plantarum* P7. Việc sử dụng phương pháp enzyme trong xác định nồng độ L-lactic acid đã giúp rút ngắn thời gian lựa chọn các chủng vi khuẩn tiềm năng, với mục đích biến đổi gene nhằm nâng cao hiệu suất sản xuất L-lactic acid để sản xuất nhựa sinh học ở quy mô pilot trong các nghiên cứu sau này.

*Từ khóa:* Lactic acid, L-lactic acid, *Lactobacillus plantarum*, lên men, phản ứng hóa sinh.

### MỞ ĐẦU

Lactic acid là một acid hữu cơ, tồn tại dưới hai dạng đồng phân quang học là D(-)-lactic acid và L(+)-lactic acid, trong đó L(+)-lactic acid là đồng phân sinh học quan trọng và được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực như: công nghiệp thực phẩm, nông nghiệp, dược phẩm và y tế, hóa chất... Ngoài ra, L-lactic acid còn đóng vai trò là tiền chất để tổng hợp nên polylactic acid (PLA) - một loại polyester có khả năng phân hủy sinh học và thay thế các sản phẩm nhựa truyền thống có nguồn gốc từ dầu mỏ (Augustiniene *et al.*, 2022). Lactic acid có thể được tổng hợp bằng phương pháp hóa học hoặc bằng lên men vi sinh vật. Trong khi tổng hợp hóa học từ các nguồn hóa dầu luôn tạo ra hỗn hợp của D,L-lactic acid, việc phân tách 2 dạng đồng phân này đòi hỏi quy trình phức tạp, tốn chi phí thì quá trình lên men lactic acid bởi vi sinh vật giúp sản xuất lactic acid có độ tinh khiết cao hơn (Komesu *et al.*, 2017). Hiện nay, một số chủng vi khuẩn được phát hiện có khả năng sinh lactic acid thường thuộc các chi như: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*... Trong đó, các chủng thuộc chi *Lactobacillus* được ứng dụng thương mại nhiều do khả năng chịu acid cao, năng suất cao, và có thể cải biến để sản xuất chọn lọc đồng phân quang học L(+)- hoặc D(-)- lactic acid (Castillo Martinez *et al.*, 2013). Senedese *et al.*, (2015) báo cáo rằng chủng vi khuẩn *L. rhamnosus* ATCC 10863 có thể tạo ra 16,5 g/L L-lactic acid khi lên men theo mẻ.

Để xác định hàm lượng lactic acid trong hỗn hợp lên men có thể sử dụng phương pháp như sắc ký lỏng hiệu năng cao, hay sắc ký trao đổi ion nhưng các phương pháp này yêu cầu tiền xử lý mẫu, chi phí cao. Vì vậy, chúng tôi áp dụng rộng rãi trong quá trình sàng lọc các chủng sinh L-lactic acid từ bộ sưu tập chủng giống ban đầu có kích thước lớn. Gần đây, Zhaoqi Ran *et al.*, (2023) đã đưa ra phương pháp định lượng L-lactic acid dựa trên phản ứng sinh hóa tạo màu của enzyme tyrosinase với L-DOPA. Khi môi trường phản ứng có chứa boric acid, hợp chất này sẽ liên kết với L-DOPA khiến cho phản ứng với enzyme bị ức chế làm nhạt màu của phản ứng. Tuy nhiên L-lactic acid có thể tạo phức với boric acid làm ngăn cản hoạt động của chất ức chế dẫn đến sự phục hồi màu của phản ứng.

Do vậy trong nghiên cứu này, các mẫu thực phẩm lên men đã được sử dụng để phân lập ra bộ sưu tập chủng giống có khả năng sinh lactic acid. Sử dụng phương pháp hóa sinh nêu trên có thể giúp định lượng nhanh hàm lượng L-lactic acid trong dịch lên men của vi khuẩn. Từ đó giúp đơn giản hóa quá trình sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh L-lactic tiềm năng ứng dụng cho các nghiên cứu sau này.

**NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Nguyên liệu:** Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ các mẫu thực phẩm lên men sử dụng môi trường MRS với công thức (g/L): Pepton 10, cao thịt 10, cao nấm men 5, glucose 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05, triamonium citrate 5, tween 80 1, agar 20, pH 6,5. Các hóa chất sử dụng của hãng Bio Basic - Canada; và hãng Xylog; Biosharp - Trung Quốc.

**Phương pháp****Phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng sinh lactic acid**

Dịch mẫu (50  $\mu\text{L}$ ) sau khi được pha loãng ở các nồng độ khác nhau  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  được cấy trang trên bề mặt thạch của đĩa petri chứa môi trường MRS + 0,5%  $\text{CaCO}_3$ , úp ngược đĩa và ủ ở 35 - 37°C. Sau 48 giờ, lựa chọn khuẩn lạc riêng rẽ cấy tiếp tục lên đĩa thạch chứa môi trường MRS khác cho đến khi nhận được chủng giống thuần khiết.

**Xác định hàm lượng lactic acid bằng phương pháp so màu**

Lactic acid phản ứng với  $\text{FeCl}_3$  tạo thành dung dịch có màu vàng. Độ đậm của màu vàng tỉ lệ thuận với hàm lượng lactic acid có trong mẫu, hàm lượng lactic acid này được xác định thông qua độ hấp thụ màu ở bước sóng 390 nm ( $\text{OD}_{390\text{nm}}$ ) trên máy quang phổ kế. Xây dựng đồ thị chuẩn giữa các nồng độ khác nhau của lactic acid phản ứng với  $\text{FeCl}_3$  (Borshchevskaya *et al.*, 2016), hàm lượng lactic acid trong mẫu nghiên cứu được xác định dựa vào đồ thị chuẩn đã xây dựng.

**Xác định hàm lượng L-lactic acid bằng phương pháp enzyme**

Vi khuẩn được lên men trong môi trường MRS lỏng, sau 48 giờ tiến hành ly tâm, thu dịch nuôi cấy để xác định hàm lượng L-lactic acid theo phương pháp của Zhaoqi Ran *et al.*, (2023). L-lactic acid tạo phức với boric acid ngăn cản sự kết hợp của boric acid với L-DOPA giúp cho phản ứng giữa L-DOPA và enzyme tyrosinase được tiếp diễn tạo thành dung dịch có màu nâu đỏ. Độ đậm của dung dịch tỷ lệ thuận với hàm lượng của L-lactic acid có trong dịch lên men. Hàm lượng của L-lactic acid được xác định thông qua phép đo quang phổ ở bước sóng 475 nm.

**Định danh chủng vi khuẩn có khả năng sinh L- lactic acid cao bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

Định danh chủng vi khuẩn dựa trên trình tự gene 16S rRNA: Chủng vi khuẩn nghiên cứu được nuôi cấy tĩnh trong 20 mL môi trường MRS lỏng, sau 48 giờ tiến hành ly tâm thu sinh khối của chủng nghiên cứu. DNA tổng số được tách bằng kit của hãng ThermoFisher (Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự gene 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3'); 1429R (5'-GGTGTGACGGCGGTGTGTA-3') để khuếch đại đoạn gene có kích thước 1500 bp (Quach *et al.*, 2022). Phản ứng PCR được tiến hành theo chu trình nhiệt: 95°C/ 5 phút; 35 chu kỳ tiếp theo được thực hiện: 94°C/1 phút, 57°C/30 giây và 72°C/1 phút; cuối cùng là 72°C/10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0 %. Kích thước của các đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn 1kb (Thermo scientific, Mỹ). Sản phẩm PCR được kiểm tra, tinh sạch và gửi đến Apical Scientific Sdn. Bhd (Malaysia) để giải trình tự.

Kết quả giải trình tự gene hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit 7.2. Trình tự đoạn gene 16S rRNA được so sánh độ tương đồng với các trình tự gene được đăng ký trên ngân hàng Genbank để xác định vị trí phân loại của vi khuẩn phân lập bằng công cụ BLAST trên NCBI. Cây phân loại được xây dựng dựa trên mức độ tương đồng của trình tự nucleotide giữa các loài được tính toán thống kê bằng phần mềm MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

**Xử lý số liệu:** Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft office excel và trình bày dưới dạng: Trung bình  $\pm$  SD (sai số chuẩn). Phân tích ANOVA (Duncan's test) bằng phần mềm SPSS 20.0 được sử dụng để kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức (với mức ý nghĩa  $p < 0,05$ ).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN****Phân lập và thuần khiết chủng giống**

Từ các sản phẩm lên men: dưa chua và các loại hoa quả lên men chúng tôi tiến hành phân lập và thuần khiết được 17 chủng vi khuẩn với đặc điểm: khuẩn lạc hình tròn, trắng đục, kích thước khuẩn lạc dao động từ khoảng 0,5 - 2,5 mm có vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$ , Gram dương, âm tính với catalase và không hình thành bào tử. Từ những đặc điểm hình thái và đặc tính sinh hóa, bước đầu có thể xác định các chủng vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn lactic điển hình. Các chủng này được lưu giữ và sử dụng để đánh giá hoạt tính sinh lactic acid.

**Xác định hàm lượng lactic acid tổng số của các chủng vi khuẩn thuần khiết**

Sau khi thuần khiết và tinh sạch được 17 chủng vi khuẩn lactic tiến hành nuôi cấy các chủng trên môi trường MRS dịch thể để xác định nồng độ lactic acid. Kết quả thu được tại Bảng 1 cho thấy hầu hết các chủng đạt hàm lượng lactic acid cao ở ngày nuôi cấy thứ 2 và giảm dần ở ngày thứ 3. Một số chủng cho hàm lượng lactic acid cao (trên 40 g/L) như CSNT2, CSNT3, CXTT1, CCNT4, KC2.6 và DC2, các chủng còn lại đạt hàm lượng khoảng

từ 30 - 37 g/L. Nghiên cứu của Song *et al.*, (2022) đã chỉ ra rằng tỷ lệ của D-lactic acid trên hàm lượng lactic acid tổng số thay đổi khác nhau phụ thuộc và chủng vi khuẩn sử dụng. Trong đó, hàm lượng D-lactic chiếm từ 28,98% đến 45,76% đối với *Bifidobacterium* sp., tỷ lệ này tăng lên đến 41,18% - 61,02% ở *Lactobacillus* sp. và 45,71% ở *P. acidilacti* KCCM 11747. Hàm lượng lactic acid tổng số đã đo được từ 17 chủng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này chưa đại diện cho khả năng sinh L-lactic acid của chúng. Vì vậy, trong thí nghiệm tiếp theo, phương pháp hóa sinh sẽ được sử dụng để đánh giá nồng độ L-lactic acid tạo thành của mỗi chủng vi khuẩn.

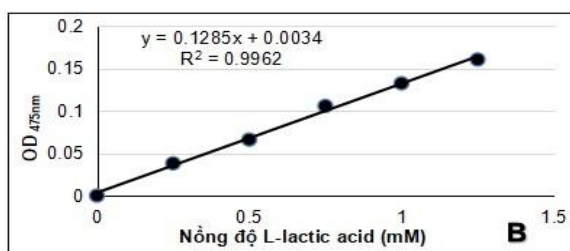
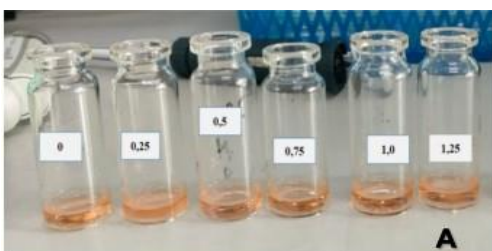
**Bảng 1. Hàm lượng lactic acid tổng số của các chủng vi khuẩn thuần khiết**

STT	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng lactic acid (g/L)		
		Ngày 1 (24 giờ)	Ngày 2 (48 giờ)	Ngày 3 (72 giờ)
1	CSNT2	32,419 ± 0,96 <sup>b</sup>	40,978 ± 9,83 <sup>ab</sup>	36,299 ± 1,97 <sup>f</sup>
2	CSNT3	32,316 ± 1,99 <sup>b</sup>	40,381 ± 8,04 <sup>ab</sup>	35,512 ± 0,35 <sup>def</sup>
3	CCNT4	31,123 ± 1,64 <sup>b</sup>	40,78 ± 9,02 <sup>ab</sup>	31,359 ± 2,9 <sup>bc</sup>
4	CXTT1	29,087 ± 5,44 <sup>ab</sup>	39,443 ± 7,78 <sup>ab</sup>	33,234 ± 1,84 <sup>cde</sup>
5	CXNT1	26,226 ± 7,02 <sup>ab</sup>	28,958 ± 2,25 <sup>ab</sup>	30,775 ± 1,04 <sup>bc</sup>
6	CXNT2	31,129 ± 1,20 <sup>b</sup>	34,410 ± 3,26 <sup>ab</sup>	35,439 ± 0,52 <sup>def</sup>
7	KC2.1	26,612 ± 4,63 <sup>ab</sup>	37,818 ± 10,52 <sup>ab</sup>	35,377 ± 0,66 <sup>def</sup>
8	KC2.2	27,124 ± 1,78 <sup>ab</sup>	30,765 ± 1,93 <sup>ab</sup>	32,977 ± 2,19 <sup>bcd</sup>
9	KC2.5	27,956 ± 5,31 <sup>ab</sup>	34,525 ± 3,96 <sup>ab</sup>	30,365 ± 3,59 <sup>b</sup>
10	KC2.6	27,727 ± 6,14 <sup>ab</sup>	39,505 ± 7,94 <sup>ab</sup>	34,818 ± 0,31 <sup>def</sup>
11	P7	30,818 ± 2,75 <sup>ab</sup>	34,365 ± 2,26 <sup>ab</sup>	33,644 ± 0,06 <sup>cdef</sup>
12	DC2	30,992 ± 3,19 <sup>ab</sup>	41,537 ± 9,18 <sup>b</sup>	35,796 ± 1,9 <sup>ef</sup>
13	DCTC2	25,659 ± 12,02 <sup>ab</sup>	34,669 ± 1,98 <sup>ab</sup>	33,314 ± 2,2 <sup>cde</sup>
14	H1	23,068 ± 3,02 <sup>ab</sup>	29,92 ± 4,04 <sup>ab</sup>	25,589 ± 1,2 <sup>a</sup>
15	H5	24,546 ± 4,46 <sup>ab</sup>	28,385 ± 4,86 <sup>a</sup>	25,668 ± 0,21 <sup>a</sup>
16	P1	23,694 ± 5,08 <sup>ab</sup>	29,199 ± 5,25 <sup>ab</sup>	25,631 ± 1,05 <sup>a</sup>
17	P3	21,182 ± 4,15 <sup>a</sup>	29,311 ± 4,04 <sup>ab</sup>	25,475 ± 1,0 <sup>a</sup>

Ghi chú: Sự khác biệt giữa các ký tự a, b, c, d, e, f trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê tại mức ý nghĩa  $p < 0,05$  theo Duncan's test.

**Đánh giá khả năng sinh L-lactic acid của các chủng vi khuẩn thuần khiết**

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường MRS lỏng ở 35 - 37°C, sau các khoảng thời gian 48 và 72 giờ thu dịch nuôi cấy sau lên men loại bỏ tế bào và đánh giá hàm lượng L-lactic acid. Kết quả trong Bảng 3 cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn đều cho hàm lượng L-lactic acid cao ở ngày nuôi cấy thứ 2 và giảm dần ở ngày nuôi cấy thứ 3. Trong đó, chủng P7 đạt hàm lượng L-lactic acid cao nhất là 32,5 g/L sau 2 ngày nuôi cấy, chiếm khoảng 94,5% lượng lactic acid tổng số sinh ra. Điều đó chứng tỏ chủng P7 chủ yếu sinh ra L-lactic acid thay vì D-lactic acid. Theo nghiên cứu của Ahmad *et al.*,(2022), cũng đã sử dụng chủng *Lactococcus lactis* IO-1 lên men nhựa cây cao lương thu được 24,02 g/L L-lactic acid . Tuy nhiên để ứng dụng chủng P7 trong quá trình sản xuất nhựa sinh học PLA, các cải biến di truyền cần được thực hiện để nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp L-lactic acid. Gong *et al.*, (2016) báo cáo rằng việc chuyển gene *pfk* và *glk* vào hệ gene của vi khuẩn *L. casei* RL20-2 đã làm tăng khả năng sinh tổng hợp lactic acid lên đến 144,2 g/L sau 48 giờ lên men trong môi trường chứa 100 g/L glucose.



**Hình 1. Sự phục hồi màu của phản ứng giữ enzyme tyrosinase với L-DOPA ở các nồng độ L-lactic acid khác nhau từ 0 đến 1,25 mM (A) và phương trình đường chuẩn L-lactic acid (B)**

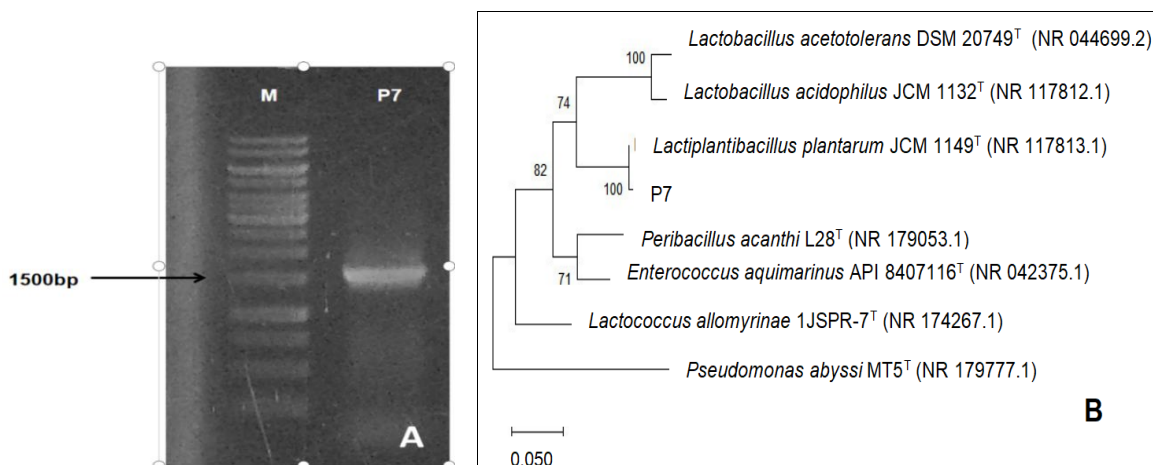
**Bảng 2. Hàm lượng L-lactic acid của các chủng vi khuẩn thuần khiết theo thời gian nuôi cấy**

STT	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng L-lactic acid (g/L)	
		Ngày 2 (48 giờ)	Ngày 3 (72 giờ)
1	CSNT2	22,821 ± 0,62 <sup>de</sup>	20,952 ± 0,52 <sup>f</sup>
2	CSNT3	21,288 ± 1,09 <sup>d</sup>	15,979 ± 0,72 <sup>de</sup>
3	CCNT4	19,643 ± 1,56 <sup>c</sup>	17,194 ± 1,61 <sup>de</sup>
4	CXTT1	24,111 ± 0,55 <sup>e</sup>	28,037 ± 0,72 <sup>j</sup>
5	CXNT1	16,278 ± 0,8 <sup>b</sup>	12,801 ± 1,03 <sup>c</sup>
6	CXNT2	31,364 ± 0,4 <sup>h</sup>	25,943 ± 1,2 <sup>h</sup>
7	KC2.1	22,971 ± 0,64 <sup>de</sup>	15,587 ± 0,76 <sup>d</sup>
8	KC2.2	28,093 ± 0,22 <sup>g</sup>	23,644 ± 0,4 <sup>g</sup>
9	KC2.5	28,336 ± 0,64 <sup>g</sup>	8,782 ± 1,23 <sup>a</sup>
10	KC2.6	22,017 ± 0,35 <sup>d</sup>	17,830 ± 0,93 <sup>e</sup>
11	P7	32,261 ± 0,43 <sup>h</sup>	27,925 ± 0,54 <sup>i</sup>
12	DC2	26,223 ± 0,44 <sup>f</sup>	17,363 ± 0,76 <sup>de</sup>
13	DCTC2	22,466 ± 0,44 <sup>de</sup>	22,503 ± 0,85 <sup>fg</sup>
14	H1	6,333 ± 0,38 <sup>a</sup>	10,259 ± 0,97 <sup>ab</sup>
15	H5	24,223 ± 1,46 <sup>e</sup>	17,550 ± 0,4 <sup>de</sup>
16	P1	23,943 ± 0,41 <sup>e</sup>	11,848 ± 0,74 <sup>bc</sup>
17	P3	28,691 ± 1,36 <sup>g</sup>	13,605 ± 1,04 <sup>c</sup>

Ghi chú: Sự khác biệt giữa các ký tự a, b, c, d, e, f, ... trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê tại mức ý nghĩa  $p < 0,05$  theo Duncan's test.

**Xác định vị trí phân loại của chủng P7**

Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA cho thấy chủng P7 có độ tương đồng cao với trình tự 16S rRNA của các chủng *Lactiplantibacillus plantarum* B\_16LAB (98,77%), *Lactiplantibacillus plantarum* HBUAS52088 (98,69%) nên P7 được định danh là *Lactiplantibacillus plantarum* P7 với mã số đăng ký trên ngân hàng gene là PP946892.



**Hình 2. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại gene 16S rRNA (A) và cây phát sinh chủng loại (B) của chủng P7**

**KẾT LUẬN**

Đã phân lập và thuần khiết được 17 chủng vi khuẩn có khả năng sinh L-lactic acid từ các mẫu dưa chua, hoa quả lên men. Trong đó sử dụng phương pháp hóa sinh đã xác định được chủng P7 cho hàm lượng L-lactic acid cao nhất đạt 32,26 g/L sau 2 ngày nuôi cấy. Chủng vi khuẩn ký hiệu P7 đã được định danh là *Lactiplantibacillus plantarum* P7 thông qua so sánh độ tương đồng của trình tự gene 16S rRNA trên GenBank.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ hợp phần số 6: “Nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp biopolyme bằng con đường cải biến di truyền và lên men ở quy mô pilot” thuộc dự án KHCN trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Mã số hợp phần: TĐNSH0.06/22-24 do TS. Chu Nhật Huy làm chủ nhiệm hợp phần.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad MN, Awang Adeni DS, Suhaili N, & Bujang K (2022). Optimisation of pre-harvest sago frond sap for the production of L-lactic acid using *Lactococcus lactis* IO-1. *Biocatal Agric Biotechnol*, 43: 102435.
- Augustiniene E, Valanciene E, Matulis P, Syrpas M, Jonuskiene I, Malys N (2022). Bioproduction of L- and D-lactic acids: advances and trends in microbial strain application and engineering. *Crit Rev Biotechnol*, 42(3): 342-360.
- Borshchevskaya L, Gordeeva T, Kalinina A, & Sineokii S (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *J Anal Chem*, 71(8): 755-758.
- Gong Y, Li T, Li S, Jiang Z, Yang Y, Huang J, Liu Z and Sun H (2016). Achieving high yield of lactic acid for antimicrobial characterization in cephalosporin-resistant *Lactobacillus* by the co-expression of the phosphofructokinase and glucokinase. *J Microbiol Biotechnol*, 26(6): 1148-1161.
- Komesu A, de Oliveira JAR, de Martins LHS, Wolf MMR, & Maciel FR (2017). Lactic acid production to purification: A review. *BioRes*, 12(2): 4364-4383.
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol, Evol* 33(7):1870-1874.
- Martinez FAC, Marcos BEM, Salgado JM, González JMD, Converti A, Oliveira R P de S (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Technol*, 30(1): 70-83.
- Quach NT, Vu THN, Nguyen TTA, Ha H, Ho PH, Chu KS, Nguyen LH, Van NH, Thanh TTT, Nguyen NA, Chu HH, and Phi QT (2022). Structural and genetic insights into a poly-γ-glutamic acid with in vitro antioxidant activity of *Bacillus velezensis* VCN56. *World J Microbiol Biotechnol*, 38(10):173.
- Rahmenbedingungen M, Aufbau und Eigenschaften H (2009). Technische Biopolymere. Endres H J, Andrea S R, eds, *Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG*:103.
- Ran Z, Wang X, Zhang L, Yang Y, Shang Z, Chen, Q, Ma, X, Qian Z, & Liu, W (2023). Enzymatic colorimetric method for turn-on determination of l-lactic acid through indicator displacement assay. *J Biosci Bioeng*, 136(3): 159-165.
- Senedese ALC, Filho RM, Maciel MRW (2015). L-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. *Sci World J*, 2015: 501029.
- Song KY (2022). Preliminary data on the ratio of D(-)-Lactate and L(+)-Lactate levels in various lactic acid bacteria as evaluated using an enzymatic method. *J Dairy Sci Biotechnol*, 40(1):15-22.

## SCREENING AND EVALUATION OF L-LACTIC ACID PRODUCTION POTENTIAL OF *Lactobacillus plantarum* P7 BACTERIAL STRAIN

Le Thi Anh Tuyet<sup>1,2</sup>, Hoang Phuong Ha<sup>1,2</sup>, Nguyễn Kim Thoa<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Minh<sup>1,2</sup>, Bui Huong Giang<sup>1,2</sup>, Tran Xuan Khoi<sup>1</sup>, Dao Thi Ngoc Anh<sup>1</sup>, Hoang Minh Khue<sup>3</sup>, Chu Nhật Huy<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology

<sup>3</sup>Nguyen Tat Thanh Secondary & High School, Hanoi

### SUMMARY

L-lactic acid is a primary raw material used in bioplastic production. It is typically produced through microbial fermentation, which is cost-effective and environmentally friendly. However, during fermentation, bacteria often produce a mixture of L and D isomers of lactic acid. Consequently, determining the composition of these isomers usually requires chromatographic analysis, which is time-consuming and expensive. In contrast, L-lactic acid can be easily quantified through a biochemical reaction involving the enzyme tyrosinase and L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine). In this study, 17 bacterial strains were isolated that could produce total lactic acid at concentrations ranging from 28 to 40 g/L. Using the enzyme method to screen for L-lactic acid production, strain P7 synthesized the highest amount reaching 32.26 g/L after 48 hours of fermentation, accounting for 94.5% of the total. Through 16S-rRNA sequencing, strain P7 was identified as *Lactobacillus plantarum* P7. Using the enzyme method for determining L-Lactic acid concentration has shortened the time needed to select potential bacterial strains for genetic modification to enhance L-lactic acid production for pilot-scale bioplastic manufacturing.

**Keywords:** Lactic acid, L-lactic acid, *Lactobacillus plantarum*, fermentation, biochemical reaction.

\* Author for correspondence: Tel: 0945355570 ; Email: chunhathuy@ibt.ac.vn

# PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH NẤM SỢI TRÊN BỀ MẶT SƠN TƯỜNG PHÒNG THỬ NGHIỆM TẠI HÒA LẠC

Nguyễn Thị Kim Thanh<sup>1\*</sup>, Đỗ Thị Tuyền<sup>1,2</sup>, Trần Khánh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Hiếu Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Việt Thắng<sup>1</sup>, Georgiy M Bukharev<sup>1</sup>, Ngô Cao Cường<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga - Bộ Quốc phòng

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

## TÓM TẮT

Sự phát triển của nấm sợi trên bề mặt sơn tường có ảnh hưởng lớn đến tính thẩm mỹ, cấu trúc và chất lượng của bức tường. Sơn tường có bổ sung bioxide được thử nghiệm trong phòng kín tại Hòa Lạc nhằm đánh giá hiệu quả kháng nấm. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập và nghiên cứu đặc điểm các chủng nấm sợi gây hại, sinh trưởng trên sơn tường có bổ sung bioxide và đối chứng không có bioxide ở phòng thử nghiệm Hòa Lạc. Đánh giá hệ nấm sợi phân lập từ 8 mẫu thu thập trên bề mặt sơn phòng thử nghiệm cho thấy trên mỗi mẫu phân lập được 1-4 chủng, mật độ nấm sợi phân lập trên đĩa trung bình dao động từ 0,92-34,48 CFU/cm<sup>2</sup>, trong đó, số chủng và mật độ nấm sợi trung bình trên mẫu sơn tường có bổ sung bioxide thấp hơn so với mẫu đối chứng không bổ sung bioxide. Tổng số 7 chủng nấm sợi khác nhau đã được phân lập. Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, cuống sinh bào tử, bào tử và so sánh tương đồng với các trình tự vùng ITS trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI), 7 chủng nấm sợi phân lập được xác định gồm *Fusarium* sp. S1.1, *Aspergillus flavus* S1.2, *Penicillium citrinum* S1.3, *Aspergillus niger* S2.1, *Aspergillus* sp. S3.3, *Aspergillus nomiae* S5.3, *Aspergillus frequens* S6.2. Hầu hết các chủng có khả năng sinh enzyme ngoại bào cellulase và laccase, chủng *Penicillium citrinum* S1.3 cho hoạt tính tốt nhất với cả hai loại enzyme. Nghiên cứu này đã bước đầu đánh giá hiệu quả của việc bổ sung bioxide vào sơn tường, đồng thời cung cấp dữ liệu cho việc thử nghiệm, nghiên cứu sâu hơn về hoạt chất kháng nấm giúp cải thiện khả năng bảo vệ của sơn tường.

**Từ khóa:** Bioxide, hoạt chất kháng nấm, nấm sợi, phân hủy sinh học, sơn tường.

## MỞ ĐẦU

Sơn tường là một trong những vật liệu quan trọng của ngành xây dựng, được sử dụng phổ biến và rất cần thiết cho các công trình xây dựng. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa với độ ẩm và nhiệt độ cao của Việt Nam, nấm sợi có khả năng bám dính tốt dễ dàng xâm nhập và phát triển trên bề mặt sơn tường. Nấm sợi được coi là nguyên nhân chính gây ra sự phân hủy sinh học của các bức tường và nhiều bề mặt vật liệu xây dựng khác (Sterflinger *et al.*, 2013). Sự xuất hiện của nấm sợi trên các mảng tường gây ra các vấn đề về thẩm mỹ và có thể dẫn đến sự xuống cấp và bong tróc, phồng rộp của lớp sơn phủ, qua đó tác động đến sức khỏe con người. Hơn nữa, nấm sợi có thể ăn sâu vào bề mặt tường, tạo ra các vết nứt ảnh hưởng đến cấu trúc vật liệu và làm suy yếu chúng (Shirakawa *et al.*, 2002). Do hoạt động trao đổi chất của từng loại nấm sợi, một số nấm tạo ra các sắc tố khác nhau (xanh lá cây, xám, đen, nâu,...) phụ thuộc vào từng loài, thành phần sơn tường, sự hiện diện của các vi sinh vật khác và các yếu tố môi trường (Marco *et al.*, 2020). Các sợi nấm có xu hướng bám trên bề mặt sơn tường, sản xuất ra polysaccharide ngoại bào (EPS) giúp nấm sợi bám dính, tạo màng sinh học. Nấm sợi có thể hình thành các bào tử có khả năng chống chịu cao với các điều kiện bất lợi và dễ dàng phát tán vào không khí, bám vào mọi vật liệu (Ngo *et al.*, 2021). Đồng thời chúng có khả năng sản sinh các enzyme thủy phân ngoại bào như cellulase, lipase, protease, esterase, peroxidase, laccase,... thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học bề mặt vật liệu, tạo ra nguồn carbon và khoáng chất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Nhiều vi sinh vật được phát hiện trên bề mặt sơn tường chỉ là chất gây ô nhiễm trong không khí, không tham gia vào quá trình phân hủy. Tuy nhiên, những vi sinh vật gây ô nhiễm này có thể cung cấp chất hữu cơ hoặc các chất dinh dưỡng khác, tạo điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật có khả năng phân hủy vật liệu sinh trưởng và phát triển (Zucconi *et al.*, 2022).

Nhiều nghiên cứu chỉ ra các chi nấm sợi phổ biến thường tìm thấy trên bề mặt sơn tường hoặc tranh tường bao gồm *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* và *Trichoderma* (Sterflinger *et al.*, 2013; Rosado *et al.*, 2014). Trong đó các chi *Aspergillus* và *Penicillium* là phổ biến nhất vì chúng được bắt gặp thường xuyên trong môi trường tự nhiên do khả năng sản sinh nhiều bào tử và dễ dàng phát tán trong không khí (Zucconi *et al.*, 2022).

Để giảm sự tác động của nấm sợi đến sơn tường, các hoạt chất diệt nấm thường được nghiên cứu sử dụng. Việc sử dụng các bioxide là phụ gia của sơn được nghiên cứu sử dụng phổ biến để ngăn chặn sự phát triển của

nấm sợi và vi khuẩn. Nghiên cứu của Gaylarde cho thấy hoạt chất diệt nấm có chứa đồng có thể làm chậm sự đổi màu của bức tường sơn trong 6 năm và được chứng minh là làm giảm đáng kể sinh khối vi khuẩn và nấm sợi. Chất diệt nấm có nguồn gốc isothiazolinone, carbendazim, 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (OIT) và 3-iodo-2-propylbutyl carbamate (IPBC) thường được sử dụng rộng rãi trong các công thức sơn (Gaylarde *et al.*, 2011).

Để phát triển các phương pháp, hoạt chất và chế phẩm kháng nấm trên sơn tường, việc phân lập và xác định đặc điểm sinh học của các chủng nấm sợi gây hại là rất quan trọng, cung cấp dữ liệu cho các nghiên cứu thử nghiệm và đánh giá. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, xác định đặc điểm sinh học và định danh các chủng nấm trên sơn tường thử nghiệm có và không có hoạt chất diệt nấm bioxide tại Trạm thử nghiệm khí hậu Hòa Lạc, thuộc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga. Từ đó, hiệu quả kháng nấm của sơn tường thử nghiệm sẽ được đánh giá, nhằm mở rộng ứng dụng và nâng cao hiệu quả bảo vệ của chúng.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Các mẫu nghiên cứu được thu thập trên bề mặt sơn tại 2 lô thử nghiệm có và không có hoạt chất diệt nấm bioxide và được bố trí ở cùng cùng 1 điều kiện của phòng thử nghiệm tại Trạm thử nghiệm khí hậu Hòa Lạc thuộc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga. Các mẫu đựng trong túi vô trùng, vận chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở 4°C cho đến khi tiến hành phân lập.

### Phương pháp

#### Lấy mẫu và phân lập nấm sợi

Tổng số 8 vị trí lấy mẫu khác nhau được xác định trên tường sơn tại phòng thử nghiệm ở cùng một thời điểm. Mỗi vị trí được khoanh vùng với diện tích bề mặt sơn tường mỗi ô là 5 x 5 cm, quan sát và chụp ảnh bằng kính hiển vi cầm tay DM WF120. Thu mẫu bằng cách sử dụng tấm bông lấy mẫu cán gỗ loại tiết trùng (Medisafe, Trung Quốc), quết kín lên bề mặt sơn tại vị trí các ô đã được xác định. Các chủng nấm sợi được phân lập bằng cách phết đều đầu tấm bông trực tiếp trên đĩa petri chứa môi trường Czapek–Dox (30 g sucrose, 7,5 g peptone, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>, nước cất 1 L, pH 7,0) có bổ sung hỗn hợp kháng sinh (100 mg/L ampicillin; 100 mg/L tetracycline). Đặt đĩa thạch ở nhiệt độ 28-30°C trong 3 - 5 ngày. Mật độ nấm sợi trung bình (CFU/cm<sup>2</sup>) được xác định bằng số khuẩn lạc/ diện tích đĩa petri. Các chủng nấm sợi được thuần khiết bằng cách cấy chuyển nhiều lần trên môi trường thạch Czapek–Dox (Ngo *et al.*, 2021).

#### Đặc điểm sinh học của các chủng nấm sợi

Các chủng nấm được nuôi cấy trong tủ ẩm ở 28-30°C trên môi trường thạch Czapek–Dox có cắm la men nghiêng. Sau 72 giờ, la men được lấy ra quan sát hình thái cuống sinh bào tử và bào tử dưới kính hiển vi quang học Zeiss Axiocam 503 Color Camera Unit ở độ phóng đại 1000 lần.

#### Phân loại nấm sợi dựa trên trình tự ITS

Nấm sợi được phân loại bằng cách quan sát hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử kết hợp với xác định trình tự vùng ITS. DNA tổng số của nấm sợi được tách chiết bằng kit Fungi/Yeast DNA Extraction (Norgen, Canada). Trình tự ITS1–5,8S–ITS2 được khuếch đại từ DNA tổng số với cặp mồi ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3'); ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự trên máy đọc trình tự động ABI PRISM@3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại công ty 1st BASE (Singapore). Các trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit (ver. 6.0.7, Mỹ) và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega (ver.7).

#### Đánh giá khả năng sinh một số enzyme của các chủng nấm sợi phân lập

Xác định hoạt tính của cellulase, laccase của các chủng nấm sợi theo phương pháp đặt thỏi thạch. Các thỏi thạch chứa chủng nấm được đặt trên môi trường thạch cơ chất (bổ sung 1% Carboxymethyl cellulose (CMC), 0,05% guaiacol). Nhuộm màu đĩa thạch bằng dung dịch lugol 1%. Hoạt tính enzyme được đo bằng hiệu số D - d (trong đó D là đường kính vòng thủy phân (mm), d là đường kính của thỏi thạch (mm)) (Vedashree *et al.*, 2013).

#### Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) và được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập nấm sợi trên mẫu sơn thử nghiệm tại Hòa Lạc

Tổng số 8 mẫu bề mặt sơn tường được thu thập ở phòng thử nghiệm tại Hòa Lạc. Trong đó, 4 mẫu kí hiệu S1, S2, S3, S4 là bề mặt sơn tường không bổ sung bioxide (Hình 1A), 4 mẫu còn lại S5, S6, S7, S8 được thu thập trên bề mặt sơn thử nghiệm bổ sung bioxide (Hình 1B).

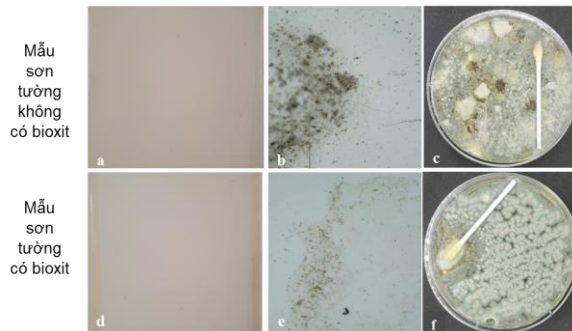




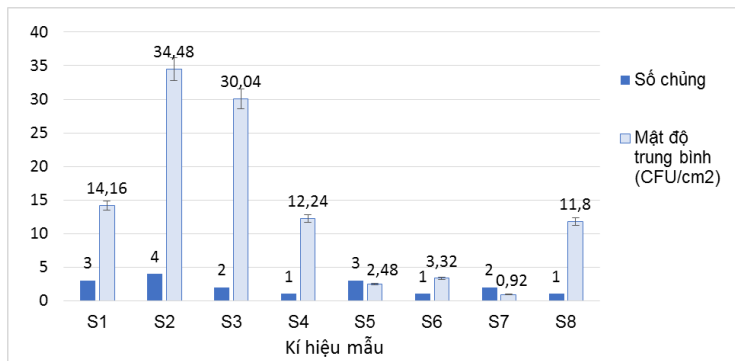
**Hình 1. Các vị trí thu mẫu trên bề mặt sơn tường (A) Sơn tường đối chứng không bổ sung bioxide (B) Sơn tường thử nghiệm có bổ sung bioxide**

Qua quan sát bên ngoài, khó nhận ra sự xuất hiện của nấm sợi. Kết quả phân tích ảnh chụp độ phóng đại 50x của 2 khu vực sơn tường thử nghiệm cho thấy có xuất hiện nấm sợi phát triển (Hình 2b, e). Nhìn chung, hệ nấm sợi trên các khu vực sơn tường đối chứng không bổ sung bioxide cao hơn các khu vực khác.

Kết quả phân lập các mẫu trên môi trường Czapek–Dox cho thấy số chủng nấm sợi phân lập và mật độ nấm sợi trung bình trên các mẫu sơn tường không bioxide cao hơn so với mẫu sơn thử nghiệm có bioxide (Hình 3). Độ đa dạng nấm sợi ở các mẫu thu được khác nhau đáng kể. Mật độ trung bình các chủng nấm sợi phân lập từ mẫu sơn tường không bổ sung bioxide là 22,73 CFU/cm<sup>2</sup> cao gấp gần 5 lần mẫu có bổ sung bioxide (mật độ trung bình 4,63 CFU/cm<sup>2</sup>). Mẫu S2 phân lập được 4 chủng nấm sợi, đồng thời mật độ vi sinh vật cao nhất ở mẫu S2 chiếm 34,48 CFU/cm<sup>2</sup>. Có thể nhận thấy mẫu S2 ở vị trí thấp khu vực chân tường dễ bị thấm nước nên thường có độ ẩm cao hơn các khu vực khác, thích hợp cho nấm sợi phát triển. Khi bổ sung các hoạt chất diệt nấm vào sơn tường, mật độ và số chủng giảm đi đáng kể. Như vậy, sơn tường có bổ sung bioxide cho thấy có tác dụng ức chế đáng kể đối với nấm sợi, chỉ những chủng có khả năng thích nghi tốt mới có thể phát triển trên điều kiện môi trường này.



**Hình 2. Hình ảnh quan sát sự phát triển của nấm sợi trên bề mặt sơn tường (a) (d) Bề mặt sơn tường, (b) (e) sợi nấm trên bề mặt mẫu chụp với độ phóng đại 50x, (c) (f) đĩa phân lập nấm sợi trên môi trường Czapek–Dox sau 5 ngày nuôi cấy**

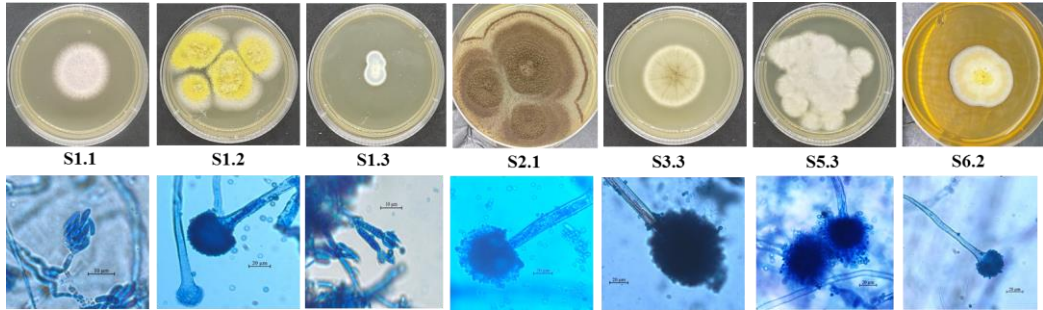


**Hình 3. Mật độ nấm sợi và số chủng nấm phân lập được trên môi trường Czapek–Dox**

**Đặc điểm sinh học các chủng nấm sợi phân lập**

Từ 8 mẫu thu thập trên bề mặt sơn tường thử nghiệm tại Hòa Lạc đã phân lập trên môi trường Czapek–Dox được 7 chủng nấm sợi khác nhau về đặc điểm hình thái khuẩn lạc, cuống bào tử và bào tử. Kết quả được mô tả ở Hình 4 và Bảng 1. Tất cả các chủng đều có dạng khuẩn lạc tỏa tròn, có màu sắc, dạng nhung hoặc bông xốp, hệ sợi phát triển, sinh bào tử.

Từ kết quả quan sát hình dạng khuẩn lạc, dạng hệ sợi, cuống sinh bào tử và bào tử của các chủng nấm sợi phân lập có thể sơ bộ đưa ra đánh giá phân loại tới bậc chi của chúng. Nhận thấy 5 chủng S1.2, S2.1, S3.3, S5.3, S6.2 có đặc điểm hệ sợi, cuống bào tử trần, bong hình cầu, bào tử trần hình cầu, sơ bộ đánh giá chúng thuộc chi *Aspergillus*; chủng S1.1 có đặc điểm thuộc chi *Fusarium* và S1.3 thuộc chi *Penicillium* (Miên, 2015).



**Hình 4. Hình thái khuẩn lạc (hình trên) và bào tử (hình dưới) các chủng nấm sợi phân lập thuần khiết từ mẫu sơn tường trong phòng thử nghiệm kín Hoà Lạc**

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái các chủng nấm sợi phân lập**

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm bào tử	Phân loại đến chi
S1.1	Khuẩn lạc lồi, trắng, bông, bên trong xám. Mặt sau trắng, ngả vàng vào trong	Sợi nấm có vách ngăn ngang và phân nhánh, cuống bào tử mọc trực tiếp từ sợi nấm, có dạng búp măng và nhỏ dần về đỉnh, có vách ngăn ở phần gốc; bào tử có hình thuyền, thuôn dài, nhỏ về 2 đầu, có ba vách ngăn.	<i>Fusarium</i> (Miên, 2015)
S1.2	Khuẩn lạc lồi, bề mặt xốp nhẹ, màu vàng sau chuyển màu lục vàng, lục khi già	Giá bào tử trần thành dày, không màu, ráp; bong hình elongate khi non, sau gần cầu đến cầu; thể bình 1 hoặc 2 tầng, Bào tử trần gần cầu đến cầu.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S1.3	Khuẩn lạc dạng nhung viền trắng, vòng xanh lục, phía tâm hệ sợi ngả vàng	Hệ sợi phân nhánh và có vách ngăn. Cuống sinh bào tử phân nhánh, đầu đỉnh chùm 3-6 thể bình đều hướng lên song song dạng chổi. Bào tử trần, hình cầu, đỉnh từng chùm trên mỗi thể bình.	<i>Penicillium</i> (Miên, 2015)
S2.1	Mặt khuẩn lạc dạng xốp bông, đầu sinh bào tử hình tia hoặc hình cột tẻ, màu nâu oliu nhạt đến nâu oliu, hệ sợi nấm màu trắng, mặt trái vàng sậm	Cuống sinh bào tử trần kích thước thay đổi, nhẵn, không màu hoặc nâu nhẹ ở nửa phía trên của cuống. Bong hình cầu hoặc gần cầu, thể bình 2 tầng, có màu nâu nhạt, thể bình tương đối đồng đều. Bào tử trần hình cầu khi trưởng thành.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S3.3	Khuẩn lạc lồi, viền trắng, có các vệt nâu hướng từ tâm ra	Cuống sinh bào tử thu nhỏ ở phần gần bong. Bong hình gần cầu đến elongate. Thể bình 1 tầng, 2 tầng hoặc cả 2. Bào tử trần hình cầu, gần cầu đến hình trứng.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S5.3	Khuẩn lạc hơi lồi, bông trắng, hệ sợi phát triển. Mặt sau viền trắng ngả vàng bên trong	Cuống sinh bào tử trần kích thước thay đổi, không màu hoặc nâu nhẹ, thể bình 2 tầng, có màu nâu nhạt. Bào tử trần hình cầu.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S6.2	Khuẩn lạc viền trắng, vòng xanh lục, phía tâm hệ sợi ngả vàng	Cuống sinh bào tử hình ống, hình thành trên một tế bào của sợi nấm. Đầu cuống phình to hình cầu, hình bầu dục hay hình chùy. Có hai lớp mang bào tử dính vào thể bình. Bào tử trần hình cầu.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)

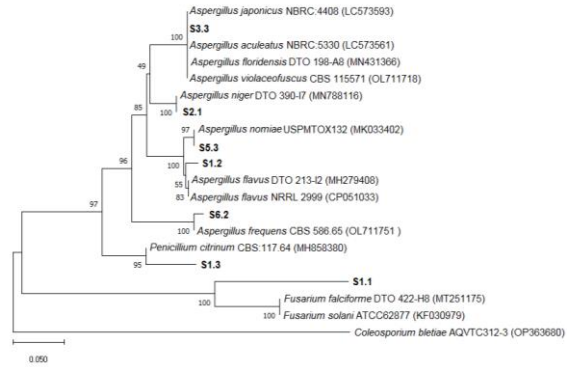
**Định danh các chủng nấm sợi phân lập**

Việc định danh các chủng nấm sợi phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử thông qua phân tích trình tự ITS nhằm bổ sung cho phân tích đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử nấm sợi. Bảng 2 và Hình 5 cho kết quả định danh các chủng nấm sợi phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử thông qua phân tích trình tự ITS. Trình tự nucleotide vùng ITS của 7 chủng nấm phân lập cho thấy độ tương đồng cao (> 98%) so với trình tự các loài nấm đã biết trên cơ sở dữ liệu GenBank. 7 chủng nấm phân lập được có quan hệ gần gũi với các chi

*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Trong đó, chi phổ biến nhất là *Aspergillus* (5 chủng S1.2, S2.1, S3.3, S5.3, S6.2), chi *Fusarium* có 1 chủng S1.1 và *Penicillium* gồm 1 chủng S1.3. Theo nghiên cứu của Brandt, *Aspergillus* có tỷ lệ phổ biến nhất trong bộ sưu tập các mẫu phân lập từ các nguồn khác nhau tại Việt Nam, tiếp theo đó là *Penicillium* (Brandt et al., 2018).

**Bảng 2. So sánh trình tự đoạn ITS của các chủng nấm phân lập với một số chủng nấm đại diện trên GenBank (NCBI)**

Ký hiệu chủng	Mã số đăng kí trên Genbank (NCBI)	Các chủng nấm gần gũi được so sánh	Độ tương đồng cao nhất (%)
S1.1	PP937578	<i>Fusarium</i> sp.	98,78
S1.2	PP937579	<i>Aspergillus flavus</i>	100
S1.3	PP937580	<i>Penicillium citrinum</i>	100
S2.1	PP937581	<i>Aspergillus niger</i>	99,89
S3.3	PP937582	<i>Aspergillus</i> sp.	100
S5.3	PP937583	<i>Aspergillus nomiae</i>	100
S6.2	PP937584	<i>Aspergillus frequens</i>	100



**Hình 5. Cây phát sinh loài của các chủng nấm sợi phân lập được dựa trên trình tự vùng ITS**

Các chủng đại diện tham chiếu với giá trị Bootstrap 1000 sử dụng thuật toán Kimura 2-parameter và G+I.

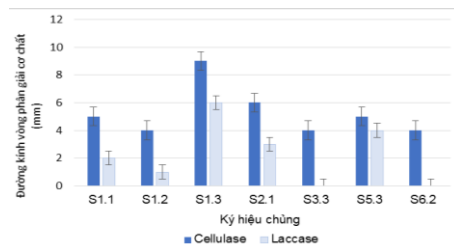
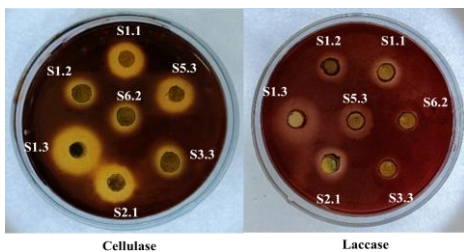
Dựa vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, đặc điểm bào tử và phân tích trình tự ITS, bảy chủng nấm sợi phân lập được định tên và đăng kí mã số truy cập trên cơ sở dữ liệu Genbank gồm *Fusarium* sp. S1.1 (PP937578), *Aspergillus flavus* S1.2 (PP937579), *Penicillium citrinum* S1.3 (PP937580), *Aspergillus niger* S2.1 (PP937581), *Aspergillus* sp. S3.3 (PP937582), *Aspergillus nomiae* S5.3 (PP937583), *Aspergillus frequens* S6.2 (PP937584).

Nghiên cứu của Bashir phân lập nấm từ sự xuống cấp của bề mặt tường sơn tại Pakistan thu được các chi phổ biến nhất là *Penicillium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Mucor* và *Alternaria* (Bashir et al., 2016). Các chi nấm sợi phân lập được *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* thường phân bố rộng và phổ biến, dễ dàng tìm thấy trong môi trường tự nhiên ở điều kiện khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa như Việt Nam (Brandt et al., 2018).

Trong 4 mẫu sơn tường có bổ sung bioxide, chỉ phân lập được 3 chủng gồm *P. citrinum* S1.3, *A. nomiae* S5.3, *A. frequens* S6.2 cho thấy các chủng này có khả năng thích nghi được trong điều kiện có bioxide, tuy nhiên mật độ chủng không cao.

**Khả năng sinh tổng hợp một số enzyme ngoại bào của các chủng nấm phân lập**

Bảy chủng nấm sợi phân lập được nghiên cứu khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng cách xác định đường kính vòng phân giải cơ chất CMC và Guaiacol. Kết quả hình 6 cho thấy ngoại trừ S3.3 và S6.2 chỉ sinh tổng hợp cellulase, tất cả các chủng còn lại đều có khả năng sinh tổng hợp cả 2 loại enzyme ngoại bào. Các chủng có khả năng phân giải CMC tốt hơn hẳn so với Guaiacol. Chủng *Penicillium citrinum* S1.3 cho kết quả phân giải tốt nhất với cả 2 loại cơ chất (đường kính vòng phân giải cơ chất của enzyme cellulase đạt 9 mm và laccase đạt 6 mm). Chủng *P. citrinum* cũng đã được nghiên cứu có khả năng sinh các enzyme ngoại bào như cellulase, laccase, lipase, esterase.... (Khan et al., 2023). Với việc sản sinh các enzyme ngoại bào, các chủng nấm sợi có khả năng xúc tác đẩy nhanh quá trình phân hủy thành phần của sơn tường, làm biến đổi màu sắc, hình dạng, đặc tính, gây hư hỏng cho bề mặt sơn.



**Hình 6. Khả năng phân giải cơ chất của các chủng nấm sợi phân lập**  
(a) Vòng phân giải cơ chất; (b) Đường kính vòng phân giải cơ chất.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá mật độ và số chủng nấm sợi phân lập từ sơn tường có bổ sung bioxide cao hơn hẳn so với mẫu đối chứng không bổ sung bioxide. Từ 8 mẫu thử nghiệm và đối chứng thu thập, đã phân lập được 7 chủng nấm sợi. Hình thái khuẩn lạc, cuống bào tử và bào tử của các chủng nấm cho phép xác định chúng thuộc 3 chi nấm *Fusarium*, *Aspergillus* và *Penicillium*. Các kết quả định danh dựa trên vùng ITS của các chủng nấm phân lập đã xác định lần lượt là *Fusarium* sp. S1.1 (PP937578), *Aspergillus flavus* S1.2 (PP937579), *Penicillium citrinum* S1.3 (PP937580), *Aspergillus niger* S2.1 (PP937581), *Aspergillus* sp. S3.3 (PP937582), *Aspergillus nomiae* S5.3 (PP937583), *Aspergillus frequens* S6.2 (PP937584). Hầu hết các chủng đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase và laccase, trong đó chủng *P. citrinum* S1.3 cho hoạt tính cao nhất với cả 2 loại enzyme khảo sát.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của đề tài: Đặc điểm của phá hủy vi sinh trên vật liệu và thiết bị, xây dựng các biện pháp bảo vệ chúng trong điều kiện khí hậu nhiệt đới. Đề tài cấp UBPH, mã số T1.3 2022-2023.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bashir U, Hafeez R (2016). Deterioration of painted wall surface by fungal saprobes: isolation and identification. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 28(1): 09-13.
- Brandt SC, Ellinger B, van Nguyen T, Thi QD, Van Nguyen G, Baschien C, et al. (2018). A unique fungal strain collection from Vietnam characterized for high performance degraders of bioecological important biopolymers and lipids. *PLoS One*, 13(8): e0202695.
- Gaylarde C, Morton L, Loh K, Shirakawa M (2011). Biodeterioration of external architectural paint films—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(8): 1189-1198.
- Khan S, Ali SA, Ali AS (2023). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mesophilic fungus '*Penicillium citrinum*' isolated from soils of plastic waste dump yard, Bhopal, India. *Environ Technol*, 44(15): 2300-2314.
- Marco A, Santos S, Caetano J, Pintado M, Vieira E, Moreira PR (2020). Basil essential oil as an alternative to commercial biocides against fungi associated with black stains in mural painting. *Build Environ*, 167: 106459.
- Đặng Vũ Hồng Miên (2015). *Hệ nấm mốc ở Việt Nam - phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- Ngo CC, Nguyen QH, Nguyen TH, Quach NT, Dudhagara P, Vu THN, et al. (2021). Identification of fungal community associated with deterioration of optical observation instruments of museums in Northern Vietnam. *Applied Sciences*, 11(12): 5351.
- Rosado T, Gil M, Caldeira AT, Martins MdR, Dias CB, Carvalho L, et al. (2014). Material characterization and biodegradation assessment of mural paintings: Renaissance frescoes from Santo Aleixo Church, Southern Portugal. *International Journal of Architectural Heritage*, 8(6): 835-852.
- Shirakawa MA, Gaylarde CC, Gaylarde PM, John V, Gambale W (2002). Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS Microbiol Ecol*, 39(2): 165-173.
- Sterflinger K, Piñar G (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art—tilting at windmills? *Appl Microbiol Biot*, 97: 9637-9646.
- Vedashree S, Sateesh MK, Lakshmeesha T, Mohammed SS, Vedamurthy A (2013). Screening and assay of extracellular enzymes in *Phomopsis azadirachtae* causing die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology*, 9(4): 915-927.
- Zucconi L, Canini F, Isola D, Caneva G (2022). Fungi affecting wall paintings of historical value: A worldwide meta-analysis of their detected diversity. *Applied Sciences*, 12(6): 2988.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI ON PAINTED WALL SURFACES IN HOA LAC AREA

Nguyen Thi Kim Thanh<sup>1\*</sup>, Do Thi Tuyen<sup>1,2</sup>, Tran Khanh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Hieu Thu<sup>1</sup>,  
Nguyen Viet Thang<sup>1</sup>, Georgiy M Bukharev<sup>1</sup>, Ngo Cao Cuong<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

### SUMMARY

The growth of fungi on painted wall surfaces greatly impacts on the aesthetics, structure and quality of the wall. To evaluate the antifungal effectiveness, wall paint with added biocide was tested in a closed room in Hoa Lac. The objective of this study was to isolate and study the biological characteristics of harmful fungal strains growing on painted wall surfaces with added biocide and control without biocide in Hoa Lac area. Evaluation of the fungi isolated from 8 samples collected on the painted wall surface in the laboratory showed that 1-4 strains were present on each collected samples, the average fungal density on the isolated petri dish ranged from 0.92-34.48 CFU/cm<sup>2</sup>, in which, the number of strains and the average fungal density on the painted wall samples with added biocide were lower than the control samples without added biocide. A total of 7 different fungal strains were isolated. Based on the morphological characteristics of colonies, conidiophores, spores, and similarity comparison with ITS region sequences on the GenBank database (NCBI), 7 isolated fungal strains were identified including *Fusarium* sp. S1.1, *Aspergillus flavus* S1.2, *Penicillium citrinum* S1.3, *Aspergillus niger* S2.1, *Aspergillus* sp. S3.3, *Aspergillus nomiae* S5.3, *Aspergillus frequens* S6.2. Most strains were capable of producing extracellular enzymes including cellulase and laccase. The strain of *Penicillium citrinum* S1.3 had the best activity with both types of enzymes. Thus, this study initially evaluated the effectiveness of adding biocide to the wall paint, and at the same time provided data for further research on antifungal active ingredients to improve the protective ability of wall paint.

**Keywords:** Biocide, antifungal active ingredients, fungi, biodegradation, wall paint.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0982010336; Email: ngocaocuong2011@gmail.com; Tel: 0983124291; Email: kimthanht2301@gmail.com

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG VI NẤM *Monascus* sp. SINH TỔNG HỢP CITRININ THẤP

Nguyễn Thị Thùy Trang, Đạo Nữ Diệu Hồng, Nguyễn Thị Dung, Bùi Lê Khả Tú,  
Võ Nguyễn Thanh Thảo, Nguyễn Văn Toàn, Hà Thị Loan

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Tăng lipid máu là tình trạng tăng một hoặc nhiều thông số lipid máu như HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerid dẫn đến nhiều bệnh lý và biến chứng nguy hiểm như nhồi máu cơ tim, tai biến mạch máu não... Hiện nay, gạo lên men đỏ từ chủng nấm mốc *Monascus* sp. đã được ghi nhận là liệu pháp tự nhiên hàng đầu cho cơ thể gặp các vấn đề về tăng lipid máu. Nghiên cứu này hướng đến phân lập và tuyển chọn chủng *Monascus* sp. tạo sắc tố đỏ và monacolin K có hoạt tính sinh học liên quan đến khả năng làm giảm cholesterol, đồng thời hàm lượng độc tố citrinin sinh ra thấp, đạt điều kiện an toàn khi ứng dụng vào sản xuất sản phẩm. Kết quả nghiên cứu đánh giá trên 10 chủng, trong đó có 1 chủng chuẩn *Monascus purpureus* làm đối chứng và 9 chủng vi nấm phân lập được có hình thái tương tự vi nấm *Monascus* sp. Tất cả 10 chủng đều tạo sắc tố đỏ với hàm lượng từ 59,9 đến 1302,8 AU/g và có sự xuất hiện vạch tương ứng với lovastatin trên tấm sắc ký bản mỏng (TLC). Bốn chủng gồm GHR1, C1.11, C2.8 và *M. purpureus* không thể hiện rõ vạch citrinin bằng phương pháp định tính được lựa chọn để đánh giá sự phát triển của hệ sợi và định lượng hàm lượng citrinin. Chủng GHR1 và C2.8 thể hiện đường kính khuẩn lạc lớn nhất sau 21 ngày nuôi cấy, đạt lần lượt  $75,5 \pm 1,3$  mm và  $74,8 \pm 3,8$  mm, trong khi đó chủng C1.11 có hàm lượng citrinin sinh ra thấp nhất, chỉ 0,002 ppm. Vì vậy, chủng C1.11 được chọn để tiến hành định danh sinh học phân tử, kết quả tương đồng hơn 99% với chủng *M. purpureus*, tiềm năng ứng dụng sâu hơn nhằm tạo các sản phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ giảm cholesterol.

**Từ khóa:** Citrinin, cholesterol, gạo lên men đỏ, monacolin K, *Monascus* sp., tim mạch, triglycerid.

### MỞ ĐẦU

Nấm mốc *Monascus* có ưu điểm dễ sinh trưởng trên các chất nền đơn giản như gạo, đậu nành hay các loại ngũ cốc khác, tổng hợp được các hợp chất chuyển hoá mang nhiều hoạt tính sinh học có giá trị, trong đó đáng chú ý nhất là các sắc tố (đỏ, cam, vàng) và monacolin K (Egea *et al.*, 2023). Vì vậy, từ xa xưa loại nấm mốc này đã được sử dụng trong y học cổ truyền và trong nền ẩm thực ở các nước châu Á như một chất tạo màu tự nhiên. Monacolin K là một dạng lactone của lovastatin, được xem là một statin tự nhiên, nổi bật với khả năng làm giảm mức cholesterol ở người và được đánh giá như một loại thuốc hạ lipid máu (Suraiya *et al.*, 2018), đồng thời có khả năng hỗ trợ điều trị bệnh cơ (Vercelli *et al.*, 2006) và bảo vệ hệ thần kinh (Lin *et al.*, 2015). Matthew và đồng tác giả (2009) đã kết luận rằng trong 2,4 g men gạo đỏ có thể chứa khoảng 4,8 mg lovastatin, tương đương 0,2% tổng liều cần dùng một ngày. Bên cạnh monacolin K, sắc tố đỏ cũng được nhiều nghiên cứu đánh giá cao về các hoạt tính sinh học tốt cho sức khỏe như giảm huyết áp, kháng khuẩn, kháng ung thư (Hsu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2017) cũng như khả năng hạ đường huyết và điều hoà quá trình chuyển hoá lipid và cholesterol (Zhou *et al.*, 2019). Vì những lợi ích kể trên, y học hiện đại đã ghi nhận gạo lên men đỏ từ nấm *Monascus* là liệu pháp tự nhiên hàng đầu cho người có cholesterol cao, đã được chấp thuận sử dụng như một loại thực phẩm bổ sung hay trong các đơn thuốc theo toa ở châu Á, Hoa Kỳ và các nước châu Âu. Tuy nhiên, trong quá trình lên men, loại nấm *Monascus* cũng sản sinh độc tố citrinin gây nhiều tác động không tốt cho gan và thận, đặc biệt là chi *Monascus purpureus*. Kiểm soát nồng độ citrinin là một vấn đề cực kì quan trọng vì citrinin có tính chất bền với nhiệt, nhiệt độ phân hủy lên đến 172°C ở điều kiện khô và ở 140°C trong nước, hơn nữa các sản phẩm phân hủy thu được khi đun nóng citrinin với nước ở 140–150°C có độc tính ngang bằng hoặc độc hơn citrinin ban đầu (Pan *et al.*, 2014). Nồng độ an toàn của citrinin được đề xuất trong các sản phẩm lên men của *Monascus* là 2 ppm hoặc thấp hơn ở nhiều quốc gia trên thế giới (Chai *et al.*, 2020).

Vì vậy, bên cạnh việc phân lập, tuyển chọn chủng *Monascus* sp. có sinh tổng hợp sắc tố đỏ và monacolin K, quá trình sàng lọc chủng ít sinh ra citrinin cũng cần được quan tâm. Đây là một hướng nghiên cứu phù hợp và cần thiết tạo tiền đề ứng dụng vào các sản phẩm có chất lượng và an toàn nhằm chăm sóc sức khỏe và hỗ trợ giảm cholesterol trong tương lai, đồng thời gia tăng giá trị kinh tế cho ngành nông nghiệp sản xuất gạo của Việt Nam.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Mẫu gạo và bột gạo đỏ (bột hồng cúc) được thu thập trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh.

## Phương pháp nghiên cứu

### Phương pháp phân lập và sàng lọc chủng nấm *Monascus*

Một gam các mẫu cơm để lên men tự nhiên và các sản phẩm bột gạo đồ thu thập trong thị trường được cấy vào đĩa thạch môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), ủ ở 28°C và theo dõi liên tục từ 5 đến 17 ngày. Khi sợi nấm lan to, cấy chuyển qua đĩa môi trường MGA (Maltose, Glucose, Agar) để quan sát hình thái và chọn lọc dựa trên các đặc điểm đặc trưng về hình dạng khuẩn lạc, màu sắc, và quan sát hình thái vi thể dưới kính hiển vi quang học.

### Phương pháp định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin

Định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin được tiến hành theo phương pháp của Seenivasana và đồng tác giả (2015) có điều chỉnh. Cụ thể, sinh khối nấm được nuôi trên môi trường MGA trong 14 ngày, sau đó đông khô ở nhiệt độ -80°C. Mẫu nấm đông khô sau khi thu được bổ sung thêm 20 mL ethyl acetate và 5 mL nước cất để lắc qua đêm ở 28°C, 200 rpm/phút. Tiến hành lọc dịch chiết qua giấy lọc, thu dịch nổi, cô quay nhằm cô đặc dịch chiết và thực hiện định tính monacolin K và citrinin trên tấm sắc ký.

Sự hiện diện của monacolin K được xác định bằng pha động với hệ dung môi gồm dichloromethane:acetone (8:1) và citrinin được xác định bằng pha động là hệ dung môi cloroform:acetone:ethanol (5:4:1,5). Các chủng nấm xuất hiện vạch tương đương với vạch chuẩn được đánh giá có monacolin K và citrinin.

### Phương pháp khảo sát khả năng sinh sắc tố đỏ

Đánh giá khả năng sinh sắc tố đỏ của các chủng nấm theo phương pháp của Chen và đồng tác giả (2022), cụ thể như sau: sinh khối nấm nuôi trên môi trường MGA sau 21 ngày được sấy khô 24 giờ ở nhiệt độ 50°C, nghiền mịn. Ethanol 70% được bổ sung vào mẫu theo tỷ lệ 50:1 và lắc 200 rpm ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, ly tâm 7000 rpm trong 10 phút thu dịch nổi, đo độ hấp thụ ở các bước sóng 505 nm (sắc tố đỏ) với mẫu đối chứng âm là ethanol 70%.

Tổng sắc tố hấp thụ được tính theo công thức:  $(AU/g) = Abs \times (10/0,5) \times df$ .

Trong đó: Abs: độ hấp thụ mẫu, df: hệ số pha loãng.

### Phương pháp khảo sát sự phát triển của khuẩn lạc

Tốc độ phát triển của các chủng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính phát triển của sợi tơ nấm lan trên đĩa petri ở các thời điểm sau 7, 14, 21 ngày nuôi trên môi trường MGA.

Đường kính hệ sợi trên đĩa petri được tính theo công thức:

$$d = \frac{d_1 + d_2}{2} \text{ (mm)}$$

Trong đó,  $d_1$  (mm) và  $d_2$  (mm) là độ dài hai đường chéo phần khuẩn lạc phân bố,  $d$  (mm) là giá trị trung bình của đường kính hệ sợi.

### Phương pháp định lượng citrinin bằng phân tích LC-MS/MS

Sinh khối khô chủng nấm khảo sát được chiết xuất bằng ACN (1:100 w/v) trong máy siêu âm ở 30°C trong 30 phút, sau đó gia nhiệt cách thủy ở 60°C trong 1 giờ và ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi. Bổ sung 0,01 g chất hấp phụ (MgSO<sub>4</sub>: Na-Acetate, điều chỉnh) vào 1 mL dịch nổi sau đó ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút trong 5 phút. Lọc qua màng lọc 0,2 μm và bơm dịch lọc vào máy LC-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class, Waters). Chuyển mẫu vào vial và đem phân tích bằng LC-MS/MS. Đường chuẩn được xác định với các nồng độ và diện tích peak liên quan.

Pha động và chế độ gradient: Thay đổi và tối ưu thành phần pha động với mẫu, mẫu chuẩn và chất chuẩn bằng cách thay đổi thành phần và tỷ lệ pha động: thực hiện phân tích mẫu thêm chuẩn lần lượt với pha động. Cố định các điều kiện sắc ký: Cột C18, tốc độ dòng: 0,3 mL/ phút, thể tích bơm mẫu 5 μL. Pha động 1: Kênh A: 10 mM amonium formate trong H<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH) Kênh B: ACN (0,1% HCOOH). Pha động 2: Kênh A: 10 mM Amonium acetate trong MeOH (0,1% HCOOH) Kênh B: ACN (0,1% HCOOH).

### Phương pháp định danh loài

Chủng nấm tối ưu nhất sẽ được chọn để định danh loài bằng phương pháp giải trình tự ở vùng ITS và LSU. Sinh khối nấm được nuôi trong môi trường PDB ở 28°C trong 72 giờ, được tách chiết DNA tổng số, khuếch đại vùng gene ITS và vùng LSU bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) và LR7 (TAC TAC CAC CAA GAT) bao gồm các thành phần phản ứng 2.5 μL Buffer 10X, 2.5 μL dNTP, 0.5 μl Mồi xuôi (10μM), 0.5 μl Mồi ngược (10μM), 0.25 μl Taq DNA polymerase, 2 μl DNA tổng số (10 - 100 ng), ddH<sub>2</sub>O vừa đủ 25 μl với chu trình nhiệt: biến tính DNA ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi ở 56°C trong 45 giây, tổng hợp kéo dài DNA 72°C trong 1 phút và kết thúc bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72°C trong 7 phút và lưu trữ ở 4°C. Tinh sạch sản phẩm PCR theo bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Thực hiện PCR phản ứng PCR sequencing thể tích 10 μL với BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix. Sản phẩm PCR sequencing được tinh sạch





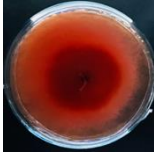




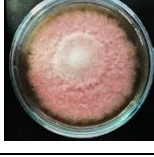

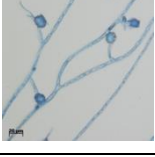


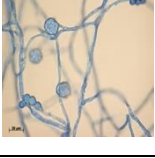
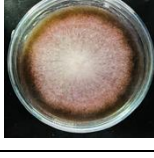
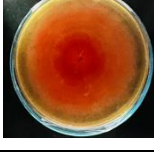




bằng Sephadex G-50. Bổ sung 15 µl HiDi, gia nhiệt 95°C trong 5 phút, giải trình tự 3500, tinh sạch sản phẩm PCR, giải trình tự Sanger, xác định trình tự tự động bằng máy ABI 3500 Genetic Analyzer, phân tích trình tự bằng chương trình BLAST của NCBI, xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA-10, phân tích phát loài bằng phương pháp Neribor Joining với chỉ số bootstrap là 1000, định danh các chủng đã phân lập.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**



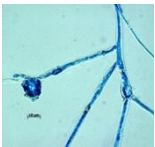


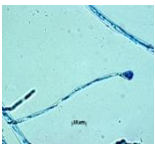
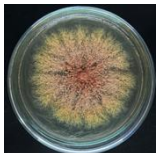

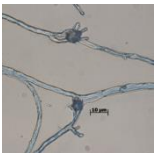
**Phân lập và tuyển chọn chủng *Monascus***

Từ hơn 20 mẫu gạo và sản phẩm bột gạo đỏ, nghiên cứu đã phân lập và sàng lọc được 9 chủng vi nấm nghi ngờ là chủng *Monascus* với hình thái khuẩn lạc và vi thể theo mô tả của của Alberto và đồng tác giả (2004). Hệ sợi ban đầu có màu trắng sau đó chuyển dần sang màu đỏ, hồng hoặc cam, vàng. Khi quan sát dưới kính hiển vi, sợi nấm có cấu trúc phân đốt, có vách ngăn, bào tử túi có hình cầu (đơn độc) hoặc hình trứng (đơn độc hoặc theo chuỗi). Hình thái cụ thể của từng chủng đề thể hiện ở Bảng 1.

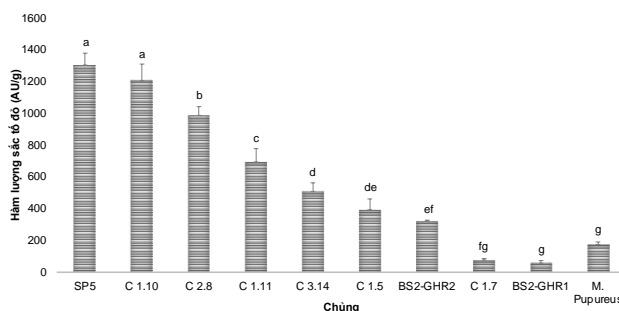
**Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc và vi thể các chủng vi nấm phân lập nghi ngờ là chủng *Monascus* sp.**

Chủng phân lập	Hình ảnh khuẩn lạc		Hình ảnh vi thể	Mô tả
	Mặt trước	Mặt sau		
SP5				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu đỏ ở trung tâm, có các vòng tròn đồng tâm màu hồng và trắng xen kẽ, rìa chia thùy.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, theo chuỗi 3-4 bào tử.</li> </ul>
C3.14				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu trắng và phồng lên ở trung tâm chuyển sang màu hồng nhạt, mặt sau vùng trung tâm có màu đỏ đậm chuyển nhạt dần.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, đơn độc.</li> </ul>
C2.8				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu vàng cam, rìa gợn sóng. Mặt sau có màu cam đậm ở trung tâm chuyển dần sang màu vàng.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng theo chuỗi (3-4 bào tử) và hình cầu (đơn độc).</li> </ul>
C1.5				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu trắng và phồng lên ở trung tâm chuyển sang màu hồng nhạt, mặt sau vùng trung tâm có rãnh, màu cam đậm chuyển nhạt dần.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, đơn độc.</li> </ul>
C1.11				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu trắng và hồng đồng tâm xen kẽ, rìa gợn sóng. Mặt sau có đỏ đậm.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình cầu, đơn độc.</li> </ul>
C1.10				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có trắng ở trung tâm chuyển sang màu hồng nhạt, rìa tròn đều. Mặt sau có màu cam đậm.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng theo chuỗi (3-4 bào tử) và hình cầu (đơn độc).</li> </ul>
C1.7				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu vàng nhạt ở trung tâm chuyển sang màu trắng, rìa tròn đều. Mặt sau có màu đỏ chuyển vàng nhạt.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình cầu, đơn độc.</li> </ul>



GHR1				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm màu trắng ở trung tâm, chuyển dần sang màu hồng nhạt, rìa gợn sóng.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình cầu, đơn độc.</li> </ul>
GHR2				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm màu hồng ở trung tâm, chuyển dần sang màu hồng nhạt, rìa có màu cam gợn sóng.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, đơn độc.</li> </ul>
<i>M. purpureus</i>				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm màu đỏ ở trung tâm, chuyển dần sang màu vàng cam, rìa chia thùy.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình cầu, đơn độc.</li> </ul>

**Kết quả khảo sát khả năng sinh sắc tố đỏ**



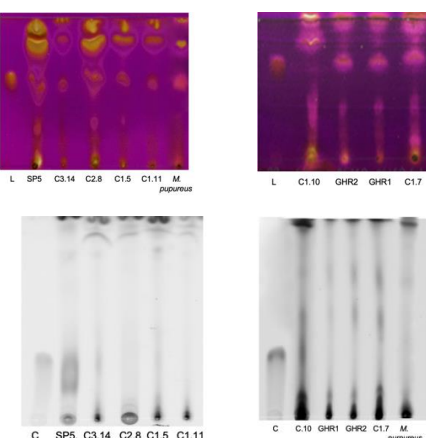
**Biểu đồ 1. Hàm lượng sắc tố đỏ (AU/g) của các chủng nấm nghi ngờ *Monascus* sp.**

Sắc tố đỏ từ *Monascus* được biết đến nhiều như một chất phụ gia tạo màu thực phẩm nhờ tính ổn định, hoà tan tốt và màu sắc tươi sáng. Gần đây, sắc tố đỏ còn được xem là một tiêu chí cần thiết trong các sản phẩm lên men từ *Monascus* vì các lợi ích sức khỏe mà nó đem lại (Xu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019). Biểu đồ 1 thể hiện khả năng sinh sắc tố đỏ của 9 chủng phân lập và chủng *M. purpureus* (đối chứng). Trong đó chủng SP5 sinh sắc tố đỏ cao nhất trong 10 chủng khảo sát, đạt 1302,8 ± 76,9 AU/g và cao gấp 7 lần so với chủng đối chứng và chủng thấp nhất là GHR1 với giá trị đạt 59,9 ± 9,0 AU/g, thấp hơn so với chủng đối chứng 2,9 lần. Kết quả này tương đương với Nguyễn Ngọc Thạnh và đồng tác giả (2022) nghiên cứu trên chủng *M. purpureus* và ở mức trung bình so với nghiên cứu của Nguyễn Minh Lý và Lê Thị Mai (2023). Như vậy, trong 10 chủng khảo sát, tất cả các chủng đều có khả năng sinh sắc tố đỏ nhưng ở các mức độ khác nhau, bốn chủng được đánh giá cao nhất gồm SP5, C1.10, C2.8 và C1.11.

**Kết quả định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin**

**Bảng 2. Kết quả định tính Monacolin K và Citrinin ở các chủng phân lập bằng phương pháp TLC**

Chủng	Monacolin K	Citrinin
SP5	+	+
C3.14	+	+
C2.8	+	-
C1.5	+	+
C1.11	+	-
C1.10	+	+
C1.7	+	+
GHR1	+	-
GHR2	+	+
<i>M. purpureus</i>	+	-

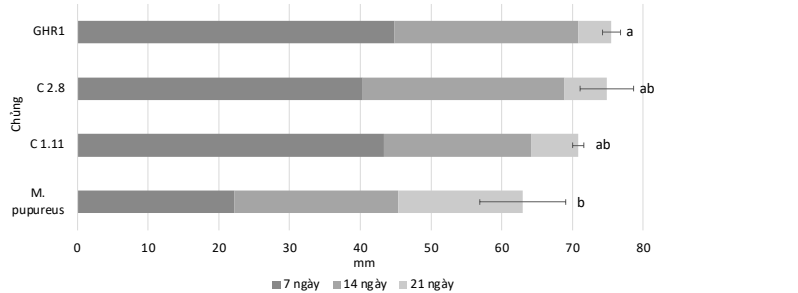


Ghi chú: Chất chuẩn Lovastatin ký hiệu L, Citrinin ký hiệu C.

Trong sản phẩm gạo lên men để ứng dụng giảm cholesterol, hợp chất có lợi mong muốn thu nhận là monacolin K và hợp chất không mong muốn là citrinin. Kết quả định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin của các chủng khảo sát được thể hiện trong bảng 2. Trên tấm TLC, tất cả các chủng đều xuất hiện vạch tương ứng với vạch Lovastatin chuẩn, chứng tỏ trong sinh khối nấm có monacolin K. So sánh với vạch citrinin chuẩn, 4/10 chủng gồm C1.11, C2.8, GHR1 và *M. purpureus* không thấy sự xuất hiện vạch tương đương, chứng tỏ các chủng này không sinh hoặc sinh ít citrinin. Vì vậy, bốn chủng C1.11, C2.8, GHR1, *M. purpureus* phù hợp với mục tiêu nghiên cứu nên được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

**Kết quả khảo sát sự phát triển của khuẩn lạc**

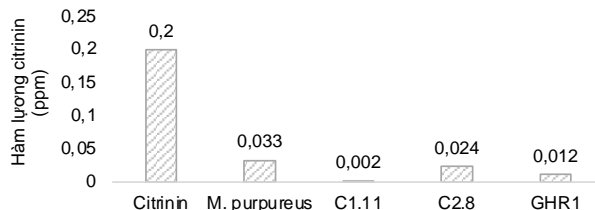
Sự tăng trưởng đường kính khuẩn lạc là một trong những yếu tố được quan tâm nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng nấm mốc nói chung và *Monascus* sp. nói riêng. Kết quả đánh giá đường kính của 4 chủng GHR1, C2.8, C1.11 và *M. purpureus* được thể hiện trong Biểu đồ 2. Đường kính khuẩn lạc phát triển mạnh mẽ nhất trong 7 ngày đầu, hầu hết chiếm ½ đường kính khuẩn lạc trong thời gian 21 ngày khảo sát. Trong 7 ngày tiếp theo, đường kính phát triển chậm hơn và không tăng nhiều ở thời điểm 7 ngày cuối cùng của khảo sát do sinh khối nấm nhiều và hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường bắt đầu cạn kiệt. Trong 4 chủng khảo sát, chủng GHR1 và C2.8 có đường kính khuẩn lạc lớn nhất, đạt lần lượt 75,5 ± 1,3 mm và 74,8 ± 3,8 mm, tiếp đến là chủng C1.11 đạt 70,8 ± 0,8 mm và thấp nhất là chủng *M. purpureus* đạt 63,0 ± 6,1 mm.



**Biểu đồ 2. Đường kính khuẩn lạc (mm) các chủng khảo sát trên môi trường MGA sau 21 ngày**

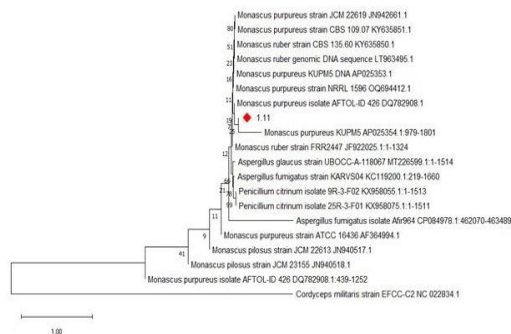
**Kết quả định lượng citrinin bằng phân tích LC-MS/MS**

Hàm lượng citrinin cho phép tối đa trong các sản phẩm lên men *Monascus* là 2 ppm hoặc thấp hơn. Trong nghiên cứu của Ji và đồng tác giả (2015), có 10/12 sản phẩm bột gạo đỏ thương mại phát hiện hàm lượng citrinin từ 0,14 đến 44,24 ppm và 2 sản phẩm không xác định được. Biểu đồ 3 cho thấy cả bốn chủng khảo sát đều có hàm lượng citrinin thấp hơn nhiều so với đối chứng (0,2 ppm), trong đó hàm lượng citrinin thấp nhất ở chủng C1.11 chỉ 0,002 ppm. Do đó, chủng C1.11 có tiềm năng rất lớn để ứng dụng vào các sản phẩm hỗ trợ giảm cholesterol trong tương lai là chủng được chọn để định danh sinh học phân tử.



**Biểu đồ 3. Hàm lượng citrinin (ppm) sinh ra ở các chủng nấm sàng lọc**

**Kết quả định danh loài**



**Hình 1. Cây phát sinh loài vùng ITS5 và LR7 thể hiện mối quan hệ họ hàng của chủng C1.11. Thang 1.00 biểu thị khoảng cách di truyền**

Thông qua kết quả giải trình tự PCR bằng cặp mồi ITS4/ITS5 và LR7-LSU, chủng C1.11 được xác định là chủng *Monascus purpureus* với sự tương đồng cao, lớn hơn 99% trên ngân hàng gen NCBI. Hình 3.6 mô tả cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ gần của chủng C1.11 bằng phương pháp Neighbor-Joining, Maximum Likelihood, bootstrap 1000 trong MEGA.

## KẾT LUẬN

Chủng C1.11 được phân lập từ gạo và định danh sinh học phân tử có trình tự tương đồng với chủng *M. purpureus*. *M. purpureus* cũng là chủng được sử dụng để lên men gạo đỏ phổ biến trong thực phẩm và được phẩm trên thị trường hiện nay. Chủng C1.11 đáp ứng đủ điều kiện chất lượng và an toàn khi ứng dụng trong sản phẩm gạo lên men vì khả năng tổng hợp sắc tố, monacolin K, đồng thời hàm lượng độc tố citrinin sinh ra rất thấp. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng cần đánh giá và khảo sát thêm điều kiện nuôi cấy nhằm thu nhận tối đa hàm lượng Monacolin K có thể tổng hợp được ở chủng này.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh cũng như Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã luôn quan tâm và tạo điều kiện để chúng tôi hoàn thành nội dung nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alberto MS, José FC, Samir KA, Josep G (2004). New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. *Stud Mycol*, 50:299–306.
- Chai X, Ai Z, Liu J, Guo T, Wu J, Bai J, Lin Q (2020). Effects of pigment and citrinin biosynthesis on the metabolism and morphology of *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Food Sci Biotechnol*, 29(7):927-937.
- Chen YP, Wu HT, Hwang IE, Chen FF, Yao JY, Yin Y, Chen MY, Liaw LL, Kuo YC. Identification of the high-yield monacolin K strain from *Monascus spp.* and its submerged fermentation using different medicinal plants. *Bot Stud*, 63(1):20.
- Egea BM, Dantas LA, Sousa LT, Lima GA, Lemes CA (2023). The potential, strategies, and challenges of *Monascus* pigment for food application. *Front. Sustain. Food Syst*, 7:1141644.
- Ji X, Xu J, Wang X, Qi P, Wei W, Chen X, Li R, Zhou Y (2015). Citrinin Determination in Red Fermented Rice Products by Optimized Extraction Method Coupled to Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *J. Food Sci*, 80(6):1438–1444.
- Lin CM, Lin YT, Lin RD, Huang WJ, Lee MH (2015). Neurocytoprotective effects of aliphatic hydroxamates from lovastatin, a secondary metabolite from *Monascus*-fermented red mold rice, in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells. *ACS Chem Neurosci*, 6:716–724.
- Hsu YW, Hsu, LC, Chang, CL, Liang YH, Kuo YH, Pan TM, 2010. New antiinflammatory and anti-proliferative constituents from fermented red mold rice *Monascus purpureus* NTU 568. *Molecules*, 15: 7815–7824.
- Nguyễn Minh Lý, Lê Thị Mai (2023). Tuyển chọn chủng nấm *Monascus purpureus* có khả năng sinh sắc tố đỏ, sắc tố vàng cao nhất và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa của dịch chiết sắc tố. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, Tập 59, Số chuyên đề: Giáo dục Đồng bằng sông Cửu Long*, 86-92.
- Matthew K, Wang S, Ogunkanmi A (2009). Safety and efficacy of red yeast rice (*Monascus purpureus*) as an alternative therapy for hyperlipidemia. *P T*. 34(6):313-27.
- Nguyễn Ngọc Thanh, Phạm Thị Minh Thư, Lưu Minh Châu, Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong (2022), *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, Tập 20, Số 3: 350-358.
- Pan TM, Hsu WH (2014). *Monascus*-Fermented Products. Encyclopedia of Food Microbiology (2nd ed). *Reference Module in Food Science*.
- Seenivasana A, Sathyanarayana NG, Tapobrata P, Thomas T (2015). Quantification of Lovastatin Produced by *Monascus purpureus*. *Open Biotechnol J*, 9:6-13.
- Suraiya S, Kim JH, Tak JY, Siddique MP, Young CJ, Kim JK, Kong IS (2018). Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate. *LWT Food Sci Technol*, 92(2018):1-9.
- Vercelli L, Mongini T, Olivero N (2006). Chinese red rice depletes muscle coenzyme Q<sub>10</sub> and maintains muscle damage after discontinuation of statin treatment. *J Am Geriatr Soc*, 54(4):718–720.
- Xu B, Wang Q, Sung C (2017). Telomerase Inhibitory Effects of Red Pigment Rubropunctatin and Statin Monacolin L Isolated from Red Yeast Rice. *Genes*, 8(5): 129.
- Zhou W, Guo R, Guo W, Hong J, Li L, Ni L, Sun J, Liu B, Rao P, Lv X (2019). *Monascus* yellow, red and orange pigments from red yeast rice ameliorate lipid metabolic disorders and gut microbiota dysbiosis in Wistar rats fed on a high-fat diet. *Food Funct*, 10(2):1073-1084.

## ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF *Monascus* sp. LOW CITRININ BIOSYNTHESIS

Nguyen Thi Thuy Trang, Dao Nu Dieu Hong\*, Nguyen Thi Dung, Bui Le Kha Tu,  
Vo Nguyen Thanh Thao, Nguyen Van Toan, Ha Thi Loan

Biotechnology Center Of Ho Chi Minh City

### SUMMARY

Hyperlipidemia is a condition in which one or more blood lipid parameters increase such as HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides, leading to many dangerous diseases and complications such as myocardial infarction, stroke, etc. Red fermented rice from the *Monascus* sp. has been recognized as the natural therapy for the hyperlipidemia body. This study aims to isolate and screen *Monascus* sp. biosynthesis of red pigment and monacolin K as biological activities related to the ability to reduce cholesterol. Besides, the citrinin toxin content produced is low, meeting safe conditions when applied in product production. The study's results were evaluated on 10 strains, including 1 standard strain *Monascus purpureus* as a control and 9 isolated mold strains with morphology similar to *Monascus* sp. All 10 strains produced red pigments with concentrations ranging from 59.9 to 1302.8 AU/g and appeared spots corresponding to Lovastatin on the TLC plate. Four strains including GHR1, C1.11, C2.8, and *Monascus purpureus* that did not clearly show citrinin spot were selected to evaluate the growth of mold mycelium and quantify citrinin content. Strains GHR1 and C2.8 exhibited the largest colony diameters after 21 days of culture, reaching  $75.5 \pm 1.3$  mm and  $74.8 \pm 3.8$  mm, respectively, while strain C1.11 had the lowest amount of citrinin produced only 0.002 ppm. Therefore, strain C1.11 was chosen to conduct molecular biological identification. The results were more similar in sequence than 99% to the *Monascus purpureus* strain. C1.11 strain have the potential for further application to create health protection products that support cholesterol reduction.

**Keywords:** Citrinin, cholesterol, red yeast rice, monacolin K, *Monascus* sp., heart disease, triglycerid.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0908746312; Email: dndhong.snn@tphcm.gov.vn

# ỨNG DỤNG BỨC XẠ GAMMA (TỪ NGUỒN COBALT-60) XỬ LÝ NẤM MỐC TRÊN SẢN PHẨM NÓN THỦ CÔNG MỸ NGHỆ LÀM TỪ CỎ

Hoàng Thanh Phi Hùng<sup>1\*</sup>, Cao Văn Chung<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lý<sup>1</sup>, Lê Thị Nhật Anh<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Huy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

## TÓM TẮT

Sản phẩm thủ công mỹ nghệ làm từ cỏ đóng góp một phần quan trọng về văn hóa và nghệ thuật dân gian. Với khí hậu nhiệt đới gió mùa, kết hợp với độ ẩm cao của nước ta, các sản phẩm mỹ nghệ từ cỏ thường bị nấm mốc tấn công. Nấm mốc không chỉ làm giảm giá trị thẩm mỹ của các sản phẩm mà còn ảnh hưởng đến tính hữu dụng và sức khỏe người sử dụng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát tính khả thi của tia bức xạ gamma từ nguồn cobalt-60 trong việc xử lý nấm mốc có nguồn gốc từ các sản phẩm thủ công làm từ cỏ. Chúng tôi tiến hành phân tích định danh chủng nấm trên các sản phẩm mỹ nghệ ở Thành phố Huế. Nuôi cấy chủng nấm này và khảo sát liều chiếu diệt nấm trên cơ sở tham khảo liều diệt nấm trong khoảng  $8\pm 1$  kGy, tiến hành chiếu liều 9 kGy thì cho hiệu quả diệt nấm mốc 100%, sau 03 tháng theo dõi không thấy sự phục hồi của nấm mốc trên các mẫu nấm đã chiếu với liều 9 kGy. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng áp dụng bức xạ gamma là một giải pháp tiềm năng để bảo quản và bảo vệ các sản phẩm thủ công làm từ cỏ.

*Từ khóa:* Bức xạ gamma, *Penicillium citrinum*, thủ công mỹ nghệ, liều chiếu xạ, bảo quản.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghề thủ công mỹ nghệ Việt Nam vốn có truyền thống từ lâu đời, không chỉ đem lại lợi ích kinh tế mà còn chứa đựng nhiều nét đẹp văn hoá làng quê Việt Nam. Sản phẩm thủ công mỹ nghệ là những sản phẩm mang tính truyền thống và độc đáo của từng vùng, có giá trị chất lượng cao, vừa là hàng hoá, vừa là sản phẩm văn hoá, nghệ thuật, mỹ thuật, thậm chí có thể trở thành di sản văn hoá của dân tộc, mang bản sắc văn hoá của vùng lãnh thổ. Việt Nam là một quốc gia nằm ở Bắc bán cầu, do đó khí hậu nước ta chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của gió mùa dịch và gió mùa, cùng với độ ẩm cao là điều kiện lý tưởng cho các loại nấm mốc phát triển. Nấm mốc không chỉ làm giảm giá trị thẩm mỹ của các sản phẩm mà còn ảnh hưởng đến tính hữu dụng và sức khỏe người sử dụng (Bush *et al.*, 2006; Lstiburek *et al.*, 2002).

Các phương pháp hiện tại để xử lý mốc thường dựa vào sử dụng hóa chất, tiềm ẩn nguy cơ gây hại cho môi trường và sức khỏe con người. Sự phát triển của nấm mốc trên các sản phẩm thủ công từ cỏ đặt ra thách thức lớn đối với việc duy trì chất lượng và bảo tồn các tác phẩm này. Tia bức xạ gamma được khai thác với vai trò kiểm soát các bệnh hại có nguy cơ gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người thông qua thực phẩm. Phương pháp này còn được tiếp cận với mục tiêu thân thiện với môi trường và người sử dụng nhờ khả năng xuyên màng nhưng vẫn duy trì được chất lượng của các sản phẩm tiêu dùng (Jeong, Jeong 2018). Áp dụng bức xạ gamma từ nguồn cobalt-60 như một phương pháp tiềm năng để xử lý mốc trên sản phẩm thủ công từ cỏ đã thu hút sự quan tâm nghiên cứu. Tuy nhiên, hiệu quả của việc áp dụng bức xạ gamma trong bảo quản các sản phẩm thủ công cần được khảo sát và đánh giá một cách khoa học. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng bức xạ gamma có thể tiêu diệt mốc mà không làm thay đổi tính chất vật liệu của sản phẩm (Flores, 1976; Sterflinger và Pinzari 2012). Tuy vậy, những nghiên cứu này cần tiếp tục khám phá và xác nhận tính hiệu quả của phương pháp này trong điều kiện sản xuất thực tế. Đặc biệt, cần phải xem xét khả năng áp dụng và thích hợp của công nghệ bức xạ gamma trong các phương pháp bảo quản và sản xuất thủ công mỹ nghệ. Việc phát triển và áp dụng công nghệ này có thể mở ra tiềm năng ứng dụng mới trong việc giảm thiểu mối đe dọa từ sự phát triển của nấm mốc đối với sản phẩm thủ công từ cỏ (Erramli, El Asri 2019). Tuy nhiên, việc áp dụng công nghệ bức xạ gamma cần phải được điều chỉnh và kiểm soát chặt chẽ để đảm bảo tính an toàn và hiệu quả. Thử nghiệm và nghiên cứu sâu hơn về khả năng ứng dụng của bức xạ gamma trong bảo quản các sản phẩm thủ công là cần thiết. Mặt khác, việc giới thiệu phổ biến rộng rãi ứng dụng công nghệ bức xạ này cũng đòi hỏi cao về mặt công nghệ cũng như đánh giá thêm về chi phí và khả năng triển khai hàng loạt cho các sản phẩm thủ công mỹ nghệ.

Tầm quan trọng của việc bảo tồn và phát triển sản phẩm thủ công như túi xách, mũ, nón và ví..., được làm từ cỏ không chỉ giữ gìn giá trị văn hóa mà còn thúc đẩy nền kinh tế địa phương. Do ảnh hưởng của khí hậu, độ ẩm cao, các sản phẩm thủ công làm từ cỏ luôn đối mặt với hiện trạng bị ẩm mốc. Hiện nay, một số phương pháp chống nấm mốc cho các sản phẩm thủ công làm từ cỏ như đặt bên trong 1 vài gói hạt chống ẩm chuyên dụng; vệ sinh định kỳ; sử dụng các dung dịch để vệ sinh... Tuy nhiên, các phương pháp trên đều chưa cho hiệu quả cao vì không xử lý hết các bào tử nấm mốc, các bào tử nấm mốc vẫn còn tồn tại ở các kẽ, ngóc ngách của sản phẩm, chỉ cần có điều kiện thích hợp, các bào tử này sẽ phát triển thành nấm mốc. Một trong những phương pháp hiện đại đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu, đó là phương pháp ứng dụng bức xạ gamma xử lý mốc trên các

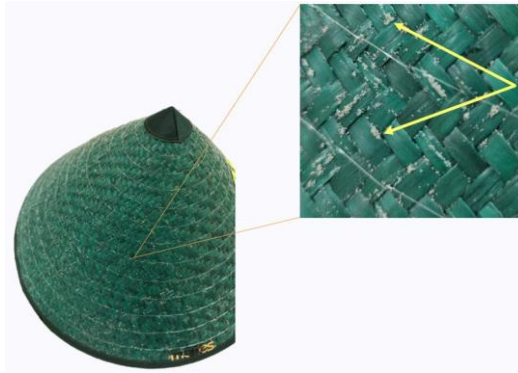
sản phẩm làm từ tre (Mao *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2018). Phương pháp chiếu xạ xử lý nấm mốc cũng được sử dụng để thanh khử trùng nấm mốc, vi sinh vật trên hoa quả, nông sản và đều mang lại kết quả tốt. Ý tưởng xử dụng bức xạ gamma để xử lý nấm mốc trên sản phẩm thủ công mỹ nghệ nếu thành công, sẽ có ý nghĩa rất lớn, mang lại lợi ích lâu dài cho các nhà sản xuất và người tiêu dùng.

Để ứng dụng phương pháp sử dụng bức xạ cho các sản phẩm làm từ cỏ, phải tiến hành các bước khảo sát, nghiên cứu đánh giá tính khả thi, và hiệu quả của phương pháp này, đặc biệt là xác định liều chiếu diệt nấm mốc tối ưu và khảo sát ảnh hưởng của bức xạ lên các tính chất vật lý, cơ học, cấu trúc của sợi cỏ hay các sản phẩm làm từ cỏ. Kết quả nghiên cứu trong bài báo này là những khảo sát bước đầu làm căn cứ để đề xuất những nghiên cứu chuyên sâu về việc ứng dụng bức xạ trong việc xử lý nấm mốc ở sản phẩm mỹ nghệ truyền thống.

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Phân lập nấm mốc và chuẩn bị chủng nấm mốc**

Chủng nấm NON được phân lập từ mẫu nấm được lấy ở trên sản phẩm nón mỹ nghệ truyền thống tại công ty TNHH Maries, thành phố Huế (Hình 1).



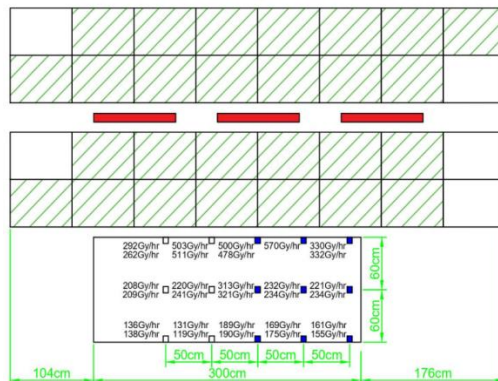
**Hình 1. Nấm mốc ở sản phẩm nón mỹ nghệ làm từ cây cỏ Bàng**

Môi trường PD: khoai tây 20 g/L, D-glucose 20 g/L; PDA: khoai tây 20 g/L, D-glucose 20 g/L, agar: 25 g/L. Nấm được xử lý bằng kỹ thuật phân lập bào tử đơn lẻ và xác định dựa vào đặc điểm hình thái và phân tích di truyền. Sử dụng kính hiển vi để xác định hình dạng bào tử nấm. DNA tổng số được tách chiết và giải trình tự theo phương pháp Sanger. Sau đó tiến hành xây dựng cây phát sinh loài.

**Nguồn chiếu xạ tia gamma**

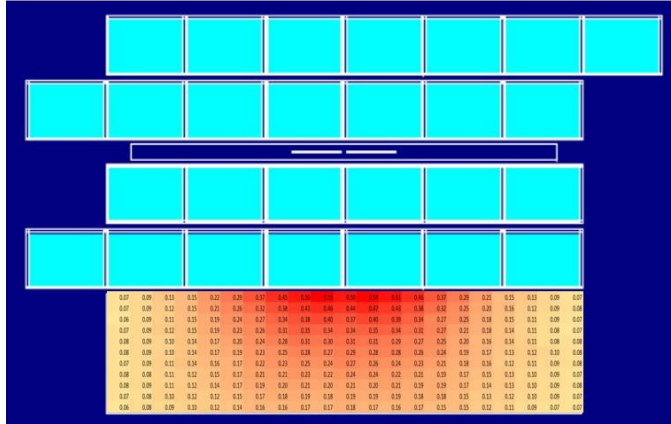
Tia gamma dùng để chiếu xạ từ nguồn Cobalt-60 tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ bức xạ - Cơ sở Chiếu xạ Đà Nẵng (Hoạt độ phóng xạ của nguồn khoảng 164 kCi tính tại tháng 6/2024).

Để đánh giá khả năng xử lý nấm bệnh, chúng tôi tiến hành khảo sát ở các mức suất liều trung bình và suất liều cao. Đối với suất liều trung bình và thấp, chúng tôi sử dụng liều kế Fricke để tiến hành đo đạc và xác định các vị trí cũng như suất liều chiếu tương ứng (được thể hiện ở Hình 2). Tương tự, chúng tôi sử dụng liều kế GEX B3 để tiến hành khảo sát suất liều chiếu cho các vị trí có suất liều cao với thiết bị đọc liều là máy quang phổ UV-Vis Genesys 30 P4400-EU của Thermo Scientific là dòng máy hiệu năng cao, cho phép đo mẫu độ chính xác cao và dễ thực hiện.



**Hình 2. Đo phân bố suất liều tại vị trí bàn chiếu mẫu**

Chúng tôi cũng tiến hành sử dụng chương trình mô phỏng MCNP để xác định suất liều tại các vị trí chiếu mẫu ở bàn chiếu mẫu. Kết quả mô phỏng tính toán cho thấy sự phù hợp với các kết quả đo thực nghiệm sử dụng liều kế Fricke và GEX B33 như Hình 3.



Hình 3. Mô phỏng tính toán phân bố suất liều tại vị trí bàn chiếu mẫu

**Phương pháp nghiên cứu**

**Phương pháp phân tích đặc điểm hình thái**

Chủng nấm NON nuôi trên đĩa petri chứa môi trường PDA sau 5 ngày được quan sát hệ sợi và sắc tố nấm dưới kính hiển vi ở vật kính 40X.

**Phương pháp đánh giá sự ảnh hưởng của liều chiếu đến khả năng sinh trưởng của nấm**

Chủng nấm NON được nuôi cấy trên môi trường PDA sau 3 - 5 ngày được mang đi chiếu.

Chủng nấm sau khi chiếu được giữ ở điều kiện phòng 28 - 35°C trong 5 ngày và được cấy chuyển trên môi trường PDA để đánh giá sự sống sót của nấm. Sau 5 ngày cấy, nấm được quan sát và đánh giá tỉ lệ sống sót.

**Phương pháp tách chiết DNA tổng số**

DNA tổng số của chủng nấm được tách chiết dựa trên phương pháp tách chiết DNA tổng số sử dụng đệm cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) theo mô tả của Sambrook và đồng tác giả với một số điều chỉnh (Sambrook *et al.*, 2001). Sợi nấm được nuôi trong 5 mL môi trường dịch chiết khoai tây PD trong 3 ngày ở 30°C và thu hồi bằng ly tâm trong 5 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút. Sợi nấm được rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy và tái huyền phù trong 500 µL đệm CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoethanol). Tế bào được ủ 65°C trong 15 phút. Dịch chiết tế bào chứa DNA tổng số được thu hồi bằng ly trong 5 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút. DNA tổng số được tách chiết và tinh sạch trong 700 µL hỗn hợp phenol: chloroform: isoopropanol (tỷ lệ 25:24:1), trộn đều bằng vortex và phân tách bằng ly tâm 5 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút. Khoảng 500 µL pha trên được chuyển sang ống 1,5 mL mới và DNA tổng số được kết tủa với 2 lần thể tích ethanol tinh khiết, rửa kết tủa bằng ethanol 70% và hòa tan trong 50 µL đệm TE. DNA tổng số sau đó được kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8% với thuốc nhuộm SafeView™ Classic™ (abm, Canada).

**PCR**

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGC GG) và ITS4 (TCCTCCGCTTAT TGATATGC). Thành phần phản ứng bao gồm 100 ng DNA tổng số, 10 pmol mỗi xuôi, 10 pmol mỗi ngược, 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega, Mỹ) trong thể tích phản ứng 20 µL. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy gia nhiệt (SimpliAmp, ThermoFisher Scientific, USA) với quy trình chạy như sau: 95°C trong 10 phút; 30 chu kỳ với 95°C trong 60 giây, 55°C trong 30 giây và 72°C trong 90 giây; kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm sau khuếch đại được điện di trên gel agarose 0,8%.

**Xây dựng cây phả hệ**

Sản phẩm PCR được gửi phân tích trình tự nucleotide ở công ty 1st BASE (Apical Scientific Sdn Bhd, Malaysia). Kết quả giải trình tự DNA được xử lý bằng phần mềm Bioedit (v7.2.5). Mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA được đánh giá bằng cách đối chiếu với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu của NCBI bằng công cụ BLAST (Basic local Alignment SearchTool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trình tự DNA được sắp xếp bằng chức năng Clustal W trên phần mềm MEGA 11 với các tham số mặc định. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1000.

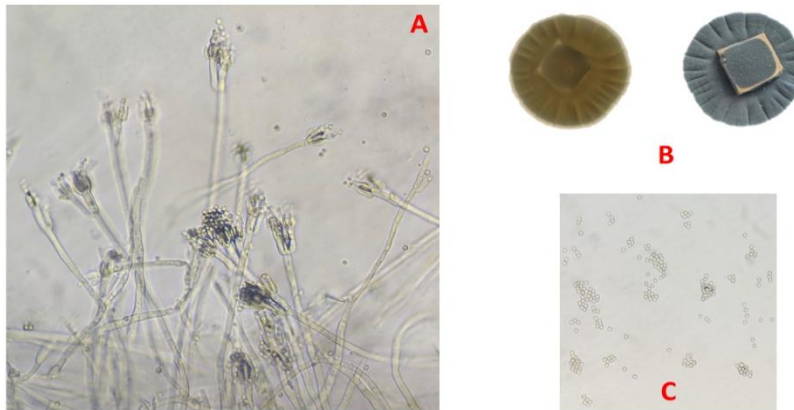
### Tiến hành chiếu gamma diệt nấm mốc

Các mẫu nấm mốc được tiến hành chiếu xạ tại các vị trí ở bàn chiếu mẫu ở Hình 3. Căn cứ vào suất liều và liều lượng chiếu xạ cần chiếu để tính toán thời gian chiếu cho phù hợp. Mỗi đĩa nấm chiếu tại các vị trí chiếu ở bàn chiếu mẫu có gán liều kế GEX B3 để theo dõi, sao sánh liều tính toán và liều chiếu thực tế.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Hình thái của chủng nấm nghiên cứu

Khi được quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X, chủng nấm NON có hệ sợi chứa bào tử ở cả mặt trước và sau khuẩn lạc, bào tử có dạng hình cầu; sợi nấm có các vách ngăn phân bố dọc theo chiều dài của sợi nấm giống các đặc điểm được mô tả trong nghiên cứu của Houbraken và đồng tác giả (2010).

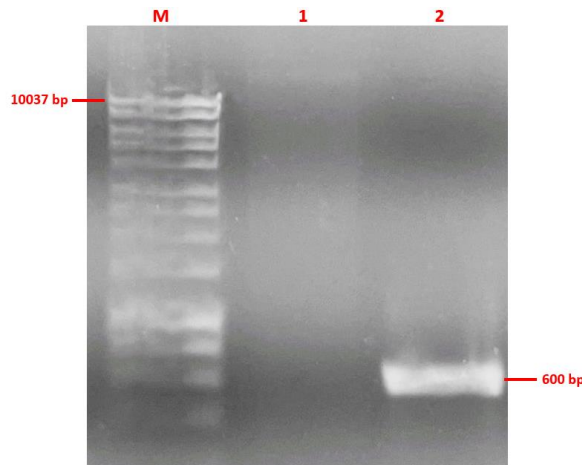


Hình 4. Hình thái nấm

A: Cấu trúc bào tử quan sát dưới kính hiển vi 40X, B: Hình thái nấm, C: Bào tử nấm quan sát kính hiển vi 40X.

#### Xác định thành phần loài

DNA tổng số tách chiết từ nấm được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR và thang chuẩn HyperLadder™ 1kb (Bioline, Mỹ) trên gel agarose 0,8% được thể hiện ở Hình 2.

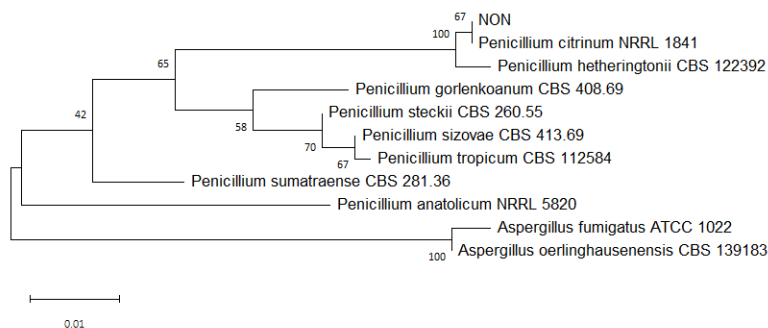


Hình 5. Kết quả điện di trên agarose 0.8%. M: HyperLadder™ 1kb (Bioline, Mỹ)

1: DNA tổng số của nấm phân lập, 2: Sản phẩm PCR vùng ITS với cặp mồi ITS1 và ITS4.

Sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng duy nhất với kích thước khoảng 600 bp. Dựa trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng GenBank nhằm mục đích tham chiếu và xác định loài nấm tương đồng nhất với trình tự khuếch đại. Kết quả thu được cho thấy, mẫu nấm phân lập có độ tương đồng đạt 99,81% so với trình tự NRRL 1841 của loài *Penicillium citrinum*. Biểu đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài của vùng ITS được biểu diễn ở Hình 6.

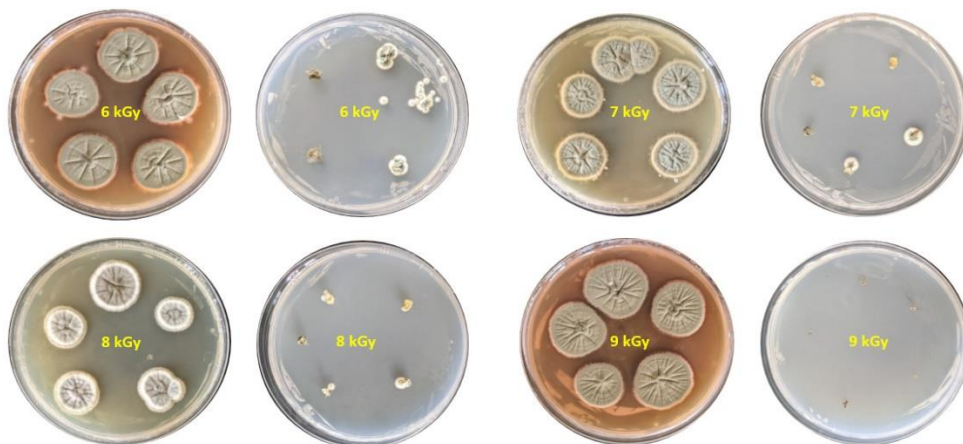




Hình 6. Cây phát sinh loài dựa trên vùng trình tự ITS

### Tác dụng ức chế phát triển nấm mốc của bức xạ gamma

Nghiên cứu quá trình ức chế bức xạ gamma và ảnh hưởng của việc chiếu xạ gamma đến sự phát triển sợi nấm chủng *Penicillium citrinum* NON thông qua việc khảo sát sơ bộ với dải liều chiếu từ 6 kGy đến 9 kGy. Kết quả khảo sát cho thấy nấm mốc bị ức chế đáng kể ở mức liều chiếu 6 kGy và hoàn toàn bị ức chế sinh trưởng ở liều chiếu 9 kGy (Hình 7).



Hình 7. Sự ảnh hưởng của tia gamma đến sự phát triển của nấm *Penicillium citrinum* NON

Tỷ lệ sống sót của nấm *Penicillium citrinum* NON giảm dần theo mức độ của liều chiếu. Ở liều chiếu 6 kGy, tại 5 vị trí nấm được chiếu, sau 5 ngày sợi nấm trên đĩa vẫn tiếp tục phát triển; đối với nấm được cấy chuyển sang đĩa PDA mới, 3/5 vị trí nấm vẫn phát triển ổn định và phát sinh bào tử. Khi tăng lên 7 kGy, tỉ lệ nấm sống sót giảm dần, chỉ còn lại 2/5 vị trí nấm có hệ sợi phát triển, tốc độ lan sợi cũng chậm hơn nhiều so với liều chiếu 6 kGy. Quan sát hình thái sợi nấm ở liều chiếu 8 kGy, sau 5 ngày chiếu xạ, hệ sợi nấm có sự phát triển từ khoảng 0,05 – 1 mm so với trước khi chiếu. Tuy nhiên, khi tiếp tục quan sát ở 5 ngày sau đó, nấm vẫn tiếp tục duy trì hệ sợi màu trắng và không phát sinh thêm bất kì giao tử nào trên bề mặt này, ở thể hệ cấy chuyển tiếp theo, cũng ghi nhận được 2/3 vị trí nấm có sự phát triển và có màu trắng. Sự bất thường này đã được mô tả trong một số nghiên cứu, tia gamma có khả năng kiểm soát sự nảy mầm của bào tử và sự phát triển của sợi nấm thông qua việc gây tổn thương DNA bởi bức xạ, dẫn đến các tế bào không hoạt động (Monk *et al.*, 1995; Smith và Pillao, 2004). Trong báo cáo của Horikiri và đồng tác giả (2024) đã ghi nhận sự khác biệt về tỉ lệ hình thành khuẩn lạc (5,5%) với tỉ lệ nảy mầm (69,7%), mặc dù bào tử vẫn có hiện tượng nảy mầm và kéo dài sợi nấm, tiếp tục xảy ra sự tiếp hợp giữa các các nấm nhưng lại đi khả năng sinh sản ở thể hệ ngay sau đó (Horikiri *et al.*, 2024). Sự phát triển của *Penicillium citrinum* bị ức chế hoàn toàn ở liều lượng trên 9 kGy. Như vậy, dải khảo sát thực nghiệm liều chiếu trên đã chứng minh sự hình thành mối tương quan giữa liều chiếu xạ gamma và sự ức chế sự phát triển của nấm mốc.

### KẾT LUẬN

Kết quả của thử nghiệm đã cho thấy, việc tiếp xúc với tia gamma liều cao (6 – 9 kGy) đã khiến *Penicillium citrinum* NON phân lập từ sản phẩm mỹ nghệ bị tổn thương, dẫn đến giảm tỉ lệ sống ở thể hệ tiếp theo. Ở liều chiếu 9 kGy, nấm mất hoàn toàn khả năng sinh trưởng ở cả hệ sợi nấm và bào tử. Mặc dù vậy, cơ chế tác động của tia gamma đến *P.citrinum* NON vẫn còn chưa được mô tả cụ thể và làm rõ nên cần được nghiên cứu và thử nghiệm chuyên sâu hơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bush RK, Portnoy JM, Saxon A, Terr AI, & Wood RA (2006). The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immun*, 117(2), 326 - 333.
- Erramli H, & El Asri J (2019). Gamma rays: applications in environmental gamma dosimetry and determination samples gamma-activities induced by neutrons. *Use of Gamma Radiation Techniques in Peaceful Applications*, 109 - 128.
- Flores SCP (1976). Gamma radiation as fungicide and its effects on paper. *Bulletin of the American Institute for Conservation*, 16(1), 15 - 44.
- Horikiri S, Harada M, Asada R, Tsuchido T, Furuta M (2024). Gamma-irradiated *Aspergillus conidia* show a growth curve with a reproductive death phase. *J Radiat Res*, 65(1), 28 - 35.
- Houbraken J, Frisvad J, and Samson RA (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44, 117 - 133.
- Jeong MA & Jeong RD (2018). Applications of ionizing radiation for the control of postharvest diseases in fresh produce: recent advances. *Plant Pathology*, 67(1), 18 - 29.
- Kim S, Jeong JO, Lee S, Park JS, Gwon HJ, Jeong SI, Hardy JG, Lim YM & Lee JY (2018). Effective gamma-ray sterilization and characterization of conductive polypyrrole biomaterials. *Sci Rep-UK*, 8(1), 1 - 8.
- Lstiburek J, Brennan T, and Yost N (2002). Mold: Causes, Health Effects and Clean-Up. *Building Sciences Corporation*: 1- 5.
- Mao S, Xu Z, Wang Q, Han X, Wang X, Chen M, & Li Y (2023). Effect of Irradiation Process on Physical and Chemical Properties and Mildew Resistance of Bamboo. *Forests*, 14(5): 1055 - 1069.
- Monk JD, Beuchat LR, & Doyle MP (1994). Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. *J Food Protec*, 58(2), 197 - 208.
- Sambrook J, Russel DW (2001). Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J, Russell DW (Eds) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edn, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 631–632.
- Smith JS and Pillai S (2004). Irradiation and food safety. *The Society for Food Science and Technology* 59(11): 48 - 55.
- Sterflinger K and Pinzari F (2012) The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environ Microbiol*, 14(3), 559 - 566.

## APPLICATION OF GAMMA RADIATION (FROM COBALT-60 SOURCE) TREATMENT OF MOLD ON VIETNAM'S CONICAL HAT MADE FROM GRASS

Hoang Thanh Phi Hung<sup>1\*</sup>, Cao Van Chung<sup>1</sup>, Nguyen Thi Ly<sup>1</sup>, Le Thi Nhat Anh<sup>2</sup>, Nguyen Duc Huy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research and Development Center for Radiation Technology

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Hue University

### SUMMARY

Handicraft products made from grass contributed an important part of culture and folk art. With an erratic climate of rain and sunshine, combined with high humidity like our country, this products made from grass are often attacked by mold. The mold not only reduced the aesthetic value of products but also affected the usefulness and health of users. This study investigated the feasibility of applying gamma radiation from a cobalt-60 source to treat mold originating from grass-based crafts. We analyzed to identify fungal strains found on handicraft products in Hue city. Cultivating this fungal strain and investigating the fungicide radiation dose based on the reference fungicide dose of about  $8 \pm 1$  kGy, and conducting a radiation dose of 9 kGy, the efficacy of treatments for reduction of molds was 100%. After 03 months of monitoring, whenever determining fungal spores concentrations in a irradiated sample, the mean recovery rate was zero with the dose of 9 kGy. Research results show that applying gamma radiation is a potential solution to preserve and protect handmade products made from grass.

**Keywords:** Gamma radiation, *Penicillium citrinum*, handicrafts, irradiation dose, preservation.

\* Author for correspondence: Tel: 0913715012; Email: hoangthanphihung@gmail.com

# ASSESSMENT OF YEAST EFFICACY IN CONTROLLING *Botrytis cinerea* YU2403, THE CAUSE OF POST-HARVEST DECAY IN STRAWBERRIES

Nguyen Thi Tam<sup>1</sup>, Nguyen Van Tu<sup>1</sup>, Le Thi Loan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Ngan<sup>1</sup>,  
Tran Kim Diep<sup>2</sup>, Nguyen Thi Ngoc Nhi<sup>3</sup>, Vo Hoai Hieu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Yersin University of Da Lat

<sup>2</sup>Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

<sup>3</sup>Thu Dau Mot University

## SUMMARY

The yeast strains isolated from pickled cabbage brine were used to study their antagonistic ability against *Botrytis cinerea* YU2403, the causative agent of strawberry rot, through co-cultivation under in-vitro conditions. Six yeast strains with over 65% antagonistic effectiveness were selected for further safety evaluation on blood agar and strawberry fruit. Three yeast strains, including DT195-2, PCT02, and SMP902, which did not cause hemolysis or spoilage, were chosen to assess further their effectiveness in controlling *B. cinerea* YU2403 on strawberries. The results showed that two yeast strains, *Kazachstania* sp. YU2401 (PCT02) and *Kazachstania* sp. YU2402 (DT195-2) have the potential to be developed into biocontrol agents to prevent post-harvest strawberry rot, providing a new approach for preserving agricultural products.

**Keywords:** Strawberries, *Botrytis cinerea*, yeast, post-harvest, *Kazachstania* sp.

## INTRODUCTION

Strawberries, delicious and nutritious yet delicate berries, are a prime target for mold infections, including *Botrytis cinerea*. Physical damage during cultivation and post-harvest handling creates opportunities for fungal invasion, leading to fruit rot. Numerous studies have highlighted the severe post-harvest damage caused by *B. cinerea* on strawberries (Abbey *et al.*, 2019; Feliziani, Romanazzi, 2016). In gardens, *B. cinerea* spores easily spread from infected to healthy fruits and can be transmitted to other gardens through wind and daily irrigation. Harvesting, transportation, and storage are critical stages where factors such as high humidity, low temperatures, and bruising can create open wounds, further promoting fungal growth.

Chemical treatments have been the preferred method for many years to control and mitigate fungal infections. However, the overuse of synthetic chemical fungicides has detrimental effects on human health and the environment and contributes to the increased resistance of many fungal strains. Therefore, seeking alternative methods using biological agents has become essential (Zhang *et al.*, 2020; Damalas, Koutroubas, 2018). In recent years, antagonistic microorganisms, including bacteria, fungi, and yeast, have shown high efficacy in preventing various post-harvest diseases in fruits (Chen *et al.*, 2018). Yeasts, in particular, offer several advantages over bacteria, such as lower nutritional requirements, the ability to colonize dry and inaccessible surfaces for extended periods, and rapid growth rates (Parafati *et al.*, 2016). Yeasts have been utilized in traditional fermentation products for thousands of years and are now widely used in the food industry. In recent decades, research on the biological control potential of yeasts has received considerable attention and is increasingly being applied.

This study aims to identify potential yeast strains for controlling *Botrytis cinerea* YU2403, which causes post-harvest rot in strawberries. The results are a crucial first step in developing effective and sustainable biological control measures, which will help protect crops, maintain strawberry quality during post-harvest storage, and promote sustainable agricultural economic development.

## MATERIAL AND METHODS

### Material

The *Botrytis cinerea* YU2403 strain (NCBI Identifier: PP952080), which causes strawberry fruit rot, is stored at the Microbiology Application Laboratory, Practice Experiment Center, Yersin University of Dalat.

The samples of fermented pickle juice were purchased in Dalat City, Lam Dong, Vietnam.

## Methods

### **Isolation and Screening of Yeast Strains with Antagonistic Ability Against *B. cinerea* YU2403 in-vitro**

1 mL of fermented pickle juice was diluted with 9 mL saline solution (0,9% NaCl, Merck). The suspension was then diluted to a concentration of  $10^{-3}$ , and 0,1 mL of the diluted solution was spread onto PDA agar medium containing antibiotics (5 mg/L chloramphenicol) and incubated at 25°C for 3 days. The resulting colonies were purified, and their morphology was recorded before being preserved in glycerol at -20 °C for further experiments.

The antagonistic ability of yeast strains against *B. cinerea* YU2403 was tested using a co-cultivation method based on the studies by Cloutier *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019. A 7 mm diameter fungal disc was placed at the center of a petri dish containing 15 mL of PDA agar medium. Yeast colonies were streaked symmetrically at a distance of 2,5 cm from the fungal disc at the center. PDA medium plates containing only the fungal disc were used as control treatments. These experiments were incubated at a temperature of 25±2°C, and results were observed and recorded after 5 days. The percentage of fungal inhibition (GI) was calculated using the following formula:

$$GI = (C - T) / (C - C_1) * 100$$

C is the diameter of *B. cinerea* YU2403 in the control treatment (mm), C<sub>1</sub> is the initial diameter of the fungal disc (7 mm), and T is the diameter of the fungus in the antagonistic treatment.

### **Safety Assessment of Potential Yeast Strains**

The yeast strains that could resist *B. cinerea* YU2403 were selected to evaluate their safety *in vitro* and on strawberries. The hemolysis test was performed by spot-inoculating the yeast strains on Columbia agar supplemented with 5% sheep blood. After 48 hours of incubation at 25±2°C, the hemolysis zone around the colonies was observed and recorded. The safety test on strawberries was conducted according to Chen's description, with minor modifications. A 30 µL suspension containing yeast spores ( $10^6$  spores/mL) was directly injected into physically wounded strawberries, which were then incubated at 25±2°C for 5 days. Observations on the strawberries, including the color around the wound and any fermentation odor, were recorded and evaluated.

### **Evaluation of the effectiveness of control *B. cinerea* YU2403 on strawberries**

Strawberries that showed no signs of disease or physical damage were sterilized using 2% NaClO, and then rinsed three times with distilled water. The strawberries were sterilized with 70% ethanol under sterile conditions, rinsed twice with distilled water to remove the alcohol, and air-dried on a sterilized towel. Before the experiment, all strawberries were wounded with a 2 mm diameter and 2 mm deep incision. A 30 µL spore suspension of *B. cinerea* YU2403 ( $10^5$  spores/mL) was injected into the wound, allowed to dry at room temperature for 30 minutes, followed by an injection of 30 µL yeast spore suspension ( $10^6$  spores/mL) and allowed to dry at room temperature for 30 minutes. Distilled water was used as a control in place of the yeast. The strawberries were stored individually at 25±2°C with 90-95% relative humidity for 5 days. The Disease Index (DI) and Control Efficacy (CE) were calculated according to Chen's description. The rot index of strawberries caused by *B. cinerea* YU2403 was calculated as follows: 0 = no lesions; 1 = a few scattered lesions covering < 2% of the fruit surface; 2 = extensive lesions covering > 2% but < 5% of the fruit surface; 3 = extensive lesions covering > 5% but < 25% of the fruit surface; and 4 = extensive lesions covering > 25% of the fruit surface.

$$DI = \left( \sum_{i=0}^4 n_i \times i \right) / \left( 4 \times \sum_{i=0}^4 n_i \right) \times 100\%$$

Where i is the disease severity (0–4) and n<sub>i</sub> is the number of strawberries with a severity of i. The DR was calculated using the following formula: CE (%) = 100 × (DI-B<sub>c</sub> - DI-test) / DI-B<sub>c</sub>. Where B<sub>c</sub> is *B. cinerea* YU2403.

### **Identification of antagonistic yeast strains against *Botrytis cinerea* YU2403**

Yeast colonies were extracted using the ABT DNA extraction kit according to the standard procedure. The total DNA was then amplified for the ITS gene using the primer pair ITS-1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'), ITS-4 (5'TCCTCCGCTTA TTGATATGC- 3'). The thermal cycling conditions for the PCR reaction were as follows: 95°C for 3 minutes, then 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute. Finally, the reaction was held at 72°C for 5 minutes, and the samples were maintained at 4°C. The PCR products were sequenced using the Sanger method at DNA SEQUENCING Co., Ltd.. The sequencing results were processed using BioEdit 7.2 software. These sequences were then blasted into the NCBI database to identify similar known sequences. Mega 7.0 software was used to construct the phylogenetic tree, with a bootstrap analysis of 1000 iterations to ensure the tree's reliability. This tree helps understand the evolutionary relationships and confirms the identification of the yeast strains.

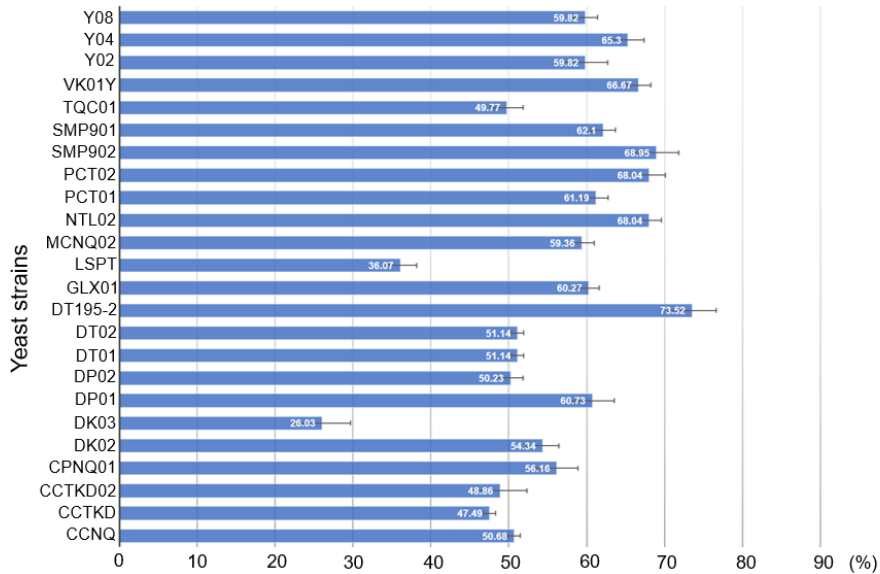
### **Data analysis**

The experiments were repeated three times to determine the mean values and standard deviations (SD). This repetition ensures the reliability and accuracy of the data.

**RESULT AND DISCUSS**

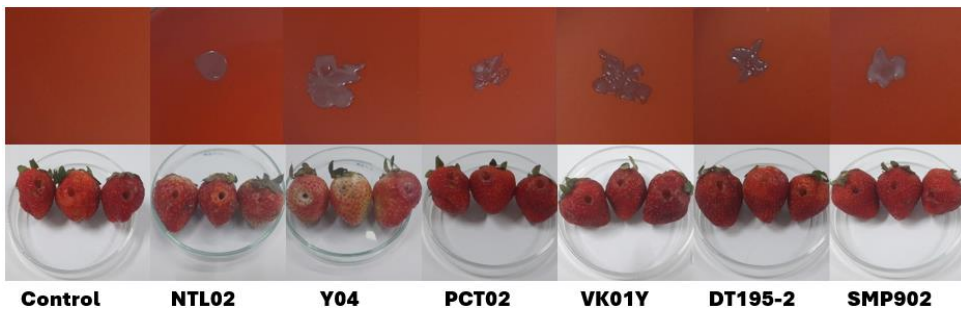
**The results of yeast isolation and screening for antagonistic activity against *B. cinerea* YU2403**

From 32 samples of pickled mustard juice, 24 yeast strains were isolated. These strains were distinguished from bacteria based on their oval cell morphology and budding capability. The 24 strains were screened for their ability to antagonize the fungus *B. cinerea* YU2403. The antagonistic results are shown in Figure 1, where most tested strains demonstrated the ability to inhibit *B. cinerea* YU2403. These results can be categorized into three levels of effectiveness: six strains exhibited strong antagonistic effects above 65% (with strain DT195-2 being the most effective), thirteen strains showed moderate antagonistic effects ranging from 50,23% to 62,1%, and five strains had low antagonistic effects below 50% (with strain DK03 being the least effective). The inhibition capability of these yeast strains against *B. cinerea* YU2403 is superior compared to the study by Chen *et al.* (2019), which isolated yeast strains with antagonistic effects on *B. cinerea* JYC2142 ranging from 18,7% to 36,5%. The yeast strains antagonize *B. cinerea* through mechanisms such as the production of cell wall-degrading enzymes, iron competition, nutrient competition, and space competition. The study by Parafati *et al.* (2016) demonstrated that certain yeast strains isolated from food products could inhibit the growth of *B. cinerea*. Therefore, the strains with strong antagonistic effects were selected for further experiments.



**Figure 1. The ability of yeast strains to control *Botrytis cinerea* YU2403**

**Safety characteristics of yeast strains**



**Figure 2. Safety test results on blood agar and strawberries**

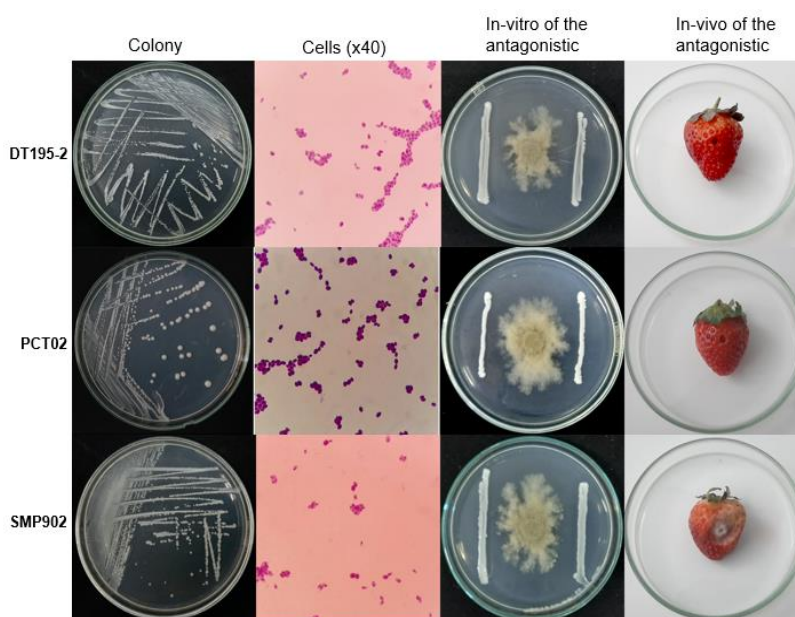
Six yeast strains VK01Y, NTL02, Y04, PCT02, SMP902, and DT195-2, which can resist *B. cinerea* under in-vitro conditions, were further used to evaluate safety efficacy on blood agar and strawberries. The safety test results on blood agar, as shown in Figure 2, indicated that all six tested yeast strains did not create a resolution zone around the colony (hemolysis  $\gamma$ ). For the safety test on strawberries, after five days of observation, strawberries tested with the strains Y04, NTL02, and VK01Y showed small lesions, with some mycelium appearing around the wounds, exuding fluid, and a slight fermentation odor. The remaining three strains, PCT02, DT195-2, and SMP902, showed no surface lesions or fruit flesh fermentation. The wound areas treated with these yeast strains were dry, not mushy, and did not exude fluid, similar to the control.

**Effectiveness of controlling *B. cinerea* YU2403 on strawberries**

**Table 1. Effectiveness of yeast in protecting strawberries from *B. cinerea* YU2403 infection**

Treatment	(%) DI	(%) CE
Control	100±0	0
DT195-2	0	100±0
SMP902	45,42±6,17	54,58±6,17
PCT02	0	100±0

After 5 days, all strawberries in the control treatment showed damage with a disease index of 100%. In contrast, the disease indices for the treatments with strains DT195-2, SMP902, and PCT02 were 0%, 45,42%, and 0%, respectively. This corresponds to Control Efficacy indices of 100%, 54,58%, and 100%, as shown in Table 1. This indicates that the two strains DT195-2 and PCT02, effectively protected strawberries against *B. cinerea* YU2403. In the control treatment, 100% of the strawberries were completely covered by fungal hyphae. In the treatment with strain SMP902, some strawberries showed hyphae around the wounds, which gradually spread. Meanwhile, when treated with DT195-2 and PCT02, strawberries showed no disease or fungal growth, as shown in Figure 3.



**Figure 3. Effectiveness of yeast strains in controlling *B.cinerea* YU2403**

The study by Ximena demonstrated that the decay rate of grapes caused by *B. cinerea* significantly decreased when treated with yeast strains. This is attributed to the yeast quickly colonizing the wound's surface, competing for nutrients and space, preventing the spores of *B. cinerea* from germinating. *W. anomalus* strains have shown the ability to reduce the growth of *B. cinerea* in in-vivo experiments (Maluleke *et al.*, 2022). The identified volatile compounds were grouped into various chemical families, such as higher alcohols, aldehydes, esters, organosulfur compounds, monoterpenes, ketones, and aromatic hydrocarbons. Notably, phenylethyl alcohol, isoamyl alcohol, n-butanol, and 2,5-dimethylpyrazine, which appear to originate from the yeast, have been demonstrated to effectively inhibit the germination of spores and the growth of hyphae of *B. cinerea*, *Aspergillus*, and *Penicillium* species.

**Molecular identification of yeast strains**

Based on the identification results from the NCBI gene bank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), the two strains DT195-2 and PCT02 are similar to *Kazachstania* sp. Additionally, the phylogenetic tree analysis results show that the strains DT195-2 and PCT02 are in the same branch as *Kazachstania* sp. B24 15, *Kazachstania* sp. B24 3, *Kazachstania* sp. B2 TP1 4, and *Kazachstania* sp. IMB BR1 (Figure 4). Therefore, the two strains DT195-2 and PCT02 are two strains of *Kazachstania* sp. YU2402 (NCBI gene bank identification code: PP952090) and *Kazachstania* sp. YU2401 (NCBI gene bank identification code: PP957694). Further in-depth studies are needed to identify the species of these two bacterial strains.

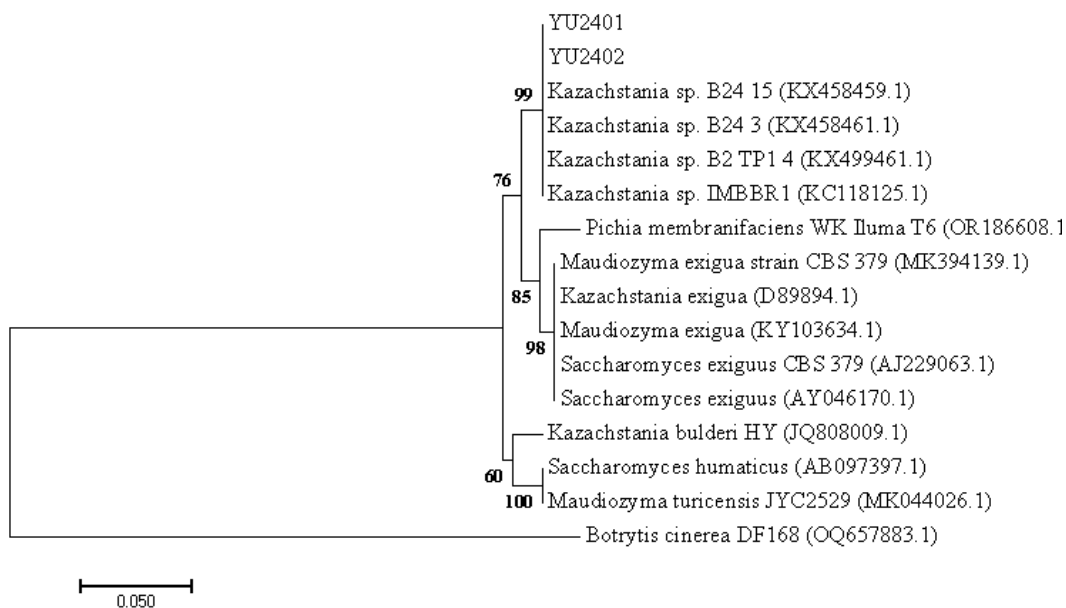


Figure 4. Phylogenetic tree of the strains *Kazachstania* sp. YU2401 and *Kazachstania* sp. YU2402

## CONCLUSION

From the samples of fermented mustard greens, 24 yeast strains were isolated. Among these, six strains (VK01Y, NTL02, Y04, YU2401, SMP902, YU2402) demonstrated significant antagonistic activity against *B. cinerea* YU2403, achieving inhibition rates of over 65%. Notably, three strains (DT195-2, SMP902, PCT02) exhibited strong antifungal properties and showed no hemolysis or rot symptoms on strawberries. This indicates their potential safety for application in post-harvest disease control. Among them, two strains, PCT02 and DT195-2, identified as *Kazachstania* sp. YU2401 and *Kazachstania* sp. YU2402 were evaluated as promising candidates for controlling *B. cinerea* YU2403-induced rot in strawberries. However, further advanced biological techniques are needed to accurately classify and identify these two yeast strains, as well as to provide deeper insights into their mechanisms of action and ensure their effectiveness and safety in practical applications.

## REFERENCES

- Abbey JA, Percival D, Abbey L, Asiedu SK, Prithviraj B, and Schilder A (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol Sci Techn*, 29(3): 207-228.
- Chen PH, Chen RY, and Chou JY (2018). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, 46: 33–46.
- Chen X, Wang Y, Gao Y, Gao T, and Zhang D (2019). Inhibitory Abilities of Bacillus Isolates and Their Culture Filtrates against the Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on Postharvest Fruit. *The plant pathology journal*, 35(5): 425–436.
- Cloutier A, Tran S, and Avis TJ (2019). Suppressive effect of compost bacteria against grey mould and Rhizopus rot on strawberry fruit. *Biocontrol Sci Techn*, 30(2): 143-159.
- Damalas CA and Koutroubas SD (2018). Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture*, 2018: 8-13.
- Feliziani E and Romanazzi G (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1): 47-63.
- Maluleke E, Jolly N, Patterton, H, and Setati, M (2022). Antifungal activity of non-conventional yeasts against *Botrytis cinerea* and non-*Botrytis* grape bunch rot fungi. *Front Microbiol*, 13.
- Parafati L, Vitale A, Polizzi G, Restuccia C, and Cirvilleri G (2016). Understanding the mechanism of biological control of postharvest phytopathogenic moulds promoted by food isolated yeasts. *Acta Hort*, 1144: 93-100.
- Sharma A, Kashyap PL, Srivastava AK., Bansal YK, and Kaushik R (2019). Isolation and characterization of halotolerant bacilli from chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere for plant growth promotion and biocontrol traits. *Eur J Plant Pathol*, 153: 787-800.
- Zhang X, Li B, Zhang Z, Chen Y, and Tian S (2020). Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. *Journal of fungi*, 6(3): 158.

## ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA NĂM MEN TRONG KIỂM SOÁT *Botrytis cinerea* YU2403, NGUYÊN NHÂN GÂY THỐI QUẢ SAU THU HOẠCH Ở DÂU TÂY

Nguyễn Thị Tâm<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Tự<sup>1</sup>, Lê Thị Loan<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Ngân<sup>1</sup>,  
Trần Kim Diệp<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Nhi<sup>3</sup>, Võ Hoài Hiếu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Yersin Đà Lạt

<sup>2</sup>Viện Nguyên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Thủ Dầu Một

### TÓM TẮT

Các chủng nấm men được phân lập từ dịch dưa cải muối được sử dụng để nghiên cứu khả năng đối kháng nấm *Botrytis cinerea* YU2403, tác nhân gây bệnh thối quả dâu tây, thông qua phương pháp đồng nuôi cây trong điều kiện *in-vitro*. Sáu chủng nấm men có hiệu quả đối kháng trên 65% đã được chọn để tiếp tục đánh giá an toàn trên môi trường thạch máu và thử nghiệm an toàn trên quả dâu tây. Ba chủng nấm men gồm DT195-2, PCT02 và SMP902 không gây tan máu và không gây ra bất kỳ các hiện tượng thối hỏng đã được lựa chọn để tiếp tục đánh giá hiệu quả kiểm soát *B. cinerea* YU2403 trên quả dâu tây. Kết quả cho thấy hai chủng nấm men *Kazachstania* sp. YU2401 (PCT02) và *Kazachstania* sp. YU2402 (DT195-2) có khả năng ứng dụng phát triển thành chế phẩm sinh học ngăn ngừa thối quả dâu tây sau thu hoạch do nấm *B. cinerea* gây ra, mở ra triển vọng mới cho việc bảo quản nông sản.

*Từ khóa:* Dâu tây, *Botrytis cinerea*, nấm men, sau thu hoạch, *Kazachstania* sp.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0372764001; Email: hieuvh@yersin.edu.vn



## ANTI-BACTERIAL ABILITY OF ROSEMARY ESSENTIAL OIL (*ROSMARINUS OFFICINALIS*)

Tran Thi Minh, Tran Phi Hoang

Faculty of Applied Technology, Van Lang University, 69/68 Dang Thuy Tram street, Binh Thanh district, Ho Chi Minh City, Vietnam

### SUMMARY

Rosemary herb has been widely used in medicine and traditional cosmetics. In addition, it is also used as a flavoring agent in foods. The results of this study show that by steam distillation, the yield of rosemary essential oil is 2.343%. At the same time, the active ingredients in essential oils were identified quite high such as  $\alpha$ -Pinene (29.84%), 1,8-cineol (22.456%) and Camphor (2.965%). The anti-bacterial ability of rosemary essential oil was determined with the zone of inhibition for *E. coli* strain of 13.4 mm and *S. aureus* of 9.6 mm. Simultaneously, the MIC and MBC values of both *E. coli* and *S. aureus* strains were 0.032 mg/ml and 0.064 mg/ml, respectively.

**Keywords:** Anti-bacterial, Component, Essential oil, MIC value, MBC value, Rosemary herb

### INTRODUCTION

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) native to the Mediterranean is widely used for ornamental, food and medicinal purposes. In Vietnam, Rosemary is a new ornamental plant and there are not many studies on its nutrition (Pham Thi Minh Tam, Nguyen Thi Bich Phuong, 2018).

The main chemical composition of rosemary essential oil with antibacterial ability has been determined by many previous studies such as the results of Boutekedjiret *et al.*, (2003), analysis by gas chromatography-mass spectrometry method (GC-MS), the composition of substances include  $\alpha$ -Pinene (5.2%), Camphene (3.0%), 1,8-1.8-cineol (52.4%), Linalol (1.1%), Camphor (12.6%); Research by Hussain Al *et al.* (2010) has identified the main components of the essential oil as 1,8-cineol (38.5%), camphor (17.1%),  $\alpha$ -pinene (12.3%), limonene (6.23%), camphene (6.00%) and linalool (5.70%); Research by Tavassoli *et al.*, (2011) analyzed the composition of Rosemary essential oil including 1,8-1.8-cineole (23.14%), camphor (12.35%),  $\alpha$ -pinene (9.87%),  $\beta$ -pinene (6.10%), borneol (5.61%), camphene (5.58%) and  $\alpha$ -terpineol (4.30%).

At the same time, Santoyo *et al.*, (2004) tested the antibacterial activity of rosemary essential oil on 6 different microbial species including 2 gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633), 2 species of gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 11775), yeast (*Candida albicans* ATCC 60193), and mold (*Aspergillus niger* ATCC 16404). Essential oils against all bacteria tested with inhibition rings and MBC values between 17 - 33 mm and 2.25 - 0.25 mg/ml, respectively. *Staphylococcus aureus* is the most sensitive strain, having the zone of inhibition (27 - 33 mm) and the lowest MBC value (0.75 - 0.25 mg/ml).

In 2021, Hezil *et al.*, studied Rosemary essential oil from Hammamet region (Tébessa - Algeria), obtained essential oil content ranging from  $1.60 \pm 0.004$  ml/100g to  $2.29 \pm 0.041$  ml/100g and evaluated antibacterial activity of essential oils. The zone of inhibition for *S. aureus* was 17.1mm (pure essential oil), 10.1mm (dilution  $\frac{1}{2}$ ), 8.2mm (dilution  $\frac{1}{4}$ ). As for *E. coli*, the zone of inhibition was 17.2mm (pure), 8.1mm (dilution  $\frac{1}{2}$ ), 7.3mm (dilution  $\frac{1}{4}$ ).

From the above studies, we evaluated the antibacterial ability of the essential oil extracted from *Rosmarinus officinalis* grown in Vietnam.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

Rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*) are supplied from Viet Phu Company, No. 413/23 Nguyen Tu Luc Street, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam. Harvest time November, 2022. Age of the plant is 2 years old.

#### Methods

Samples were washed to remove adhering dust, allowed to dry naturally at room temperature, and then cut into 2 cm pieces. Extraction of essential oils by steam distillation method, the raw materials are placed in a 2000ml spherical glass bottle with 1000ml of distilled water, enough water to cover the raw materials, assemble the complete condenser system, distillation time is about 3 hours at 80°C. Then collect the essential oil layer floating on the liquid surface. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to determine the chemical composition of rosemary essential oil, Mass spectrometry probe has high sensitivity of about  $10^{-6}$  -  $10^{-9}$  g (Mahawer *et al.*, 2022).

*Evaluation of the antibacterial ability of rosemary essential oil:* Determination of antibacterial ability of rosemary essential oil by Disk diffusion test, according to the guidelines M44 – A and M02 – A11 of CLSI (Leber, 2016), based on the zone of inhibition. The test was performed for two strains of bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922, which were repeated 5 times. Determine The minimum inhibitory concentration for bacteria (MIC) of Rosemary essential oil by dilution in solid medium (Leber, 2016), which were repeated 5 times. The minimum bactericidal concentration (MBC) of Rosemary essential oil is determined based on MIC-performed agar plates, with different concentrations such as equal to, twice and 4 times the MIC concentration.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Extraction efficiency of Rosemary essential oil

By steam distillation, the yield of essential oil was 2.343% (table 1), much higher than the study of Mathlouthi *et al.*, (2012) with the yield of 0.93% and 0.35%, respectively. While compared with the study of Ojeda-Sana *et al.*, (2013), the efficiency is lower but not significant (2.58%).

**Table 1. Extraction efficiency of Rosemary essential oil**

Initial sample amount (g)	Amount of essential oil obtained (g)	Efficiency (%)
101.27 ± 0.041	2.372 ± 0.001	2.343 ± 0.008

### Active ingredients in rosemary essential oil

By GC/MS method, 26 compounds in Rosemary essential oil have been identified (table 2), including substances such as  $\alpha$ -Pinene (29.084%), Eucalyptol (1.8-cineol) (22.456%) and (+)-2-Bornaone (Camphor) (2.965%) and some others.

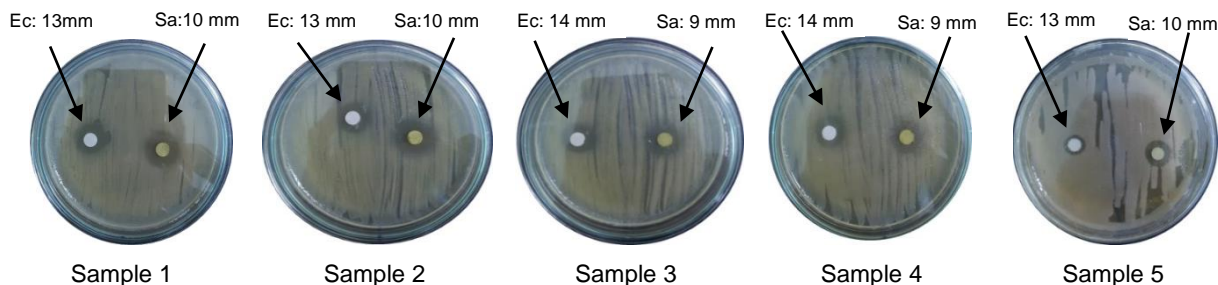
**Table 2. Composition of active ingredients in essential oils**

Serial	Rt	Substance name	Content (%)	Mass	Mass spectral compatibility
1	5.091	1R- $\alpha$ -Pinene	29.084	136	939
2	5.339	Camphene	3.108	136	939
3	5.415	2,4(10)-Thujadiene	0.575	134	949
4	5.820	$\beta$ -Pinene	1.923	136	922
5	5.963	$\beta$ -Myrcene	1.026	136	945
6	6.673	o-Cymene	0.761	134	957
7	6.774	D-Limonene	2.499	136	933
8	6.852	Eucalyptol (cineol)	22.456	154	950
9	7.374	$\gamma$ -Terpinene	0.802	136	932
10	8.035	$\alpha$ -Terpinolen	0.569	136	926
11	8.211	Linalool	2.842	154	936
12	8.889	Chrysanthenone	0.475	150	914
13	9.395	(+)-2-Bornaone	2.965	152	934
14	9.820	Pinocarvone	0.298	150	831
15	9.897	Camphol	4.674	154	935
16	10.114	Isocamphopinone	0.478	152	884
17	10.151	Terpinen-4-ol	1.241	154	914
18	10.466	Terpineol	2.491	154	935
19	10.630	Myrtenol	0.470	152	893
20	10.757	Isobomeol	0.557	154	788
21	10.986	(-)-Verbenone	11.828	150	951
22	11.958	Geraniol	4.349	154	935

23	12.848	Bomyl acetate	3.102	196	935
24	15.174	2,6-Dimethyl-2,6-octadien-8-yl acetate	0.440	196	911
25	15.717	Methyleugenol	0.307	178	918
26	16.290	Caryophyllene	0.682	204	915

**Antibacterial properties of rosemary essential oil**

The results showed that rosemary essential oil has the ability to create antibacterial rings for both *E. coli* and *S. aureus* strains when cultured (Figure 1).



**Figure 1. Culture results (Ec: Escherichia coli ATCC 25922 and Sa: Staphylococcus aureus ATCC29213)**

The average diameter of the antibacterial ring of essential oils for *E. coli* is 13.4 mm. This result is 14.3 mm higher than the study result of Mekonnen *et al.*, (2016) at 6 mm. At the same time, the research results on *S. aureus* also had an average antibacterial ring diameter of 9.6 mm, much higher than that of Mathlouthi *et al.*, (2012).

**Table 3. Antibacterial ring diameter of rosemary essential oil**

The zone of inhibition (mm)	
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
13.4 ± 0.054	9.6 ± 0.044

The research results showed that The minimum inhibitory concentration (MIC) of Rosemary essential oil for *E. coli* and *S. aureus* was also negative for in plates with MIC concentrations from 0.032 - 0.256 mg/ml and positive for plates with MIC concentrations of 0.016 mg/ml (table 4). Research results show that the MIC values of *E. coli* and *S. aureus* are lower than some previous studies. However, when compared with the results of Mekonnen *et al.*, (2016), the results were opposite with the MIC value of *S. aureus* at 0.02 mg/ml.

**Table 4. MIC value**

MIC (mg/ml)	Positive rate (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0.256	-	-
0.128	-	-
0.064	-	-
0.032	-	-
0.016	100	100

The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of Rosemary essential oil for *E. coli* and *S. aureus* were both 0,064 mg/ml.

**Table 5. MBC value**

MBC (mg/ml)	Positive rate (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0.128	-	-
0.064	-	-
0.032	100	100
0.016	100	100

From the above results, rosemary essential oil has a high bactericidal ability with MBC/MIC value < 4. This result is similar to the study results of Gatsing *et al.*, (2009).

## CONCLUSION

The extraction efficiency of rosemary essential oil was 2.343%. The identification of active ingredients in essential oils such as  $\alpha$ -Pinene (29.084%), 1,8-cineol (22.456%) and Camphor (2.965%) is quite high. The antibacterial ability of essential oils was evaluated on two strains of *E. coli* and *S. aureus* based on the antibacterial ring diameter of 13.4 mm and 9.6 mm, respectively. At the same time, the MIC and MBC values of rosemary essential oil were also determined on both *E. coli* and *S. aureus* strains with the same results of 0.032 mg/ml and 0.064 mg/ml.

## REFERENCES

- Boutekedjiret C, Bentahar F, Belabbes R and Bessie JMB (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour Fragr J* 2003; 18: 481–484.
- Hezil D, Benseghir H, Benamrouche S, Zaidi S, Zineddine R, Bessas A, Msela A (2021). Chemical composition and antibacterial activity of rosmarinus officinalis essential oil from algeria. *Agricultura no. 3 - 4* (119-120)/2021.
- Gatsing D, Tchakoute V, Ngamga D, Kuate JR, Tamokou JDD, Nji-Nkah BF, Tchouanguép FM, Fodouop C (2009). In Vitro Antibacterial Activity of Crinum Purpurascens Herb. Leaf Extract Against the Salmonella Species Causing Typhoid Fever and Its Toxicological Evaluation. *Iranian Journal of Medical Sciences*,—Volume & Issue: Volume 34, Issue 2, June 2009 (37), pp. 126-136.
- Leber (2016). Clinical microbiology procedures handbook. *ASM Press Washington, DC, USA*, pp. 2792.
- Mathlouthi N, Bouzaienne T, Oueslati I, Recoquillay F, Hamdi M, Urdaci M, Bergaoui R (2012). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci*, vol 90(3), 813–823.
- Mekonnen A, Yitayew B, Tesema A and Taddese S (2016). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thymus schimperii, Matricaria chamomilla, Eucalyptus globulus, and Rosmarinus officinalis. *Int J Microbiol*, vol 2016.
- Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, vol 31(10), 189–195.
- Santoyo A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira G (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*, 35.4 (2004), 275–80.
- Pham Thi Minh Tam, Nguyen Thi Bich Phuong (2018). Effects of growing substrate and nitrogen fertilizer concentration on growth and development of potted rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Science Journal of Can Tho University*. Vol 54, 3B (2018): 102-108.
- Mahawer SK, Kakaroti H, Arya S, Kumar R and Prakash O (2022). Extraction Methods and Biological Application of Essential. *IntechOpen*, Chapter ISBN 978-1-80355-755-7.
- Tavassoli SK, Mousavi M, Emam-Djomeh Z, Razavi SH (2011). Chemical composition and evaluation of antimicrobial properties of Rosmarinus officinalis L. essential oil. *Afr J Biotechnol* Vol. 10(63), pp. 13895-13899.

## KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA TINH DẦU HƯƠNG THẢO (*ROSMARINUS OFFICINALIS*)

Tran Thi Minh<sup>\*</sup>, Tran Phi Hoang

Khoa Công nghệ Ứng dụng, Trường Đại học Văn Lang, 69/68 Đặng Thùy Trâm, Quận Bình Thạnh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

### TÓM TẮT

Hương thảo đã được sử dụng rộng rãi trong y học và mỹ phẩm truyền thống. Ngoài ra, nó còn được sử dụng làm chất tạo hương vị trong thực phẩm. Kết quả nghiên cứu này cho thấy bằng phương pháp chưng cất hơi nước, hiệu suất thu được tinh dầu hương thảo là 2,343%. Đồng thời, các hoạt chất trong tinh dầu được xác định khá cao như  $\alpha$ -Pinene (29,084%), 1,8-cineol (22,456%) và Long não (2,965%). Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu hương thảo được xác định với đường kính vòng kháng khuẩn đối với *E. coli* là 13,4 mm và *S.aureus* là 9,6 mm. Đồng thời, giá trị MIC và MBC của cả hai chủng *E. coli* và *S. aureus* lần lượt là 0,032 mg/ml và 0,064 mg/ml.

*Từ khóa:* Kháng khuẩn, thành phần hóa học, tinh dầu, giá trị MIC, giá trị MBC, hương thảo.

<sup>\*</sup> Author for correspondence: Tel: 0984440181; Email: minh.tt@vlu.edu.vn.

## ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA BÀO TỬ VI KHUẨN *SHOUCHELLA CLAUSII* (*BACILLUS CLAUSII*) BCLA

Nguyễn Hoàng Minh Đức, Nguyễn Văn Năm, Đào Thị Lương

Công ty Cổ phần Công nghệ Hóa sinh Việt Nam

### TÓM TẮT

Vi khuẩn hình thành bào tử thuộc chi *Bacillus* đã chứng tỏ tiềm năng trở thành probiotic dùng cho con người. *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*) đã được công nhận là tác nhân hiệu quả và an toàn để ngăn ngừa và điều trị bệnh tiêu chảy ở trẻ em và người lớn, với đặc tính điều hòa miễn dịch rõ rệt trong một số nghiên cứu lâm sàng và *in vitro*. Trong nghiên cứu này, các đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* của chủng vi khuẩn BCLA phân lập từ đất được đánh giá. Chủng *Shouchella clausii* BCLA được định danh dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA, là loài được công nhận là an toàn (GRAS). Chủng này mang các đặc tính probiotic như: chịu muối mật (0,3%), tồn tại tốt trong điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và ruột mô phỏng; có khả năng bám dính cao. Nó đáp ứng các tiêu chí an toàn, bao gồm hoạt tính tan máu, kháng với nhiều loại kháng sinh (amoxicillin, cloramphenicol, erythromycin, gentamycin và metronidazole) và kháng với vi khuẩn gây bệnh ở người (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* và *Staphylococcus aureus*). Ngoài ra, chủng BCLA còn có khả năng sinh các enzyme có lợi phân giải nhiều loại cơ chất (carboxymethyl cellulose, casein, chitin, pectin, tinh bột và xylan) và bào tử của nó chịu được nhiệt trong quá trình chế biến. Kết hợp những đặc tính có lợi này, đã cung cấp bằng chứng thuyết phục cho thấy *Shouchella clausii* BCLA là một probiotic tiềm năng đầy hứa hẹn.

**Từ khóa:** Bào tử, enzyme, *in vitro*, probiotic, *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*).

### MỞ ĐẦU

Việc sử dụng *Bacillus* và các vi khuẩn liên quan làm probiotic ở người đã được thừa nhận trong những năm qua. Trục khuẩn mang bào tử có một số lợi thế tiềm năng so với các dạng không tạo bào tử khác như *Lactobacillus* spp., vì bào tử có khả năng chịu nhiệt ổn định, có khả năng tồn tại ở độ pH thấp của hàng rào dạ dày và các sản phẩm tạo ra, chúng có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng mà không có bất kỳ ảnh hưởng có hại nào đến khả năng tồn tại (Srinivas *et al.*, 2020).

*Shouchella clausii* là vi khuẩn hình que, di động, Gram dương, hiếu khí, hình thành bào tử, ưa kiềm tùy nghi. Các chủng *S. clausii* có mặt khắp nơi trong tự nhiên và đã được phân lập từ đất, nước biển, sữa... (Khokhlova *et al.*, 2023). *S. clausii* là một trong những probiotic của con người, có khả năng tồn tại trong quá trình vận chuyển qua đường tiêu hóa nhờ khả năng chịu nhiệt, acid và muối mật; tăng cường chức năng hàng rào ruột; và xâm chiếm đường ruột ngay cả khi có kháng sinh (Ahire *et al.*, 2021). Nó có khả năng kháng kháng sinh phổ rộng không thể chuyển gen sang loài khác và tổng hợp vitamin B2 (Ghelardi *et al.*, 2022). Các nghiên cứu tiền lâm sàng đã xác định được một số phương thức tác dụng của *S. clausii*, bao gồm tăng cường chức năng rào cản và cân bằng nội môi trong ruột, và ngược lại, hoạt động kháng khuẩn, ức chế độc tố đường ruột và hoạt động điều hòa miễn dịch (Ghelardi *et al.*, 2022). Các nghiên cứu lâm sàng cho thấy *S. clausii* có hiệu quả trong điều trị tiêu chảy, nhiễm trùng đường hô hấp tái phát và viêm dạ dày ruột cấp tính (Ahire *et al.*, 2021).

Ngoài các đặc tính sinh lý có liên quan trực tiếp đến việc sử dụng chúng làm probiotic, các chủng *S. clausii* còn thể hiện một loạt các đặc tính khác cho phép chúng được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp khác nhau: sử dụng trong sản xuất laccase công nghiệp; sản xuất terpene một loại hydrocarbon hữu ích như thuốc trừ sâu tự nhiên và có nhiều lợi ích cho sức khỏe; tạo ra  $\beta$ -1,3-glycanase ổn định với kiềm ngoại bào để khử polymer hóa laminarin thành  $\beta$ -1,3-glycan; xúc tác cho quá trình oxy hóa meso-butane-2,3-diol thành acetoin là chất phụ gia hương vị quan trọng đối với ngành công nghiệp thực phẩm; tạo ra CGTase trong quá trình chuyển đổi tinh bột thành cyclodextrin được sử dụng trong ngành dược phẩm (Ghelardi *et al.*, 2022).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện các nghiên cứu trong mô hình *in vitro*, đánh giá đặc tính probiotic tiềm năng, khả năng an toàn, khả năng tạo enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử chủng vi khuẩn *Shouchella clausii* BCLA phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn BCLA được phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình và được lưu giữ tại Công ty CP Công nghệ Hóa sinh Việt Nam.

Vi sinh vật kiểm định: *Bacillus cereus* VTCC10613, *Escherichia coli* VTCC 10482, *Micrococcus luteus* VTCC 10644, *Salmonella enterica* VTCC 10480, *Staphylococcus aureus* VTCC 10658, nhận từ Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

### Phương pháp

#### Phân loại

Xác định trình tự gen 16S rRNA: Tách chiết, khuếch đại và xác định trình tự gen 16S rRNA theo phương pháp của Gabor và đồng tác giả (2003). So sánh mức độ tương đồng cao nhất về trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố trên Genbank bằng công cụ Blast. Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn được gửi lên trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI).

#### Đánh giá đặc tính probiotic của bào tử được thực hiện theo mô tả của Ahire và đồng tác giả (2021)

Bào tử chủng BCLA được chuẩn bị trong môi trường dịch LB (HiMedia, Ấn Độ) sau nuôi 4 ngày ở nhiệt độ 37°C và được xử lý nhiệt ở 80°C trong 20 phút. Khả năng chịu muối mật của huyền phù bào tử chủng BCLA dựa vào sinh trưởng trên đĩa thạch môi trường LB chứa oxgall 0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1% (w/v); Sự tồn tại của bào tử trong điều kiện mô phỏng của dịch dạ dày tổng hợp [g/L: pepsin ( $\geq 3000$  NFU/mg)-0,0133; lysozyme ( $\geq 40.000$  U/mg)-0,1; oxgall-0,05; proteose peptone-8,3; glucose-3,5; KCl-0,37; NaCl-2,05;  $\text{CaCl}_2$ -0,11;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0,6; pH 2,5] và dịch ruột tổng hợp [pancreatin-1 mg/mL (amylase-100 U/mg; lipase-8 U/mg; protease-100 U/mg) được hòa trong NaCl 0,85% (w/v) bổ sung 0,3% oxgall (w/v); pH 8,0]; Khả năng bám dính của bào tử chủng BCLA được thử nghiệm trên các dung môi xylene, cloroform và ethyl acetate.

#### Đánh giá an toàn

Khả năng làm tan máu được kiểm tra bằng cách cấy ria chủng BCLA lên bề mặt đĩa thạch máu cừu, ủ ở 40°C trong 48 giờ (Kharwar *et al.*, 2022). Khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định được thực hiện theo phương pháp thời thạch trên 5 loại vi sinh vật kiểm định (Patel *et al.*, 2009). Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh được tiến hành bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch LB với các kháng sinh của HiMedia theo mô tả của Kharwar và đồng tác giả (2022), bao gồm ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ), amoxicillin (10  $\mu\text{g}$ ), chloramphenicol (30  $\mu\text{g}$ ), erythromycin (15  $\mu\text{g}$ ), gentamycin (10  $\mu\text{g}$ ), kanamycin (30  $\mu\text{g}$ ), metronidazole (5  $\mu\text{g}$ ), neomycin (30  $\mu\text{g}$ ), rifampicin (5  $\mu\text{g}$ ), penicillin G (10  $\mu\text{g}$ ), streptomycin (10  $\mu\text{g}$ ) và tetracycline (30  $\mu\text{g}$ ).

#### Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử

Khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, chitinase, cellulase, pectinase, protease và xylanase) được xác định bằng phương pháp thời thạch chứa 0,1% cơ chất (tinh bột, chitin, carboxymethyl cellulose, pectin, casein và xylan) theo mô tả của Eldy và đồng tác giả (2021). Khả năng chịu nhiệt của bào tử trong quá trình thanh trùng được đánh giá ở 45°C, 75°C và 90°C trong nồi cách thủy 3 phút (Khoklova *et al.*, 2023).

Các kết quả là trung bình cộng của 3 lần thí nghiệm.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân loại chủng vi khuẩn BCLA

Chủng vi khuẩn BCLA phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình, được phân loại dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA. Phân tích Blast với các trình tự đã công bố trên Genbank tại NCBI cho thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng BCLA tương đồng cao nhất (99,54 %) và có quan hệ họ hàng gần nhất với chủng chuẩn *Shouchella clausii* DSM 8716. Do đó, chủng BCLA được định danh là *Shouchella clausii*. Đoạn trình tự 1.092 bp gen 16S rRNA của *Shouchella clausii* BCLA đã được lưu giữ trên Genbank với mã số PP776597 tại NCBI. Đây là loài an toàn (GRAS) và sản phẩm của loài này được liệt kê vào danh mục các chất an toàn được dùng trong thực phẩm do Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan quản lý an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA) cho phép sử dụng.

*Bacillus clausii* được Nielsen và đồng tác giả đặt tên vào năm 1995 (tên của nhà vi khuẩn học người Đức Dieter Claus). Sau đó Patel và Gupta, (2020) phân loại các loài thuộc chi *Bacillus* thành các chi mới dựa trên các nghiên cứu phát sinh gen, *Bacillus clausii* được chuyển sang chi *Alkalihalobacillus*. Năm 2021, Joshi và đồng tác giả phân loại lại chi *Alkalihalobacillus* thành bảy chi mới dựa trên phân tích phát sinh gen, chỉ số bộ gen và đặc điểm kiểu hình, đưa *Alkalihalobacillus clausii* về chi *Shouchella* và loài chuẩn là *Shouchella clausii* (Joshi *et al.*, 2021).

Các bào tử *Bacillus clausii* được biết là tồn tại trong môi trường pH dạ dày, xâm chiếm niêm mạc đường ruột và phát triển thành dạng sinh dưỡng. Hơn nữa, vi khuẩn này có khả năng kháng hầu hết các loại kháng sinh do có các gen kháng kháng sinh, do đó nó dễ dàng xâm chiếm đường tiêu hóa ngay cả khi có kháng sinh. Ngoài ra, vi khuẩn này cũng có khả năng kháng lại một số chất chống nhiễm trùng. Khả năng xâm chiếm đường tiêu hóa dễ dàng và đặc tính kháng khuẩn của chủng *Bacillus clausii* làm cho nó trở thành một lựa chọn probiotic thích hợp (Kharwar *et al.*, 2022).

### Đặc tính probiotic của chủng BCLA

Có một số yếu tố góp phần vào sự thành công của probiotic, chẳng hạn như tính ổn định ở các quy trình sản xuất công nghiệp khác nhau và khả năng chịu đựng stress đường tiêu hóa. Việc sử dụng bào tử probiotic có lợi hơn so với các tế bào sinh dưỡng vì cấu tạo nội tại độc đáo của bào tử (acid dipicolinic, protein, lipid và carbohydrate) và khả năng thẩm cực thấp mang lại khả năng chịu đựng cao đối với acid dạ dày, muối mật và các tình trạng đường ruột (Ahire *et al.*, 2021).

Acid mật là thành phần chính của mật, hoạt động như một chất nhũ hóa giúp tiêu hóa lipid và các vitamin tan trong lipid ở ruột. Ở nồng độ cao hơn, acid mật gây độc cho tế bào vi khuẩn bằng cách gây tổn thương màng tế bào, biến tính protein và tổn thương oxy hóa DNA. Vì vậy, việc nghiên cứu vi khuẩn probiotic có khả năng tồn tại trong acid mật là rất quan trọng để dự đoán sự tồn tại của chúng trong ruột. Trong nghiên cứu này, bào tử chủng *S. clausii* BCLA sinh trưởng tốt ở nồng độ muối mật ở 0,3%. Bào tử chủng *Bacillus clausii* UBBC07 có khả năng sống sót cao ở muối mật 0,1 -1,0% và ở nồng độ muối mật 2,0% còn thúc đẩy tăng trưởng (Ahire *et al.*, 2021). Các nghiên cứu về khả năng chịu muối mật hầu hết được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch mật oxgal 0,3% vì nó giống với dịch mật của con người và 0,3% còn được coi là nồng độ quan trọng để đánh giá một probiotic chịu muối mật. Hơn nữa, khả năng chịu đựng mật là một đặc điểm đặc trưng của từng chủng (Ahire *et al.*, 2021).

Trong dịch dạ dày tổng hợp, số lượng bào tử này mầm *S. clausii* BCLA giảm không nhiều từ  $52,3 \times 10^8$  CFU/mL còn  $13,40 \times 10^8$  CFU/mL sau 3 giờ. Số lượng tăng lên  $78,5 \times 10^8$  CFU/mL sau 6 giờ của quá trình ủ trong dịch ruột tổng hợp (Bảng 1). Bào tử *Bacillus clausii* UBBC07 có tỷ lệ sống sót là 95,75% ở điều kiện dịch dạ dày tổng hợp (pH 2,5); số lượng tăng 110,66 % trong dịch ruột tổng hợp (Ahire *et al.*, 2021). Tương tự, số lượng bào tử *B. clausii* CSI08 không giảm sau khi tiếp xúc với các dịch dạ dày và ruột non mô phỏng (Khokhlova *et al.*, 2023). Gần đây, nghiên cứu in vitro về sự nảy mầm của bào tử *B. clausii* trong Mô phỏng Hệ sinh thái Vi khuẩn Đường ruột Con người (SHIME) đã chỉ ra sự sống sót của các bào tử và đi kèm tế bào sinh dưỡng trong mô phỏng dạ dày được nuôi bằng SHIME. Những kết quả chứng minh in vitro và vivo cho thấy bào tử *B. clausii* nảy mầm và nhân lên trong điều kiện đường ruột của con người (Ahire *et al.*, 2021). Những dữ liệu trên cho thấy khả năng tiềm tàng của bào tử *S. clausii* BCLA có thể tồn tại một cách hiệu quả khi di chuyển qua đường tiêu hóa.

**Bảng 1. Một số đặc tính probiotic của *S. clausii* BCLA**

Chịu muối mật	Sinh trưởng trên muối mật (%)				
	0	0,1	0,3	0,5	1,0
	+	+	+	-	-
Khả năng tồn tại trong điều kiện đường tiêu hóa nhân tạo	Số lượng tế bào sống sót ( $\times 10^8$ CFU/mL)				
	0 giờ	3 giờ (Dịch dạ dày tổng hợp)		6 giờ (Dịch ruột tổng hợp)	
	52,3	13,4		78,5	
Tính kỵ nước	Tỷ lệ kỵ nước (%)				
	Cloroform	Ethyl acetate		Xylene	
	95,86	90,35		51,24	

Ghi chú: "+": Sinh trưởng; "-": Không sinh trưởng.

Khả năng bám dính của probiotic là một đặc tính quan trọng giúp vi khuẩn xâm nhập thành công vào ruột. Trong nghiên cứu này, đánh giá khả năng bám dính của *S. clausii* BCLA bằng cách sử dụng khả năng bám dính với dung môi. Độ bám dính với xylene là dấu hiệu cho thấy tính chất bề mặt kỵ nước. Độ bám dính của bào tử với chloroform và ethyl acetate cho thấy đặc tính kỵ nước và nhận điện tử của của vi khuẩn. Độ bám dính của vi khuẩn cũng có thể xác định khả năng xâm chiếm của vi sinh vật trong đường tiêu hóa, điều này giúp ngăn cản sự đào thải chúng ngay lập tức bởi nhu động ruột và mang lại lợi thế cạnh tranh trong hệ sinh thái này. Thông qua khả năng bám dính và định cư trên các mô, vi sinh vật probiotic có thể ngăn chặn mầm bệnh bằng tương tác hoặc bao vây đặc hiệu trên các thụ thể tế bào (Patel *et al.*, 2009). Chủng *S. clausii* BCLA có độ bám dính cao hơn với chloroform (95,86%) và ethyl acetate (90,35%) so với xylene (51,24%). Tương tự, *Bacillus clausii* UBBC07 có độ


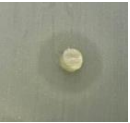

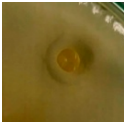

bám dính 98,33% với chloroform; 94,66% với ethyl acetate và 65,66% với xylene (Ahire *et al.*, 2021). Những kết quả này cho thấy bào tử chủng *S. clausii* BCLA có tính kỵ nước cao và có khả năng bám vào lớp biểu mô ruột.

Tóm lại, bào tử *S. clausii* BCLA thể hiện khả năng sống sót tốt, độ bám dính cao và nảy mầm trong điều kiện mô phỏng đường ruột của con người đảm bảo cung cấp lượng probiotic được khuyến nghị vào ruột.

**Đánh giá an toàn**

Kết quả nuôi bào tử *S. clausii* BCLA trên đĩa thạch máu cừu ở bảng 2 cho thấy không có vòng sáng ở các vùng máu xung quanh khuẩn lạc, được coi là tan máu gamma (không có khả năng làm tan máu). Trong xét nghiệm hoạt tính tan máu của Kharwar và đồng nghiệp (2022) trên 7 sản phẩm probiotic bán trên thị trường ( $\beta$ -LOCK<sup>®</sup>, BACIPRO<sup>®</sup>, ENTEROGERMINA<sup>®</sup>, PROALANA-B<sup>®</sup>, BENEGUT<sup>®</sup>, PROCILLUS<sup>®</sup> và TUFPRO<sup>®</sup>), sáu sản phẩm cho hoạt tính tan máu gamma, ngoại trừ  $\beta$ -LOCK<sup>®</sup> có dấu hiệu tan máu  $\beta$ . Điều này đảm bảo bản chất không độc lực của chủng *S. clausii* BCLA.

**Bảng 2. Đánh giá an toàn**

Hoạt tính tan máu	$\alpha$				$\beta$				$\gamma$			
	-				-				+			
Khả năng chịu kháng sinh	Vòng kháng chất kháng sinh (mm)											
	AMP	AMO	CLO	ERY	GEN	KAN	MET	NEO	RIF	PEN	STR	TET
	20	0	0	0	0	19	0	17	31	19	20	18
Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định	Vòng kháng vi sinh vật kiểm định (mm)											
	Bac			Esc			Mic		Sal		Sta	
	11			20			25		14		10	
												

Ghi chú: “+”: Dương tính; “-”: Âm tính; Bac-Bacillus cereus VTCC10613, Esc-Escherichia coli VTCC 10482, Mic-Micrococcus luteus VTCC 10644, Sal-Salmonella enterica VTCC 10480, Sta-Staphylococcus aureus VTCC 10658; AMP- ampicillin; AMO- amoxicillin; CLO- cloramphenicol; ERY- erythromycin; GEN- gentamycin; KAN-Kanamycin; MET-Metronidazole; NEO- Neomycin; RIF-Rifampicin; PEN- penicillin G; STR- streptomycin; TET- tetracyclin.

Trong thời đại kháng sinh, việc sử dụng probiotic ngày càng được sử dụng cùng với liệu pháp kháng sinh để bảo tồn hệ vi sinh vật đường ruột do tình trạng kháng kháng sinh. Khả năng kháng kháng sinh là một đặc điểm mong muốn ở probiotic. Trong nghiên cứu này, chủng *S. clausii* BCLA kháng với 5/12 loại kháng sinh thử nghiệm, gồm amoxicillin, cloramphenicol, erythromycin, gentamycin và metronidazole; nhạy cảm với ampicillin, kanamycin, neomycin, rifampicin, penicillin G, streptomycin và tetracyclin ở các mức độ khác nhau với các vòng kháng từ 17-31 mm (Bảng 2). Nghiên cứu thử nghiệm trên Enterogermina (chứa bốn chủng của *S. clausii* O/C, N/R, T và SIN) cho thấy các chủng khác nhau có độ nhạy cảm khác nhau đối với các loại kháng sinh khác nhau. Chủng O/C được phát hiện kháng với chloramphenicol, N/R kháng với rifampicin, T kháng với tetracycline và SIN kháng với streptomycin. Tính kháng của các chủng *B. clausii* O/C, N/R, SIN và/hoặc T đối với các loại kháng sinh được mô tả ở trên không thể được chuyển giao bằng cách liên hợp với các loài vi khuẩn khác, do các gen kháng kháng sinh của *B. clausii* chỉ giới hạn ở loài này (Acosta-Rodríguez-Bueno *et al.*, 2022; Ghelardi *et al.*, 2022). Bào tử *B. clausii* (Benegut<sup>®</sup>) được phát hiện kháng amoxycylav, ampicillin, cefaloridine, ciprofloxacin, cloramphenicol, kanamycin, rifampicin, penicillin, streptomycin, và tetracycline, nhạy cảm với norfloxacin, ofloxacin và macrolide azithromycin (Srinivas *et al.*, 2020). Phân tích toàn bộ trình tự bộ gen của *B. clausii* đã tiết lộ rằng các gen kháng kháng sinh hiện diện trong DNA nhiễm sắc thể vốn là bản chất và không thể chuyển giao. Các gen độc tố cũng được phát hiện là không có. Những kết quả này cho thấy việc tiêu thụ *B. clausii* là an toàn cho con người (Lakshmi *et al.*, 2017).

Hoạt động kháng khuẩn là một tính năng thiết yếu khác của các chủng probiotic. Phương pháp thổi thạch đã được sử dụng để phát hiện khả năng kháng khuẩn của chủng *S. clausii* BCLA. Kết quả cho thấy *S. clausii* BCLA có khả năng kháng được cả 5 chủng kiểm định (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* và *Staphylococcus aureus*) với vòng kháng từ 10-25 mm (Bảng 2). Trong báo cáo khác, *B. clausii* CS108 ức chế sự phát triển của *E. coli*, *S. aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* khi đồng nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy lỏng (Khokhlova *et al.*, 2023). Các nghiên cứu *in vitro* đã chỉ ra rằng các chủng *B. clausii* có hoạt tính kháng khuẩn, các chất kháng khuẩn được giải phóng trong giai đoạn tăng trưởng ổn định, trùng hợp với quá trình hình



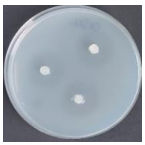
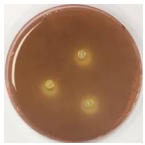
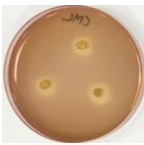
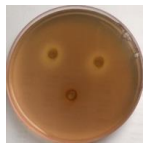
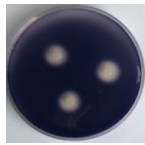

thành bào tử. Hoạt tính kháng lại nhiều loại vi khuẩn Gram dương đã được quan sát, chất chống khuẩn này được xác định là clausin, một loại lantibiotic loại A mới gây cản trở quá trình tổng hợp thành tế bào vi khuẩn (Acosta-Rodri'guez-Bueno *et al.*, 2022). Nuôi trong váng sữa, *B. clausii* sản xuất ra các peptide kháng khuẩn có tác dụng ức chế sự phát triển của *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* và *Enterococcus faecalis*. Hai chủng *B. clausii* UBBC07 và O/C cũng được chứng minh là có khả năng sản sinh ra clausin. Việc sản xuất các chất kháng khuẩn như lantibiotic clausin là con đường quan trọng giúp probiotic ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh trong đường tiêu hóa; điều này có liên quan về mặt lâm sàng khi sử dụng probiotic cùng với liệu pháp kháng sinh (Ghelardi *et al.*, 2022). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng hoạt động kháng khuẩn của bào tử *S. clausii* BCLA có thể mang lại những tác dụng có lợi và có thể là một nguồn hữu ích trong việc cải thiện sự mất cân bằng đường ruột của hệ vi khuẩn và an toàn cho con người.

### Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử chủng *S. clausii* BCLA

Chủng *S. clausii* BCLA có khả năng sinh nhiều loại enzyme ngoại bào được thể hiện qua vòng phân giải các cơ chất: casein (protease), chitin (chitinase), carboxymethyl cellulose (cellulase), pectin (pectinase), tinh bột (amylase) và xylan (xylanase) với vòng phân giải các cơ chất từ 9-20 mm (bảng 3). Khả năng sinh các enzyme khác nhau của *B. clausii* CSI08 cũng được phát hiện bằng bộ API ZYM (Khokhlova *et al.*, 2023). Quá trình sản xuất các enzyme liên quan đến quá trình tiêu hóa các loại đại phân tử khác nhau như polysaccharide, lipid, protein... Việc sản xuất tại chỗ các enzyme này trong ruột vật chủ có thể đóng một vai trò tích cực trong việc cải thiện quá trình tiêu hóa thức ăn.

Độ ổn định nhiệt độ của bào tử *S. clausii* BCLA được đánh giá ở các điều kiện 45°C, 75°C và 90°C trong 3 phút. Kết quả thể hiện trong bảng 3 cho thấy có thay đổi rất ít về khả năng sống sót được phát hiện ở 45°C và 75°C. Tuy nhiên, số lượng bào tử giảm sau khi xử lý ở 90°C từ  $52,3 \times 10^8$  CFU/mL còn  $16,6 \times 10^8$  CFU/mL. Kết quả này cũng tương tự khi đánh giá độ ổn định nhiệt độ của bào tử *B. clausii* CSI08 ở các điều kiện khác nhau. Không có thay đổi nào về khả năng tồn tại được phát hiện ở 45°C hoặc 75°C; số lượng bào tử giảm sau khi xử lý ở 90°C từ  $6,87 \times 10^9$  xuống còn  $3,01 \times 10^9$  CFU/mL (Khokhlova *et al.*, 2023). Như vậy, bào tử *S. clausii* BCLA không bị ảnh hưởng nhiều bởi nhiệt độ được sử dụng trong quá trình chế biến.

**Bảng 3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu nhiệt của bào tử chủng *S. clausii* BCLA**

Khả năng sinh các enzyme phân giải cơ chất	Vòng phân giải cơ chất (mm)					
	Casein	Chitin	CMC	Pectin	Tinh bột	Xylan
	20	9	11	10	12	13
						
Khả năng chịu nhiệt của bào tử	Số lượng bào tử sống sót ( $\times 10^8$ CFU/mL)					
	25 °C	45°C	75°C	90°C		
	52,3	48,2	42,4	16,6		

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã trình bày về chủng vi khuẩn BCLA mới được phân lập từ đất vườn ở Nho Quan, Ninh Bình, với các đặc tính probiotic nổi bật. Chủng BCLA được định danh là *Shouchella clausii* dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA, là loài được công nhận là an toàn (GRAS). Các bào tử của *S. clausii* BCLA có khả năng sống sót cao, độ bám dính tốt và nảy mầm trong điều kiện đường tiêu hóa mô phỏng của con người, đảm bảo cung cấp lượng probiotic được khuyến nghị vào ruột. Là chủng an toàn, không làm tan máu, sinh hoạt chất kháng vi sinh vật gây bệnh kiểm định, kháng với nhiều kháng sinh. Ngoài ra, *S. clausii* BCLA còn có khả năng sinh nhiều loại enzyme có lợi phân giải các hợp chất hữu cơ. Bào tử của nó có thể tồn tại tốt trong quá trình thanh trùng mô phỏng. Tuy nhiên, việc sử dụng hiệu quả chủng này ở người cần thêm các nghiên cứu về probiotic *in vivo*.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả cảm ơn Công ty CP Hóa Sinh Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Acosta-Rodríguez-Bueno CP, Abreu y Abreu AT, Guarner F, Guno MJV, Pehlivanoglu E, Perez III M (2022). *Bacillus clausii* for Gastrointestinal Disorders: A Narrative Literature Review. *Adv Ther*, 39:4854–4874.
- Ahire JJ, Kashikar MS, and Madempudi RS (2021). Comparative accounts of probiotic properties of spore and vegetative cells of *Bacillus clausii* UBBC07 and in silico analysis of probiotic function. *Biotech*, 11(3):116.
- Eldy J, Daquioag L and Penuliar GM (2021). Isolation of Actinomycetes with Cellulolytic and Antimicrobial Activities from Soils Collected from an Urban Green Space in the Philippines. *Int J Microbiol*, Vol 2021, 14 pages.
- Garbor EM, de Vries EJ, Janssen DB (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirection methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 44:153-163.
- Ghelardi E, Abreu y Abreu AT, Marzet CB, Calatayud GÁ, Perez III M, and Castro APM (2022). Current Progress and Future Perspectives on the Use of *Bacillus clausii*. *Microorganisms*, 10(6): 1246.
- Joshi A, Thite S, Karodi P, Joseph N, Lodha T (2021). *Alkalihalobacterium elongatum* gen. nov. sp. nov.: An Antibiotic-Producing *Bacterium* Isolated From Lonar Lake and Reclassification of the Genus *Alkalihalobacillus* Into Seven Novel Genera. *Front Microbiol*, 12:722369.
- Kharwar A, Bazaz MR and Manoj P. Dandekar (2022). Quantitative and qualitative characterization of commercially available oral suspension of probiotic products containing *Bacillus clausii* spores. *BMC Microbiology*, 22:217.
- Khokhlova E, Joan Colom J, Simon A, Mazhar S, García-Lainez G, Llopis S, Gonzalez N, Enrique-López M, Álvarez B, Martorell P, Tortajada M, Deaton J and Rea K (2023). Immunomodulatory and Antioxidant Properties of a Novel Potential Probiotic *Bacillus clausii* CSI08. *Microorganisms*, 11(2): 240.
- Lakshmi SG, Jayanthi N, Saravanan M, Ratna MS (2017). Safety assessment of *Bacillus clausii* UBBC07, as spore forming probiotic. *Toxicol Rep*, 4:62-71.
- Patel AK, Ahire JJ, Pawar SP, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2009). Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *Food Res Internat*, 42: 505–510.
- Sreenadh M, Kumar KR and Nath S (2022). In Vitro Evaluation of *Weizmannia coagulans* Strain LMG S-31876 Isolated from Fermented Rice for Potential Probiotic Properties, Safety Assessment and Technological Properties. *Life*, 12(9): 1388.
- Srinivas A (2020). Anti-microbial susceptibility pattern of spores used in *Bacillus clausii* suspension: an in vitro study. *Int J Contemp Pediatr*, 7(5): 980-984.

## PROBIOTIC PROPERTIES OF BACTERIAL SPORES *SHOUCHELLA CLAUSII* (*BACILLUS CLAUSII*) BCLA

Nguyen Hoang Minh Duc\*, Nguyen Van Nam, Dao Thi Luong

Vietnam Biochemical Technology Joint Stock Company

### SUMMARY

Spore-forming bacteria of the *Bacillus* genus have demonstrated potential as probiotics for human use. *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*) have been recognized as efficacious and safe agents for preventing and treating diarrhea in children and adults, with pronounced immunomodulatory properties during several *in vitro* and clinical studies. In this study, the *in vitro* probiotic properties of BCLA strain isolated from soil were evaluated. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, the BCLA strain was identified as *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*), which is on the Generally Recognized As Safe (GRAS). Probiotic properties of this strain were demonstrated: bile salt tolerance (0.3%), good survival in harsh conditions of simulated stomach and intestine; has high adhesion ability. It meets safety criteria, including hemolytic activity, resistance to many antibiotics, and antagonistic activity against human pathogenic bacteria. In addition, the BCLA strain also has the ability to produce beneficial enzymes that assimilate a variety of substrates and its spores withstand heat during processing. Taken together, these beneficial properties provide strong evidence for *Shouchella clausii* BCLA as a promising potential probiotic.

**Keywords:** Spore, enzyme, *in vitro*, probiotic, *Shouchella clausii* (*Bacillus clausii*).

\* Author for correspondence: Tel: 0902254556; Email: duc.nhm@bccgroup.com.vn

# NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM THAY THẾ SỮA TỪ GẠO VÀ CHUỐI ĐỊNH HƯỚNG CHO NGƯỜI DỊ ỨNG LACTOSE

Hà Thị Dung<sup>1\*</sup>, Nguyễn Quỳnh Giang<sup>1</sup>, Trịnh Thị Nguyệt<sup>1</sup>, Cao Thị Huệ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, 298 Cầu Diễn, Bắc Từ Liêm, Hà Nội

<sup>2</sup>Trường Đại học Thủy lợi, 175 Tây Sơn, Đống Đa, Hà Nội

## TÓM TẮT

Ngày nay, nhu cầu về các sản phẩm thay thế sữa đang gia tăng do sự phổ biến của việc ăn chay và sử dụng các sản phẩm thuần chay tăng lên, bên cạnh đó còn có một bộ phận nhóm người không có khả năng dung nạp lactose – một loại đường trong các sản phẩm sữa động vật. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm nghiên cứu phát triển một sản phẩm thay thế sữa động vật bằng cách kết hợp các nguyên liệu thực vật sẵn có ở nước ta, không bổ sung đường sữa và các loại đường khác và đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng. Các nguyên liệu chính được sử dụng trong nghiên cứu là gạo ST25, gạo nếp nhưng và chuối tiêu – các nông sản phổ biến ở Việt Nam. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ phối trộn gạo, nước phù hợp cho chất lượng sản phẩm được người tiêu dùng chấp nhận với tỷ lệ gạo nếp nhưng : gạo ST25 (1:3); tỷ lệ gạo : nước thích hợp là (1:3). Với tỷ lệ này sản phẩm thu được có vị ngọt thanh sau quá trình thủy phân gạo, không cần bổ sung thêm chất tạo ngọt. Để sản phẩm bảo quản được lâu hơn, nghiên cứu đã tìm ra điều kiện thanh trùng thích hợp nhất cho sản phẩm thay thế sữa là ở 85°C trong thời gian 1 phút. Với các điều kiện trên, sữa gạo thu được có thể bảo quản được 7 ngày trong điều kiện lạnh và không làm thay đổi chất lượng sản phẩm. Sản phẩm thay thế sữa từ gạo và chuối có mức năng lượng đánh giá đạt 84,39 Kcal/100ml – mức năng lượng thấp, phù hợp với người ăn chay. Sản phẩm đạt các chỉ tiêu vi sinh về an toàn vệ sinh thực phẩm theo TCVN 12443:2018.

*Từ khóa:* Chuối, gạo nếp, gạo tẻ, năng lượng thấp, sản phẩm thay thế sữa.

## MỞ ĐẦU

Xu hướng ăn chay và nhu cầu về các sản phẩm thay thế sữa từ thực vật đang ngày càng tăng. Với mục tiêu bảo vệ môi trường, động vật và đảm bảo sức khỏe, nhiều người đã chuyển sang tiêu dùng các sản phẩm từ thực vật như ngũ cốc, đậu, hạt và trái cây (Meike *et al.*, 2016). Để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng cao, các sản phẩm thuần chay thay thế các sản phẩm từ động vật mà vẫn đảm bảo hương vị và dinh dưỡng đang là hướng đi tiềm năng cứu hiện nay.

Việt Nam, với lợi thế là quốc gia sản xuất gạo lớn, đã và đang tận dụng nguồn nguyên liệu này để phát triển các sản phẩm sữa thay thế. Gạo ST25 (*Oryza sativa*), nổi tiếng với chất lượng cao và hương vị thơm ngon, được vinh danh là “Gạo ngon nhất thế giới năm 2019 trong Cuộc thi Gạo ngon nhất thế giới (World’s Best Rice do The Rice Trader) thuộc Hội nghị Thương mại Gạo Thế giới lần thứ 11 được tổ chức tại Philippines và giải nhì cuộc thi “Gạo ngon nhất thế giới 2020” tại Hoa Kỳ. Đây là giống gạo được chứng minh là hoàn toàn không chứa cholesterol, chứa hàm lượng cao các vitamin và khoáng chất như magie, canxi, chất xơ (Giang, 2022). Cùng với gạo nếp (*Oryza sativa var. glutinosa*) có hương thơm nhẹ và dẻo, được xem là nguồn nguyên liệu lý tưởng có phát triển các sản phẩm thay thế sữa động vật. Do vậy, các sản phẩm thay thế sữa động vật từ gạo không chỉ đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng chay mà còn mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe. Chúng thường không chứa lactose, phù hợp với những người không dung nạp sữa động vật. Bên cạnh đó, chuối là loại thực phẩm phổ biến, giá thành rẻ, dễ kiếm ở Việt Nam. Trong đó giống chuối tiêu *Musa acuminata* AAA được trồng phổ biến với diện tích trồng lớn nhất so với các loại quả khác. Theo thống kê của Tổ chức FAO, diện tích trồng chuối tại Việt Nam lên tới 143,804 nghìn ha vào năm 2022. Cùng với đó sản lượng chuối tăng từ 1,3 triệu tấn lên tới 2,51 triệu tấn từ năm 1994 tới năm 2022 (AOSTAT, 2022). Chuối tiêu *Musa acuminata* AAA khi chín có mùi thơm đặc trưng, là một nguồn trái cây giàu dinh dưỡng đường, vitamin (caroten, vitamin B1, B6, vitamin C), khoáng chất (K, P, Na, Mg, Fe...), giúp đảm bảo dinh dưỡng và cơ thể cân đối cho người sử dụng, là nguồn nguyên liệu tiềm năng để nghiên cứu các sản phẩm thay thế sữa động vật (Wills *et al.*, 1984). Vì vậy, “Nghiên cứu phát triển sản phẩm thay thế sữa từ gạo và chuối” là một hướng đi tiềm năng, giúp kết hợp các nguồn nguyên liệu phổ biến sẵn có, giá thành rẻ, giúp đa dạng hóa sản phẩm có nguồn gốc thực vật, không chỉ đáp ứng nhu cầu và đảm bảo sức khỏe cho người tiêu dùng mà còn góp phần nâng cao giá trị nông sản Việt Nam.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên vật liệu

Trong nghiên cứu sử dụng gạo ST25 có hình dáng dài, đẹp, màu trắng trong, không bị gãy vụn, và gạo nếp

nhung có hạt to, tròn, mảy đều, màu trắng đục, có hương thơm nhẹ nhẹ, được sản xuất tại Công ty Cổ phần Lương thực Phương Nam.

Chuối sử dụng trong nghiên cứu là chuối tiêu *Musa acuminata* AAA Cavendish. Quả chuối tiêu có độ chín 6 – 7 đánh giá theo chỉ số PCI của vỏ. Vỏ chuối có những mảng nâu lớn, đường kính khoảng từ 2 – 3 cm, dài từ 15 – 20 cm được thu mua tại vựa chuối tại Hà Nội.

Enzym  $\alpha$ -amylase (AHA-100T, Angel) có hoạt tính 100.000 U/g, nhiệt độ hoạt động tối ưu 95-97°C và pH hoạt động tối ưu 5-6,5.

### Phương pháp bố trí thí nghiệm xây dựng quy trình sản xuất sản phẩm thay thế sữa từ gạo và chuối

Gạo nếp nhung và gạo ST25 được phối theo các tỷ lệ (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) được vo sạch, để ráo, và rang gạo ở 120°C trong 5 phút để tạo mùi thơm cho sản phẩm. Quá trình dịch hóa được thực hiện bằng cách ngâm gạo với nước theo các tỷ lệ (1:3; 1:4; 1:5) trong 2 giờ. Sau đó hỗn hợp được xay tới mịn, đun nâng nhiệt và bổ sung enzym  $\alpha$ -amylase với nồng độ 0,2% (200U/g nguyên liệu) so với khối lượng gạo, ủ trong thời gian 120 phút ở nhiệt độ 95°C để thực hiện quá trình thủy phân. Dịch được gia nhiệt lần nữa để bất hoạt enzym và lọc thu dịch gạo. Sau đó, dịch gạo được phối chế với dịch chuối đã được xử lý enzym pectinase theo tỷ lệ 10%, 15%, 20% và 25% so với khối lượng dịch gạo và các phụ gia ổn định pectin và xanthan gum ở nồng độ 0,15%. Cuối cùng, tiến hành đồng hóa để đồng nhất sản phẩm, thanh trùng ở các điều kiện nhiệt độ 75, 80, 85 và 90°C trong thời gian 1, 3 và 5 phút.

### Phương pháp phân tích

*Phương pháp đánh giá nồng độ chất khô hòa tan (TCVN 4414:1987)* Hàm lượng chất khô hòa tan được xác định bằng chiết quang kế cầm tay (Brix kế). Hàm lượng phần trăm được đọc trực tiếp trên thang chia độ của khúc xạ kế ở 20°C.

*Hiệu suất thu hồi dịch* được xác định bằng công thức:  $\eta(\%) = (m_2 \times C_2) \times 100 / (m_1 \times C_1)$

Trong đó:  $m_1$ ,  $m_2$ : là khối lượng mẫu ban đầu và khối lượng dịch mẫu sau khi lọc (g);  $C_1$ ,  $C_2$ : là hàm lượng chất tan ban đầu và sau khi lọc, tính theo độ Bx (Nguyễn Thị Ngọc Mai, 2023)

*Phương pháp xác định đường khử* Hàm lượng đường khử trong mẫu ban đầu và sau khi xử lý enzym được xác định theo phương pháp đo quang phổ sử dụng thuốc thử DNS theo Miller và có cải tiến: Hút 2 ml dịch gạo thu được sau khi thủy phân và lọc trộn đều với 1,5 ml dung dịch DNS. Hỗn hợp được đun sôi cách thủy trong 10 phút và làm nguội nhanh trong 10 phút. Dung dịch thu được được đo ở bước sóng 540 nm bằng máy đo quang phổ UV-VIS. Hàm lượng đường khử được xác định thông qua đường chuẩn glucose với dãy nồng độ 0-2% và mẫu trắng là nước cất. (Lam *et al.*, 2021).

*Phương pháp xác định hàm lượng carbohydrat hòa tan tổng số* sử dụng phương pháp phenol-acid sulfuric: Hút 1 ml dịch gạo đã xử lý enzym và lọc trộn đều với 1 ml dung dịch phenol 5% và 1 ml nước cất, tiếp tục bổ sung thêm 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sau đó lắc đều. Đo độ hấp phụ của dung dịch thu được tại bước sóng 485 nm. Hàm lượng carbohydrat hòa tan tổng số được đánh giá thông qua đường chuẩn glucose với dãy nồng độ 0-1% và mẫu trắng là nước cất (Dubois *et al.*, 1956).

*Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl (TCVN 8099-1:2015)* Cho 5g mẫu cho vào bình Kjeldahl, thêm chất xúc tác (5g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và 0,5g CuSO<sub>4</sub>) và 20ml axit sunfuric đặc. Quá trình vô cơ hóa mẫu được thực hiện bằng thiết bị phá mẫu tự động (VELP DKL 8, Đức) cho tới khi thu được dung dịch trong xanh. Xác định hàm lượng NH<sub>3</sub> bằng HCl 0,1N với sự hỗ trợ của thiết bị cất đạm tự động (VELP- UDK 159, Đức). Hàm lượng protein thô trong mẫu được xác định bằng cách nhân tổng hàm lượng nitơ thu được sau khi chưng cất với hệ số 6,25.

*Xác định hàm lượng lipid bằng phương pháp Randall (TCVN 6555:2017)* Phần mẫu thử được thủy phân với HCl đun sôi và chất trợ lọc, sau đó được chiết trong dung môi ete dầu mỡ. Sau khi chiết, dung môi được làm bay hơi và phần chất béo còn lại được xác định bằng cách cân sau khi làm khô. Hàm lượng chất béo được tính toán theo TCVN 6555:2017.

*Phương pháp xác định hàm lượng vi sinh vật tổng số (TCVN 4884: 2005)* áp dụng kỹ thuật đếm khuẩn lạc sử dụng môi trường PCA (Plate counted agar), mẫu được pha loãng theo hệ thập phân và được ủ trong điều kiện hiếu khí ở 30°C trong 72 giờ. Sau thời gian ủ, số khuẩn lạc xuất hiện trong đĩa petri được ghi nhận.

*Phương pháp xác định hàm lượng nấm men, nấm mốc (TCVN 8275-1:2010)* áp dụng kỹ thuật đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch DRBC, mẫu được pha loãng mẫu theo hệ thập phân, ủ ở nhiệt độ 25 ± 1°C trong 72 giờ. Sau thời gian ủ, số khuẩn lạc xuất hiện trong đĩa petri được ghi nhận.

*Phương pháp đánh giá cảm quan (Lim, 2011)* Sử dụng phương pháp phép thử cho điểm thị hiếu theo thang đo 9 điểm Hedonic theo mức độ hài lòng của người thử với sản phẩm: 1 – cực kỳ chán; 2 – rất chán; 3 – chán; 4 – tương đối chán; 5 – bình thường; 6 – tương đối thích; 7 – thích; 8 – rất thích; 9 – cực kỳ thích. Các điểm này được sử dụng để đánh giá màu, mùi, vị và cấu trúc của sản phẩm.

*Phương pháp đo màu (TCVN 9882: 2013)* Sử dụng máy đo màu cầm tay là thiết bị đo màu và cho kết quả có độ sai lệch màu Delta E ( $\Delta E$ ) về màu sắc của mẫu được làm ra so với mẫu đối chứng. Sự khác biệt về màu thành phần giữa 2 mẫu làm ra so với mẫu đối chứng theo hệ màu  $L^*a^*b^*$ .

**Phương pháp xử lý số liệu**

Kết quả của các thí nghiệm từ ba lần lặp được biểu diễn dưới dạng  $TB \pm SD$ . Phần mềm Microsoft Excel 2021 và Graphpad Prism 9.0 được sử dụng để xử lý số liệu. ANOVA với Tukey's test được sử dụng để xác định các khác biệt có ý nghĩa thống kê.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Ảnh hưởng của tỷ lệ gạo nếp và gạo tẻ đến chất lượng thành phẩm**

Do thành phần amylose và amylopectin khác nhau ở gạo tẻ và gạo nếp, nên tỷ lệ phối trộn hai loại gạo này có thể ảnh hưởng tới thành phần dinh dưỡng, hương vị và kết cấu của sữa thành phẩm. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn gạo nếp và gạo tẻ tới dịch gạo thu được thông qua các chỉ số pH dịch gạo, hàm lượng chất khô hòa tan tính theo độ Brix và hiệu suất trích ly được thể hiện qua bảng 1. Từ kết quả cho được cho thấy, dịch gạo có độ pH trung tính nằm trong khoảng từ 7,15 – 7,27. Độ pH của sữa gạo có sự thay đổi khi thay đổi tỷ lệ gạo nếp và gạo tẻ, tuy nhiên sự thay đổi này không đáng kể và không ảnh hưởng tới chất lượng sản phẩm. Mặt khác, hàm lượng chất khô hòa tan tăng đáng kể khi tăng tỷ lệ gạo tẻ so với gạo nếp. Điều này nguyên nhân có thể do sự khác biệt của tỷ lệ amylose/amylopectin có trong gạo nếp và gạo tẻ. Trong đó, gạo tẻ được chứng minh có hàm lượng amylose cao hơn so với gạo nếp. Cụ thể, gạo ST25 chứa khoảng 16-19% amylose (Minh, 2021), trong khi đó hàm lượng amylose trong gạo nếp thường  $\leq 6\%$  (Juliano, 1971). Công thức cấu tạo của amylose có dạng mạch thẳng với các monomer D-glucose liên kết với nhau bằng liên kết 1,4-glucoside và dễ dàng bị phân cắt do hoạt động của enzym  $\alpha$ -amylase. Do vậy, hàm lượng đường khử tạo thành do quá trình thủy phân cũng tăng dần khi tăng tỷ lệ gạo tẻ và đạt giá trị cao nhất ở tỷ lệ gạo nếp : gạo tẻ 1:3, sự tăng này có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ). Với tỷ lệ gạo nếp và gạo tẻ này, kết cấu của sữa không quá loãng do ảnh hưởng của amylopectin trong gạo nếp, dịch gạo có độ ngọt vừa phải. Do đó, cần cân bằng tỷ lệ gạo nếp và gạo tẻ để có được hương vị và kết cấu sữa gạo tốt nhất. Với kết quả hiệu suất trích ly cao nhất, dịch không bị quá loãng nên lựa chọn tỷ lệ gạo nếp : gạo tẻ là 1:3 cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 1. Kết quả cấu trúc ảnh hưởng của tỷ lệ gạo nếp và gạo tẻ đến chất lượng dịch gạo thu được**

Tỷ lệ gạo nếp : gạo tẻ	pH	Hàm lượng chất khô hòa tan, Bx	Hàm lượng đường khử, ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hiệu suất trích ly dịch gạo (%)
Tỷ lệ 1:1	7,21 $\pm$ 0,01 <sup>bd</sup>	7,73 $\pm$ 0,14 <sup>cd</sup>	24,12 $\pm$ 0,03 <sup>bcd</sup>	76,63 $\pm$ 0,25 <sup>bcd</sup>
Tỷ lệ 1:2	7,15 $\pm$ 0,01 <sup>ac</sup>	8,10 $\pm$ 0,09 <sup>cd</sup>	35,79 $\pm$ 0,02 <sup>acd</sup>	74,06 $\pm$ 0,19 <sup>acd</sup>
Tỷ lệ 1:3	7,27 $\pm$ 0,02 <sup>bd</sup>	9,60 $\pm$ 0,12 <sup>abd</sup>	58,56 $\pm$ 0,02 <sup>abd</sup>	80,1 $\pm$ 0,23 <sup>abd</sup>
Tỷ lệ 1:4	7,16 $\pm$ 0,01 <sup>ac</sup>	12,17 $\pm$ 0,17 <sup>abc</sup>	42,94 $\pm$ 0,04 <sup>abc</sup>	75,08 $\pm$ 0,16 <sup>abc</sup>

(Số liệu được trình bày dưới dạng  $TB \pm SD$ ; a, b, c, d - thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh với tỷ lệ 1:1 (a), 1:2 (b), 1:3 (c), 1:4 (d) (Tukey's test,  $p < 0,05$ )

**Ảnh hưởng của tỷ lệ gạo và nước đến chất lượng dịch gạo thu được**

Kết quả bảng 2 cho thấy ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn gạo và nước tới pH dịch gạo, hàm lượng chất khô, hàm lượng đường khử và hiệu suất trích ly dịch gạo thu được. Dựa trên kết quả bảng 2, có thể thấy khi thay đổi tỷ lệ gạo : nước, pH của dịch gạo nằm trong khoảng từ pH trung tính tới kiềm nhẹ. Tổng hàm lượng chất khô hòa tan, hàm lượng đường khử và hiệu suất trích ly dịch gạo có xu hướng giảm khi tăng lượng nước và sự tăng này có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ). Điều này có thể giải thích do vai trò của nước là vận chuyển và hòa tan các chất tan từ bã gạo ra dung dịch chiết xuất. Tuy nhiên, lượng nước càng nhiều nhưng hàm lượng chất tan không tăng lên sẽ làm sản phẩm trở nên loãng và nhạt hơn. Do vậy, tỷ lệ gạo : nước thích hợp nhất là tỷ lệ 1:3.

**Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ gạo và nước đến chất lượng dịch gạo thu được**

Tỷ lệ gạo : nước	pH	Hàm lượng chất khô hòa tan, Bx	Hàm lượng đường khử, ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hiệu suất trích ly dịch gạo (%)
Tỷ lệ 1:3	7,65 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>	16,83 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>	41,22 $\pm$ 2,51 <sup>c</sup>	78,45 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>
Tỷ lệ 1:4	7,72 $\pm$ 0,01 <sup>ac</sup>	13,53 $\pm$ 0,06 <sup>ac</sup>	44,35 $\pm$ 4,40 <sup>c</sup>	77,48 $\pm$ 0,04 <sup>ac</sup>
Tỷ lệ 1:5	8,25 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	12,07 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	19,59 $\pm$ 0,76 <sup>ab</sup>	71,44 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>

(Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  SD; a, b, c - thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh với tỷ lệ 1:3 (a), 1:4 (b) và 1:5 (c) (Tukey's test,  $p < 0,05$ )

**Nghiên cứu phối chế dịch chuối với dịch gạo**

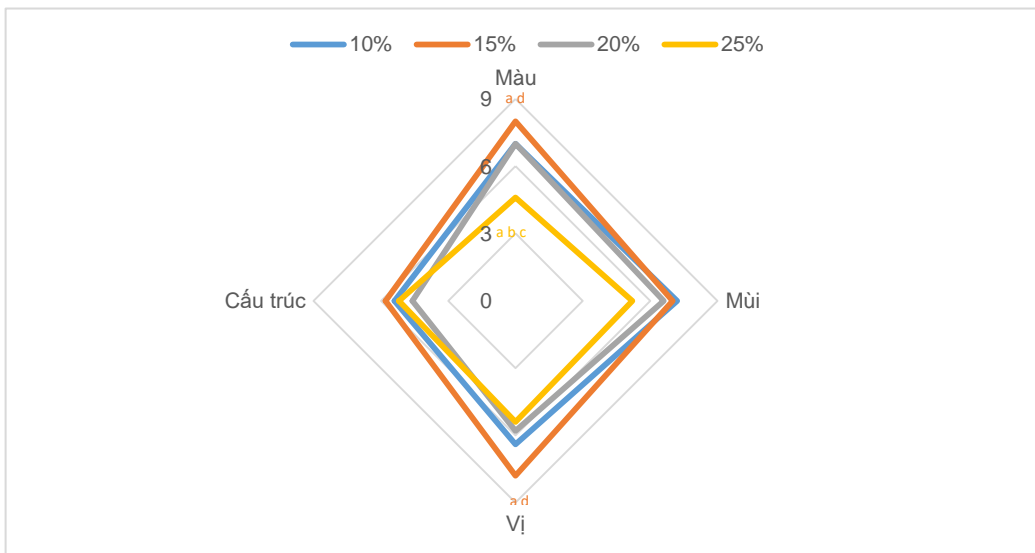
Kết quả đánh giá ảnh hưởng của dịch chuối sau khi bổ sung cùng dịch gạo tới các chỉ số pH, hàm lượng chất khô hòa tan và hàm lượng đường khử của thành phẩm được thể hiện trong bảng 3. Từ kết quả tại bảng 3 cho thấy pH có xu hướng giảm dần khi tỷ lệ dịch chuối tăng và thay đổi từ khoảng pH trung tính xuống khoảng axit nhẹ và sự giảm này có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ). Điều này có thể lý giải do trong chuối có chứa nhiều axit hữu cơ như axit citric và axit malic ở hàm lượng cao, do vậy chuối có tính axit nhẹ (Wills *et al.*, 1984). Bên cạnh đó, nồng độ chất khô hòa tan và hàm lượng đường khử cũng có xu hướng tăng nhẹ khi tăng lượng dịch chuối từ 10-25%. Sự tăng này được nhìn thấy rõ rệt khi bổ sung dịch chuối 15% so với 10% dịch chuối ở thí nghiệm trước ( $p < 0,05$ ). Tiếp tục tăng lượng dịch chuối bổ sung từ 20% lên 25%, hàm lượng đường khử có tăng nhưng sự tăng này là không đáng kể và không có ý nghĩa về mặt thống kê.

**Bảng 3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của phối chế dịch chuối lên các chỉ số hóa lý của thành phẩm**

Tỷ lệ dịch chuối	pH	Hàm lượng chất khô hòa tan, Bx	Hàm lượng đường khử, (µg/ml)
0% (đối chứng)	7,72 ± 0,015 <sup>bcde</sup>	12,07 ± 0,153 <sup>bcde</sup>	44,35 ± 0,07 <sup>bcde</sup>
10%	5,95 ± 0,015 <sup>acde</sup>	6,93 ± 0,153 <sup>ae</sup>	85,63 ± 0,01 <sup>acde</sup>
15%	5,34 ± 0,006 <sup>abde</sup>	6,97 ± 0,058 <sup>ae</sup>	94,93 ± 0,02 <sup>ab</sup>
20%	5,12 ± 0,006 <sup>abce</sup>	7,03 ± 0,153 <sup>ae</sup>	101,07 ± 0,003 <sup>ab</sup>
25%	4,99 ± 0,006 <sup>abcd</sup>	8,07 ± 0,115 <sup>abcd</sup>	102,08 ± 0,002 <sup>ab</sup>

(Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD; a, b, c, d, e - thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh với tỷ lệ 0% (a), 10% (b), 15% (c), 20% (d) và 25% (e) (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

Kết quả người tiêu dùng đánh giá cảm quan sản phẩm được biểu diễn trong hình 1. Thông qua kết quả đánh giá cảm quan thị hiếu người tiêu dùng cho thấy tỷ lệ 15% dịch chuối phối với dịch gạo được người tiêu dùng ưa chuộng nhất với điểm cảm quan nằm trong khoảng yêu thích từ 6-9 điểm, trong đó màu và vị có sự khác biệt rõ rệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ) khi so sánh với các mẫu có bổ sung 10% và 25% dịch chuối. Trong đó, chuối là một loại trái cây rất dễ bị xỉn màu do quá trình oxy hóa các hợp chất phenolics do sự có mặt của các enzym polyphenol oxidase (PPO) có trong chuối khi trong môi trường có oxy sẽ chuyển thành các hợp chất có màu nâu (Yildiz, 2018). Do vậy, càng nhiều dịch chuối bổ sung vào thì sản phẩm có xu hướng xỉn màu càng tăng, đồng thời độ ngọt do đường có sẵn trong chuối cũng tăng lên nên không được người tiêu dùng ưa chuộng. Vì vậy tỷ lệ phối trộn dịch chuối thích hợp là 15%.



**Hình 1. Kết quả đánh giá cảm quan thị hiếu của mẫu ở các tỷ lệ phối chế dịch chuối so với lượng dịch gạo khác nhau**

(a, b, c, d - thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh với các mẫu 10% (a), 15% (b), 20% (c) và 25% (d) (Tukey's test,  $p < 0,05$ )

**Khảo sát nhiệt độ và thời gian thanh trùng sản phẩm**

Để kéo dài thời gian sử dụng của sản phẩm, xử lý nhiệt để tiêu diệt các vi sinh vật gây hư hỏng sản phẩm là điều cần thiết. Với pH của sản phẩm sau khi phối dịch chuối là 5,34 và quá trình xử lý nhiệt cao có thể ảnh hưởng tới dinh dưỡng của sản phẩm nên nghiên cứu thực hiện lựa chọn phương pháp thanh trùng. Thanh trùng sữa được

thực hiện bằng cách làm nóng ở nhiệt độ 72 – 90°C sau đó làm lạnh nhanh mức nhiệt 4°C. Do vậy nghiên cứu thiết lập các thí nghiệm thanh trùng sản phẩm ở các chế độ nhiệt 75°C, 80°C, 85°C và 90°C trong 1 phút và đánh giá sự thay đổi của các chỉ tiêu lý hóa cũng như vi sinh vật trong sản phẩm. Kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Dựa vào kết quả ở bảng 4 cho thấy, với các chỉ tiêu vi sinh vật, không phát hiện sự có mặt của nấm men và nấm mốc trong tất cả các mẫu thanh trùng. Trong khi đó, tổng số vi sinh vật hiếu khí giảm dần khi tăng nhiệt độ thanh trùng. Nguyên nhân khi ở nhiệt độ cao, các vi sinh vật không ưa nhiệt bị tiêu diệt. Mặt khác, giá trị pH của sản phẩm, hàm lượng chất khô hòa tan tổng số và hàm lượng đường khử có xu hướng tăng nhẹ khi tăng nhiệt độ thanh trùng từ 75°C lên 85°C và sự tăng này có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ). Khi tiếp tục tăng nhiệt độ thanh trùng lên 90°C thì hàm lượng đường khử có xu hướng giảm nhẹ, sự giảm có ý nghĩa về mặt thống kê khi so sánh với các lượng đường khử có trong mẫu ở 75°C và 80°C thanh trùng. Sự giảm này có thể do sự biến tính protein ở nhiệt độ cao, phản ứng Maillard của đường với protein ở nhiệt độ cao làm giảm hàm lượng đường và làm cho sản phẩm bị sẫm màu. Tóm lại, sản phẩm sau khi thanh trùng ở các nhiệt độ khảo sát đã đáp ứng được yêu cầu về chỉ tiêu vi sinh vật theo quy định của TCVN 12443:2018 về sữa đậu nành – một sản phẩm thay thế sữa động vật tương tự. Trong đó, nhiệt độ 90°C giúp tiêu diệt vi sinh vật tốt nhất, tiếp sau đó là mức nhiệt 85°C. Tuy nhiên, sữa sẽ bị đổi màu sắc khi thanh trùng ở 90°C, vì vậy nhiệt độ thanh trùng được lựa chọn là 85°C.

**Bảng 4. Kết quả chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật của sản phẩm ở các mức nhiệt thanh trùng**

Nhiệt độ thanh trùng	pH	Hàm lượng chất khô hòa tan tổng số, Bx	Hàm lượng đường khử, (µg/ml)	Tổng số vi sinh vật hiếu khí, CFU/ml	Tổng số nấm men, nấm mốc, CFU/ml	Độ chênh lệch màu ΔE
75°C	5,42 ± 0,05 <sup>c</sup>	5,03 ± 0,06 <sup>bc</sup>	64,93 ± 0,03 <sup>bd</sup>	36.10 <sup>1</sup>	KPH	0,36 ± 0,13 <sup>bcd</sup>
80°C	5,56 ± 0,02	5,53 ± 0,06 <sup>ad</sup>	68,22 ± 0,05 <sup>ad</sup>	18.10 <sup>1</sup>	KPH	0,15 ± 0,34 <sup>acd</sup>
85°C	5,64 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,73 ± 0,06 <sup>ad</sup>	69,94 ± 0,04 <sup>d</sup>	9.10 <sup>1</sup>	KPH	1,28 ± 0,21 <sup>abd</sup>
90°C	5,56 ± 0,02	4,93 ± 0,05 <sup>bc</sup>	94,57 ± 0,05 <sup>ab</sup>	KPH	KPH	5,40 ± 0,16 <sup>abc</sup>

(Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD; a, b, c, d, e - thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh với các mẫu 75°C (a), 80°C (b), 85°C (c) và 90°C (d) (Tukey's test,  $p < 0,05$ )

Sau khi lựa chọn được thời gian thanh trùng, nghiên cứu tiến hành khảo sát thời gian thanh trùng ở 1, 3 và 5 phút. Kết quả đánh giá ảnh hưởng thời gian thanh trùng tới các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật của sản phẩm được biểu diễn trong bảng 5.

**Bảng 5. Kết quả chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật của sản phẩm ở các mức nhiệt thanh trùng**

Thời gian thanh trùng	pH	Hàm lượng chất khô hòa tan tổng số, Bx	Hàm lượng đường khử, (µg/ml)	Tổng số vi sinh vật hiếu khí, CFU/ml	Tổng số nấm men, nấm mốc, CFU/ml	Độ chênh lệch màu ΔE
1 phút	5,65 ± 0,06 <sup>b</sup>	5,93 ± 0,05 <sup>bc</sup>	70,31 ± 0,02 <sup>bc</sup>	15.10 <sup>1</sup>	KPH	1,01 ± 0,13 <sup>bc</sup>
3 phút	5,67 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,63 ± 0,05 <sup>a</sup>	61,78 ± 0,03 <sup>ac</sup>	10.10 <sup>1</sup>	KPH	4,40 ± 0,13 <sup>ac</sup>
5 phút	5,68 ± 0,06	6,87 ± 0,05 <sup>a</sup>	49,78 ± 0,01 <sup>ab</sup>	5.10 <sup>1</sup>	KPH	6,06 ± 0,13 <sup>ab</sup>

(Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± SD; a, b, c, d, e - thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh với các mẫu 1 phút (a), 3 phút (b) và 5 phút (c) (Tukey's test,  $p < 0,05$ )

Từ kết quả thu được cho thấy, thời gian thanh trùng càng dài hàm lượng đường khử có xu hướng giảm ( $p < 0,05$ ), trong khi hàm lượng chất khô hòa tan tổng số có xu hướng tăng ( $p < 0,05$ ). Điều này có thể giải thích do các hợp chất cao phân tử trong sản phẩm như tinh bột có thể bị phân hủy thành các phân tử nhỏ hơn ở nhiệt độ cao. Đường khử lại có xu hướng xảy ra các phản ứng kết hợp với amino axit có trong dịch chuối và dịch gạo làm sản phẩm sẫm màu hơn. Điều này phù hợp với kết quả đánh giá độ chênh lệch màu ΔE khi so sánh với mẫu đối chứng (chưa thanh trùng). Với  $\Delta E < 2$  thì thời gian 1 phút là thời gian đảm bảo màu sắc vẫn giữ được như ban đầu và các chỉ tiêu về vi sinh vật đáp ứng theo quy định của TCVN 12443:2018. Như vậy điều kiện thanh trùng thích hợp cho sản phẩm này là thanh trùng ở 85°C trong thời gian 1 phút. Kết quả thu được gần tương đồng với nghiên cứu của Orhevba và đồng tác giả (2017). Nghiên cứu đã chứng minh rằng ở chế độ thanh trùng 80°C cho 5 phút thì sản phẩm sữa thực vật từ đậu nành có hàm lượng protein cao nhất và hàm lượng dinh dưỡng của sữa ít bị ảnh hưởng nhất. Do vậy với sản phẩm từ thực vật là gạo và chuối, chế độ thanh trùng 85°C trong 1 phút là chế độ được chọn để hoàn thiện quy trình sản xuất sản phẩm.

**Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm**

Sản phẩm được đánh giá các chỉ tiêu dinh dưỡng cơ bản là hàm lượng đường, protein, lipid và thông qua đó tính toán năng lượng cho 100 ml sản phẩm. Kết quả được thể hiện trong bảng 6. Từ kết quả thu được cho thấy, hàm lượng đường tổng của sản phẩm trong nghiên cứu cao hơn hàm lượng đường tổng của nước gạo rang từ TH true milk và nước gạo Woongjin, Hàn Quốc. Hàm lượng đường trong sản phẩm chủ yếu đến do hoạt động thủy

## CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

phân tinh bột trong gạo bằng enzym  $\alpha$ -amylase và hàm lượng đường có trong dịch chuối phối trộn cùng. Trong khi đó, trong thành phần của nước gạo Woongjin, Hàn Quốc có bổ sung đường và kem. Do vậy, hàm lượng lipid trong nước gạo Woongjin, Hàn Quốc tương đối cao. Hàm lượng lipid trong sản phẩm thu được và nước gạo của TH true milk gần tương đương nhau. Mặt khác, hàm lượng protein trong sản phẩm nghiên cứu thu được cao gấp đôi so với nước gạo của TH true milk. Điều này có thể giải thích do sự khác biệt trong thành phần hóa học nguyên liệu sử dụng, bổ sung thêm dịch chuối có thể làm tăng hàm lượng protein trong sản phẩm. Một nguyên nhân khác có thể do công nghệ thanh trùng với nhiệt độ thấp và thời gian ngắn giúp bảo toàn được nhiều hơn hàm lượng protein trong sản phẩm. Do vậy, năng lượng của sản phẩm thay thế sữa từ gạo và chuối có số calories đạt 84,39 Kcal/100 ml cao hơn các sản phẩm cùng loại, và vẫn nằm trong các sản phẩm có mức năng lượng thấp phù hợp với người ăn kiêng. Đồng thời sản phẩm cung cấp đầy đủ dưỡng chất cho cơ thể phát triển.

**Bảng 6. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm và so sánh với các sản phẩm cùng loại trên thị trường**

Chỉ tiêu	Sản phẩm thay thế sữa từ gạo và chuối	Nước gạo rang TH True Milk	Nước gạo rang Woongjin, Hàn Quốc
Hàm lượng đường tổng (%)	17,93 $\pm$ 0,02	12	9
Hàm lượng lipid (%)	0,91 $\pm$ 0,02	0,8	2
Hàm lượng protein (%)	1,12 $\pm$ 0,01	< 0,5	0
Năng lượng calorie (Kcal/100ml)	84,39	56,2	50

### Đánh giá các chỉ tiêu hóa lý sau thời gian bảo quản

Sau khi thanh trùng, sản phẩm được bảo quản trong điều kiện lạnh ở nhiệt độ từ 3-4°C. Kết quả đánh giá sự thay đổi của sản phẩm sau thời gian bảo quản 7 ngày được biểu diễn trong bảng 7. Từ kết quả thu được cho thấy, các chỉ tiêu hóa lý như pH sản phẩm có thay đổi, sự thay đổi có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ), tuy nhiên nó không đáng kể và không làm ảnh hưởng chất lượng sản phẩm. Mặt khác, hàm lượng chất khô hòa tan và hàm lượng đường khử sau 7 ngày bảo quản cũng có thay đổi và sự thay đổi này cũng không đáng kể khi so sánh với mẫu ban đầu. Điều này có nghĩa chất lượng sản phẩm vẫn còn tốt sau thời gian 7 ngày bảo quản trong điều kiện lạnh, không xảy ra các biến đổi hay quá trình lên men hoặc hoạt động của vi sinh vật sau thời gian này. Do đó, sản phẩm sau thanh trùng vẫn đảm bảo an toàn và có thể sử dụng bình thường.

**Bảng 7. Kết quả chỉ tiêu hóa lý của sản phẩm sau thời gian bảo quản trong điều kiện lạnh 3-4°C**

Thời gian bảo quản	pH	Hàm lượng chất khô hòa tan tổng số, Bx	Hàm lượng đường khử, ( $\mu$ g/ml)	Tổng số vi sinh vật hiếu khí, CFU/ml	Tổng số nấm men, nấm mốc, CFU/ml
0 ngày	5,65 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	5,93 $\pm$ 0,06	70,31 $\pm$ 0,02	15.10 <sup>1</sup>	KPH
7 ngày	5,62 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	6,03 $\pm$ 0,05	70,59 $\pm$ 0,01	21.10 <sup>1</sup>	KPH

\*KPH – Không phát hiện; Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  SD; a, b - thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh với mẫu 0 ngày (a) và 7 ngày (b) (Tukey's test,  $p < 0,05$ )

## KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu đã tìm được điều kiện thích hợp để phát triển sản phẩm thay thế sữa từ nguyên liệu gạo và chuối. Cụ thể là, tỷ lệ gạo nếp nhung : gạo ST25 (1:3); ngâm gạo trong nước với tỷ lệ gạo : nước thích hợp là (1:3) trong 2 giờ. Tỷ lệ dịch chuối bổ sung là 15% cùng với tỷ lệ phụ gia 0,15% xanthan gum và 0,15% pectin. Điều kiện thanh trùng thích hợp nhất cho sản phẩm thay thế sữa là ở 85°C trong thời gian 1 phút. Sản phẩm thu được đạt TCVN 12443:2018 về các chỉ tiêu tổng số vi sinh vật hiếu khí và tổng số nấm men, nấm mốc. Đã đánh giá chỉ số dinh dưỡng của sản phẩm với lipid – 0,91%, protein – 1,12%, đường tổng – 17,93%. Sản phẩm có vị ngọt tự nhiên do đường của quá trình thủy phân enzym, không bổ sung thêm chất tạo ngọt, do vậy năng lượng cho 100ml sản phẩm là 84,39 kcal/100ml. Sản phẩm được khuyến cáo sử dụng cho người ăn kiêng, ăn chay. Sản phẩm vẫn giữ được chất lượng sau 7 ngày bảo quản trong điều kiện lạnh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AOSTAT. (2022). Crops and livestock products. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, & Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28(3) : 350-356.
- Juliano BO (1971). A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today*, 16 : 334–340.
- Giang TT, Nghĩa TH, Nghi NTH, Anh VDL, & Khang ĐT (2022). Phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 58 : 225-231.



- Lam HH, Dinh TH, & Dang-Bao T (2021). Quantification of total sugars and reducing sugars of dragon fruit-derived sugar-samples by UV-Vis spectrophotometric method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 947(1) : 012041.
- Lim J (2011). Hedonic scaling: A review of methods and theory. *Food Qual Prefer*, 22(8) : 733-747.
- Minh NP (2021). Effectiveness of atmospheric cold plasma technology on physicochemical and functional characteristics of ST25 fragrant rice (*Oryza sativa* L.) flour. *Plant Science Today*, 8(3) : 688-692.
- Meike J, Claudia B, Manika R, Ulrich H (2016). Motives of consumers following a vegan diet and their attitudes towards animal agriculture. *Appetite*, 105 : 643-651.
- Nguyễn Thị Ngọc Mai (2023). Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân thu dịch chuối. *Luận văn tốt nghiệp cử nhân ngành Công nghệ thực phẩm. Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội.*
- Orhevba BA, Bankole OS and Olorunsogo S (2017). Protein and Fat Content of Tiger Nut-Soy Milk Blends as Influenced by Pasteurization. *2nd International Engineering Conference (IEC 2017) of the School of Engineering and Engineering Technology, F.U.T Minna*. 17th – 19th October : 57-65.
- Yildiz G (2018). The effect of different chemical agents on the prevention of enzymatic browning in banana. *Journal of Food Science and Engineering*, 7, 86-91.
- Wills RBH, Lim JSK, & Greenfield H (1984). Changes in chemical composition of 'Cavendish' banana (*Musa acuminata*) during ripening. *J Food Biochem*, 8(2) : 69-77.

## DEVELOPMENT OF NON DAIRY MILK ALTERNATIVE BASED ON RICE AND BANANA FOR LACTOSE ALLERGIC PEOPLE

Ha Thi Dung<sup>1\*</sup>, Nguyen Quynh Giang<sup>1</sup>, Trinh Thi Nguyet<sup>1</sup>, Cao Thi Hue<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hanoi University of Industry, 298 Cau Dien, Bac Tu Liem, Hanoi

<sup>2</sup>Thuyloi University, 175 Tay Son, Dong Da, Hanoi

### SUMMARY

Nowadays, the demand for non-dairy milk is increasing because of the growth of the demand for vegan products. Moreover, some people, who have lactose allergy, could use only plant-based milks. Therefore, this research aimed to develop a product that can replace dairy milk by using popular plant resources in Vietnam such as rice and bananas. It is a natural product without adding sweeteners or any other sugars. The main ingredients of this product are rice ST25, sticky rice, and banana fruit *Musa acuminata* AAA. From the results of the research, the optimal ratio of sticky rice and ST25 is 1:3, respectively. And the optimal ratio of rice and water is 1:3, respectively. With these ratios, the rice and banana-based milk had a sweet taste due to enzyme hydrolysis. For longer preservation, this research found the most suitable pasteurization condition heating the product at 85°C for 1 minute. This product can be stored in cooling condition for 7 days without changing the quality of the product. The non-dairy milk from rice and banana had an estimated energy level of 84,39 Kcal/100ml, which is a low-energy product, suitable for vegetarians. The product reached out of microbiological criteria for food safety and hygiene according to TCVN 12443:2018.

**Keywords:** Non-dairy milk, sticky rice, ST25 rice, banana, low-energy product.

\* Tác giả liên hệ: Tel: 0869172621; Email: dunght1@hau.edu.vn

## EFFECTS OF SUBSTITUTION OF HEAT-MOISTURE TREATED UNPOLISHED RED RICE ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF COMPOSITE FLOUR, *IN VITRO* DIGESTIBILITY AND QUALITY OF BREAD

Nguyen Thi Kieu Linh, Chau Minh Thuan, Mai Nguyen Tram Anh,  
Nguyen Ngoc Thanh Tien, Pham Van Hung

*Department of Food Technology, International University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

*Laboratory for Interdisciplinary Research and Analysis on Chemistry, Food and Environment, IU-VNU*

*Vietnam National University in Ho Chi Minh City, Vietnam*

### SUMMARY

Heat-moisture treatment (HMT) has been reported to increase an amount of resistant starch (RS) in rice flour, which plays an important role in enhancing nutritional values of unpolished red rice (URR) by reducing the risk of obesity and diabetes. This study was carried out to investigate changes in chemical compositions (ash, lipid, protein, and carbohydrate contents), physicochemical properties (pasting properties, swelling index, and water absorption) of composite flour, and *in vitro* digestibility, quality properties (specific volume, textural properties), and sensory evaluation of bread containing the unpolished red rice flour (URRF) after heat-moisture treating with 30% moisture content and 100°C. HMT did not cause significant changes in the chemical composition of URR. However, the heat-moisture treated unpolished red rice flour (HMTURRF) had slight decrease in the swelling index and increase in the water absorption, gently increase in pasting temperature and decrease in peak and final viscosities, setback, and breakdown as compared with the control one. In addition, quality properties of bread with substitution of the HMTURRF were significant changes with decrease in specific volume and springiness, increase in hardness and gumminess. Breads partially substituted with HMTURRF had a lower content of rapidly digestible starch (RDS) (57.06 – 63.99%) and a higher content of resistant starch (RS) (16.85 – 27.66%) compared to completely wheat-based ones (65.05% and 13.70%, respectively). The sensory evaluation had no notable changes in color, appearance, texture, odor, and flavor but there was a slight difference in the overall acceptability. As a result, HMTURRF can be substituted for 20% of wheat flour in producing low glycemic index (GI) breads.

*Keywords:* Heat-moisture treatment, low glycemic index, resistant starch, unpolished red rice.

### INTRODUCTION

Unpolished red rice (URR) is the whole red rice grain with an intact bran layer along with pericarp, seed coat, embryo, and endosperm. Red rice is a treasure of health because of the outer bran layer, in which there is a lot of fiber in the bran, germ, and endosperm. Red rice consumption can inhibit the proliferation of breast cancer cells (Ghasemzadeh *et al.*, 2018) and limit the invasiveness of cancer cells in a dose-dependent manner (Pintha *et al.*, 2014). The major component of rice is starch, which gives the main energy for human daily activity and efficient digestion of food. Compared to other rice, red rice gives the consumers a feeling of fullness, which helps consumers regulate their carbohydrate intake. As the main component in rice, starch digestibility is an important consideration in nutrition, especially in people whose background diseases such as diabetes, obesity, etc. The total starch content includes slowly digestible starch (SDS), rapidly digestibility starch (RDS), and resistance starch (RS). A low water content results in a slow digestibility of starch in bread, leading to lower blood glucose levels, thus preventing obesity, diabetes, and cardiovascular diseases (Martínez *et al.*, 2018). Heat-moisture treatment (HMT) is applied to improve the physical and functional characteristics of starch in high efficiency, safety, and environmental protection without rupturing the granular structure. The modification during HMT is discovered to be dependent on the kind of starch source, moisture level, incubation time, and temperature (Gunaratne *et al.*, 2018). The hydrothermal treatment improved rice starch's mechanical and thermal stability and encouraged link strengthening, resulting in a more stable structure (Arns *et al.*, 2015). The URR that has been treated with HMT has several health benefits, including lowering the risk of obesity and diabetes. Therefore, this study investigated the effects of different mixing ratios between heat-moisture treated URR and wheat flour on chemical composition and physicochemical properties of composite flour, *in vitro* digestibility, quality, and sensory of bread substituted with heat-moisture treated URR.

## MATERIAL AND METHODS

### Material

Unpolished red rice (*Oryza punctata*) was purchased from Ben Tre granary. It is grown at Cuu Long Delta and verified by National Institute for Food Control (3962/PKN – VKNQG). Dry baker's yeast (Mauripan, Vietnam) was purchased in Coop-mart supermarket. Alpha-amylase from *Asperillus niger* (28.75U/mg) and Amyglucosidase from *Aspergillus oryzae* (300U/ml) used in this study were purchased from Sigma – Aldric Co. (St. Louis, Mo, USA). Other chemicals were purchased from Merck Chemical Co.

### Methods

#### **Preparation of heat-moisture treated unpolished red rice flour (HMTURRF)**

The HMTURRF was prepared following the method of Hung *et al.*, (2020). The moisture content of the grains was adjusted to reach 30% before HMT by immersion of URR grains in cold distilled water (4°C) to avoid the growth of mold. The grains were collected and transferred into a glass flask after their moisture content reaches 30%. After equilibrium at 4°C for 24h, the grains were heated at 100°C for 6h and dried in the oven at 50°C to obtain 10 – 11% moisture content. Finally, the dried grains were ground into fine flour and stored until use.

#### **Composite flour preparation and bread-making**

The composite flours were prepared by carefully mixing the fine HMTURRF with wheat flour at different ratios. The dough preparation followed the method of Tien *et al.*, (2018). The composite flour (300g) was contained in a bowl with 18g of sugar, 4.5g of table salt, 6g of dry baker's yeasts, and 187.8mL of water. They were mixed well in a mixer for 15min and was put into a cabinet at 30°C for 90min for fermentation. The mixed dough was punched every 30min. The fermented dough was cut into unit pieces with a weight of 130g each. Each piece was blenched in 15min, then punched, rolled, placed in the pan, and proofed at 38°C for 33min. Afterward, the pans containing proofed dough were transferred into the oven and baked at 180°C for 20min. Finally, the bread was stored for further analysis.

#### **Determination of chemical composition of composite flour**

The proximate analysis of composite flour including moisture, ash, lipid, and protein contents was measured based on the AACC Approved Methods 44-01.01, 08-01.01, 30-10.01, 46-10.01, respectively. Total carbohydrate content was determined according to the equation: %Carbohydrate content<sub>db</sub> = 100% - [%moisture + %ash<sub>db</sub> + %protein<sub>db</sub> + %lipid<sub>db</sub>]

#### **Determination of pasting properties, swelling power, and water absorption of composite flour**

Pasting properties of composite flour were determined based on Tien *et al.*, (2018) by using a micro visco-amylograph (Brabender® GmbH & Co. KG, Germany). Swelling index was determined according to Hung *et al.* (2020). The flour was vortexed with 20 mL distilled water in 1 min and boiled in a water bath at 90°C with shaking of 200 rpm for 30 min. Then, the suspension was cooled under running tap water in 30s and 10 min in ice bath. The suspension was centrifuged at 4500×g for 10 min and equilibrated for 5 min at room temperature. The swelling index was calculated by dividing the mass of residue after centrifuge (g) and the mass of the flour sample (g). Water absorption of the composite flour was determined according to Hung *et al.*, (2020). Flour was vortexed with 40 mL distilled water in 10 min at ambient temperature and centrifuged at 1000×g for 15 min. The water absorption was calculated by dividing the mass of water existed in the remaining sample (g) and the mass of flour sample (g).

#### **Determination of in vitro digestibility of bread substituted with HMTURRF**

*In vitro* digestibility was determined following the method of Tien *et al.*, (2018). Samples were mixed with 20 mL of sodium acetate buffer (pH 6.0) and boiled in a water bath at 90°C for 30 min, put in the oven at 37°C for 15 min to equilibrate. After that, 5 mL enzyme solution of α-amylase (1,400 U/mL<sup>-1</sup>) and amyloglucosidase (13 AGU/mL<sup>-1</sup>) was added and incubated with shaking at 37°C. Next, 0.5 mL of hydrolysate was removed and determined for total glucose concentrations (G20 and G120, respectively) after 20 min and 120 min of incubation by using the phenol-sulfuric acid method. The remaining solution after hydrolysis after 120 min was digested with amyloglucosidase (50 U/mL<sup>-1</sup>) to determine the total glucose content release (TG). G20, G120, and TG were used to calculate the content of RDS, SDS, and RS.

#### **Determination of loaf volume**

Loaf volume, the ratio of the loaf volume was measured at 50 min after loaves were removed from the oven by using the rapeseed displacement method (Tien *et al.*, 2018).

#### **Determination of texture properties**

A cube slide (3×3×3 cm<sup>3</sup>) of bread was used to determine the firmness, springiness, and toughness by using Zwiit/Roell Textural analyzer following the method of Tien *et al.*, (2018). The textural analysis was set up at a

P30C cylinder probe (30 mm in diameter), 2 mm/s for all the speeds (pretest speed, test speed, post speed), and 50% compression distance.

### Sensory evaluation

The sensory evaluation of bread substituted with the HMTURRF was carried out according to the method of Inglett *et al.*, (2005). The color, odor, flavor, texture, appearance, and overall acceptability of bread were valued by 30 untrained panelists at the International University for the hedonic test. Each of them was served with four slides of different kinds of substituted bread and one cup of water. Each slice of bread was coded with a three-digit random number in a randomized and balanced order and assessed at room temperature. The panelists were asked to evaluate samples and indicate the degree of liking for the characteristics of the bread on the nine-point hedonic scale on a response sheet.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chemical composition of composite flour

Table 1. Chemical contents (% , dry basis) of composite flours

Sample	Protein	Lipid	Ash	Carbohydrate
C0	13.85±0.06 <sup>a</sup>	1.94±0.03 <sup>a</sup>	0.49±0.02 <sup>c</sup>	70.41±0.12 <sup>d</sup>
C10	13.37±0.15 <sup>b</sup>	1.92±0.03 <sup>a</sup>	0.53±0.02 <sup>c</sup>	71.70±0.19 <sup>c</sup>
C20	12.89±0.12 <sup>c</sup>	1.89±0.03 <sup>a</sup>	0.57±0.01 <sup>b</sup>	72.69±0.08 <sup>b</sup>
C30	12.42±0.06 <sup>d</sup>	1.86±0.06 <sup>a</sup>	0.67±0.01 <sup>a</sup>	73.62±0.22 <sup>a</sup>

C0, wheat flour; C10, 90% wheat flour and 10% HMTURRF; C20, 80% wheat flour and 20% HMTURRF; C30, 70% wheat flour and 30% HMTURRF. Data followed by the same superscript letter in the same column are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

The effect of HMT on chemical composition of wheat flour and treated URR flour at different ratios are presented in Table 1. Significant differences were observed in protein and carbohydrate contents between the control sample and treated samples. The protein contents of treated samples were notably reduced in comparison with untreated sample. The moisture and protein contents of treated samples decreased from the lowest HMTURRF substitution to the highest HMTURRF substitution. The lipid content was also decreased following the higher percentage of HMTURRF but not remarkable. In comparison with ash content of 100% wheat flour sample (0.49% ash), that of C10 slightly increased (0.53%), while those of C20 and C30 significantly increased (0.57% and 0.67%, respectively). The carbohydrate content significantly increased with increasing the substitution concentration. According to the research of Hung *et al.* (2020), the macronutrient concentrations of URR were 9.11% protein content, 1.83% lipid content, 1.59% ash content, and 87.5% carbohydrate content, it means the protein, lipid contents of URR were lower than that of wheat flour, while ash and carbohydrate contents of URR were higher than that of wheat flour.

### Pasting properties, swelling power, and water absorption of composite flour

Table 2. Pasting properties of composite flour

Parameters	C0	C10	C20	C30
Pasting temperature [°C]	60.97±0.31 <sup>c</sup>	61.87±0.21 <sup>bc</sup>	62.8±0.1 <sup>ab</sup>	63.13±0.81 <sup>a</sup>
Peak viscosity [BU]	837±10.69 <sup>a</sup>	745±27 <sup>b</sup>	679±2.08 <sup>c</sup>	604±6.03 <sup>d</sup>
Final viscosity [BU]	1054±8.62 <sup>a</sup>	935±17.8 <sup>b</sup>	839±21.5 <sup>c</sup>	801±18 <sup>c</sup>
Breakdown [BU]	394±13.86 <sup>a</sup>	287±27.7 <sup>b</sup>	206±7.57 <sup>c</sup>	89±4 <sup>d</sup>
Setback [BU]	435±8.19 <sup>a</sup>	431±9.08 <sup>a</sup>	420±2.52 <sup>a</sup>	415±11.53 <sup>a</sup>
Swelling index [g/g]	5.31±0.11 <sup>a</sup>	4.86±0.33 <sup>ab</sup>	4.67±0.24 <sup>b</sup>	4.65±0.14 <sup>b</sup>
Water absorption capacity [g/g]	0.85±0.03 <sup>b</sup>	0.91±0.02 <sup>b</sup>	1.03±0.01 <sup>a</sup>	1.08±0.03 <sup>a</sup>

C0, wheat flour; C10, 90% wheat flour and 10% HMTURRF; C20, 80% wheat flour and 20% HMTURRF; C30, 70% wheat flour and 30% HMTURRF. Data followed by the same superscript letter in the same row are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

The physicochemical properties including pasting properties, swelling power, and water absorption of the composite flours with different ratios of wheat flour and HMTURRF are given in Table 2. HMT induced notable differences in some pasting properties of flour of rice grain and has also been proven by some previous research. While breakdown, peak viscosity, and final viscosity considerably reduced with increasing the ratio of HMTURRF, the value of pasting temperature of the composite flour significantly increased. There was no notable decrease in the setback of four samples. The final viscosity values differences were significant between all samples, except

C20 and C30. Regarding swelling index and water absorption, HMT was proved to cause a reduction in swelling power (Hung *et al.*, 2020), and the water absorption index of untreated flour was lower in comparison with HMT flour. The higher substituted HMTURRF flour needs a higher temperature to start gelatinization, thus it took a long time to gelatinize. In contrast with swelling index, the higher modified samples had the higher water absorption capacity values. Amylose was reported to have a stronger ability to bind water than native starch by Thilagavathi (2015). Overall, in this study, HMT affected pasting temperature, peak viscosity, final viscosity, breakdown, swelling index, and water absorption capacity, but not for setback. Therefore, the higher HMTURRF substitution took a higher temperature to start gelatinization, had lower paste strength, lower potential to form a gel after processing, and higher heating and shear stress resistance. The gel stability and retrogradation potential did not considerably reduce under HMT.

### *In vitro* digestibility of bread loaves

**Table 3. Starch fraction (RDS, SDS, RS) of breads made from composite flours**

Sample	Starch fraction (% w/w, db)		
	RDS	SDS	RS
B0	65.05±0.61 <sup>a</sup>	21.25±0.54 <sup>a</sup>	13.70±0.40 <sup>d</sup>
B10	63.99±0.81 <sup>a</sup>	19.16±0.42 <sup>b</sup>	16.85±0.83 <sup>c</sup>
B20	58.56±1.26 <sup>b</sup>	17.91±0.58 <sup>b</sup>	23.53±0.68 <sup>b</sup>
B30	57.06±0.72 <sup>b</sup>	15.28±0.38 <sup>c</sup>	27.66±0.39 <sup>a</sup>

B0, 100% wheat flour bread; B10, 90% wheat flour and 10% HMTURRF bread; B20, 80% wheat flour and 20% HMTURRF bread; B30, 70% wheat flour and 30% HMTURRF bread. RDS, rapidly digestible starch; SDS, slowly digestible starch; RS, resistant starch. Data followed by the same superscript letter in the same column are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

The amounts of RDS, SDS, and RS of breads made from different ratios of composite flours are shown in Table 3. B0, which was made from 100% wheat flour, had the highest RDS. SDS value of B0 was also significantly higher than SDS values of the bread samples substituted with HMTURRF. RS was the only one that significantly increased in each sample with higher amount of HMTURRF substitution (13.7%, 16.85%, 23.53%, and 27.66% w/w for B0, B10, B20, and B30, respectively). In the research of Tien *et al.* (2018), the RDS and SDS of bread made from composite flour, which had HMT, also went down and rose up for RS value in comparison with the bread made from 100% wheat flour. Similar results were reported by Hung *et al.* (2020) for URR grains. The rise in thermo-stable RS indicated the connections between wheat starch and proteins or lipids or both developed during HMT, thus partially limiting the accessibility of starch chains to be hydrolyzed by enzymes (Chung *et al.*, 2009).

### Specific volume and textural properties bread loaves

**Table 4. Specific volume and textural properties of breads made from wheat and composite flours**

Sample	Specific volume [cm <sup>3</sup> /g]	Textural properties		
		Hardness [N]	Springiness [mm]	Gumminess [N]
B0	5.25±0.08 <sup>a</sup>	2.94±0.07 <sup>c</sup>	12.43±0.56 <sup>a</sup>	1.88±0.01 <sup>d</sup>
B10	4.55±0.09 <sup>b</sup>	5.13±0.17 <sup>b</sup>	11.66±0.48 <sup>ab</sup>	2.46±0.11 <sup>c</sup>
B20	3.82±0.10 <sup>c</sup>	6.80±0.27 <sup>b</sup>	11.12±0.09 <sup>b</sup>	4.41±0.17 <sup>b</sup>
B30	2.81±0.14 <sup>d</sup>	31.42±1.53 <sup>a</sup>	10.67±0.28 <sup>b</sup>	5.52±0.12 <sup>a</sup>

B0, 100% wheat flour bread; B10, 90% wheat flour and 10% HMTURRF bread; B20, 80% wheat flour and 20% HMTURRF bread; B30, 70% wheat flour and 30% HMTURRF bread. Data followed by the same superscript letter in the same column are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

Table 4 shows the results of the specific volume of bread loaves made from composite flour between wheat flour and HMTURRF. The values decreased notably depending on the ratios of substituted HMTURRF in bread. The reduction of specific volume was caused by the dilution of gluten content in substitution of composite flour, which leads to reduced elasticity and extensibility (Hung *et al.*, 2020). The hardness, springiness, and gumminess values in textural properties of bread loaves determined by ZWIT/ROELL Textural analyzer were also illustrated in Table 4. The hardness value of B0 was 2.94 N, significantly lower than treated samples. The hardness of bread was significantly increased along with increasing the HMTURRF ratio. According to Hung *et al.*, (2020), the greater proportions of short-chain molecules and solubilized amylose in these starches easily degraded after baking caused the increase in the hardness of breadcrumb with the substitution of the HMTURRF. Regarding springiness, B0 had the highest value (12.43 mm). There was no significantly different in the group substituted with treated bread. Additionally, there were significant increases in the gumminess results of four samples. It

means that that HMT not only made the breadcrumbs harder but also demanded more energy to swallow them before they reached a stable condition for consumption, reduced the physically springs back after the bread had been deformed during the first compression.

### Evaluation of sensory profile of bread samples

Table 5. Mean sensory score of breads

Sensory attribute	B0	B10	B20	B30
Color	7.30 ± 0.16 <sup>a</sup>	6.87 ± 0.14 <sup>a</sup>	7.27 ± 0.14 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.15 <sup>a</sup>
Appearance	7.47 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.20 ± 0.14 <sup>a</sup>	7.67 ± 0.09 <sup>a</sup>	7.07 ± 0.13 <sup>a</sup>
Texture	7.33 ± 0.13 <sup>a</sup>	7.13 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.40 ± 0.12 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.14 <sup>a</sup>
Odor	7.10 ± 0.15 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.08 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.10 ± 0.14 <sup>a</sup>
Flavor	6.73 ± 0.11 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.14 <sup>a</sup>	6.93 ± 0.11 <sup>a</sup>	6.43 ± 0.15 <sup>a</sup>
Overall Acceptability	7.20 ± 0.1 <sup>ab</sup>	7.13 ± 0.07 <sup>ab</sup>	7.50 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.67 ± 0.14 <sup>b</sup>

B0, 100% wheat flour bread; B10, 90% wheat flour and 10% HMTURRF bread; B20, 80% wheat flour and 20% HMTURRF bread; B30, 70% wheat flour and 30% HMTURRF bread. Data followed by the same superscript letter in the same row are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

The evaluation of bread substitution at different ratios between wheat flour and HMTURRF was illustrated in Table 5. It shows that there were no significant differences in all samples in color, appearance, texture, odor, and flavor tests. In the overall acceptability, the bread with 20% substituted HMTURRF, which was the highest in rating (7.50 point), was not significantly different from the second rating sample which 100% bread made from wheat flour (B0 with 7.20 point) and the third rating bread with 10% substitution of HMTURRF (B10 with 7.13 point).

### CONCLUSION

In conclusion, 30% moisture and 100°C of HMT application on URR caused significant differences in pasting properties, swelling index, and water absorption capacity of composite flour between wheat flour and HMTURRF at different ratios. Starch fraction and quality of bread substituted with different ratios of HMTURRF and wheat flour were also considerably changed, which were the increase of RS contents and decrease of RDS contents. As a result, the bread with 20% substituted HMTURRF could be produced industrially and commercially. This research may be a premise for further research to develop nutritional products that apply HMT with certain conditions to not only increase resistant starch but also keep the constant quality of other components.

**Acknowledgements:** This research is funded by Vietnam National University in Ho Chi Minh City (VNU-HCM) under grant number A2024-28-02.

### REFERENCE

- Arns B, Bartz J, Radunz M, do Evangelho JA, Pinto VZ, da Rosa Zavareze E, & Dias ARG (2015). Impact of heat-moisture treatment on rice starch, applied directly in grain paddy rice or in isolated starch. *LWT-Food Sci Technol*, 60(2), 708-713.
- Chung HJ, Liu Q, & Hoover R (2009). Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. *Carbohydr Polym*, 75(3), 436-447.
- Ghasemzadeh A, Karbalaii MT, Jaafar HZ, & Rahmat A (2018). Phytochemical constituents, antioxidant activity, and antiproliferative properties of black, red, and brown rice bran. *Chem Cent J*, 12(1), 1-13.
- Gunaratne A, Gan R, Wu K, Kong X, Collado L, Arachchi LV, Kumara K, Pathirana SM, Corke H (2018). Physicochemical properties of mung bean starches isolated from four varieties grown in Sri Lanka. *Starch-Stärke*, 70(3-4), 1700129.
- Hung P, Binh VT, Nhi PHY, & Phi NTL (2020). Effect of heat-moisture treatment of unpolished red rice on its starch properties and in vitro and in vivo digestibility. *Int J Biol Macromol*, 154, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.071>
- Inglett GE, Peterson SC, Carriere CJ, & Maneepun S (2005). Rheological, textural, and sensory properties of Asian noodles containing an oat cereal hydrocolloid. *Food Chem*, 90(1-2), 1-8.
- Martínez MM, Román L, & Gómez M (2018). Implications of hydration depletion in the in vitro starch digestibility of white bread crumb and crust. *Food Chem*, 239, 295-303.
- Pintha K, Yodkeeree S, Pitchakarn P, & Limtrakul P (2014). Anti-invasive activity against cancer cells of phytochemicals in red jasmine rice (*Oryza sativa* L.). *Asian Pac J Cancer P*, 15(11), 4601-4607.
- Thilagavathi T, Banumathi P, Kanchana S, & Ilamaram M (2015). Effect of heat moisture treatment on functional and phytochemical properties of native and modified millet flours. *Plant Arch*, 15(1), 15-20.
- Tien NNT, Anh TNQ, Phi NTL, & Hung PV (2018). In vitro and in vivo starch digestibility and quality of bread substituted with acid and heat-moisture treated sweet potato starch. *Starch-Stärke*, 70(9-10), 1800069.

## NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC BỔ SUNG GẠO LỨT ĐỎ ĐƯỢC XỬ LÝ NHIỆT-ẨM ĐẾN TÍNH CHẤT LÝ-HÓA CỦA BỘT, KHẢ NĂNG TIÊU HÓA *IN VITRO* VÀ CHẤT LƯỢNG BÁNH MÌ

Nguyễn Thị Kiều Linh, Châu Minh Thuận, Mai Nguyễn Trâm Anh,  
Nguyễn Ngọc Thanh Tiên, Phạm Văn Hùng

*Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam  
Phòng Thí nghiệm Phân tích và Nghiên cứu liên ngành Hóa, Thực phẩm và Môi trường, Trường Đại học Quốc tế  
Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*

### TÓM TẮT

Xử lý nhiệt-ẩm được biết có khả năng làm tăng thành phần tinh bột kháng (RS) của gạo, đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao giá trị dinh dưỡng của gạo lứt đỏ (URR) nhằm giảm nguy cơ béo phì và tiểu đường. Nghiên cứu này được thực hiện để khảo sát sự biến đổi của các thành phần hóa học (hàm lượng tro, hàm lượng lipid, hàm lượng protein, và hàm lượng carbohydrate), tính chất lý-hóa (đặc tính hồ hóa, độ trương nở, độ hấp thụ nước) của bột phối trộn, khả năng tiêu hóa *in vitro*, chất lượng sản phẩm (thể tích, kết cấu) và đánh giá cảm quan của bánh mì có chứa bột gạo lứt đỏ sau khi xử lý nhiệt-ẩm với độ ẩm 30% và 100°C. Xử lý nhiệt-ẩm không gây ra những thay đổi đáng kể trong thành phần hóa học của URR. Tuy nhiên, có sự khác biệt đáng kể về tính chất lý-hóa của bột (độ trương nở giảm nhẹ và độ hấp thụ nước tăng), đặc tính hồ hóa (nhiệt độ hồ hóa tăng, giảm độ nhớt cực đại, độ nhớt cuối cùng, độ nhớt giảm, và độ nhớt rung) so với mẫu đối chứng. Ngoài ra, chất lượng của bánh mì có bổ sung bột gạo lứt đỏ đã được xử lý nhiệt-ẩm (HMTURRF) cũng có những thay đổi đáng kể như thể tích và độ đàn hồi giảm xuống, trong khi độ cứng và độ dẻo tăng lên. Bánh mì được thay thế một phần bằng HMTURRF có hàm lượng tinh bột tiêu hóa nhanh (RDS) thấp hơn (57.06 – 63.99%) và hàm lượng tinh bột kháng (RS) cao hơn (16.85 – 27.66%) so với các loại bánh làm hoàn toàn từ lúa mì (lần lượt là 65.05% và 13.70%). Màu sắc, hình thức, kết cấu, mùi và hương vị không có sự khác biệt đáng kể khi khảo sát đánh giá cảm quan, nhưng có một chút khác biệt về mức độ chấp nhận chung. Kết quả cho thấy, bột gạo lứt đỏ sau khi xử lý nhiệt-ẩm có thể thay thế 20% bột mì trong sản xuất sản phẩm bánh mì sinh đường thấp.

*Từ khóa:* Gạo lứt đỏ, tinh bột kháng tiêu hóa, sản phẩm sinh đường thấp, xử lý nhiệt-ẩm.

# PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COMPOSITE FLOUR AND QUALITY OF BREAD SUPPLEMENTED WITH HEAT-MOISTURE TREATED MUNG BEAN POWDER

Nguyen Thi Cam Nhi, Nguyen Ngoc Thanh Tien, Mai Nguyen Tram Anh, Chau Minh Thuan, Pham Van Hung

*Department of Food Technology, International University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

*Laboratory for Interdisciplinary Research and Analysis on Chemistry, Food and Environment, IU-VNU*

*Vietnam National University in Ho Chi Minh City, Vietnam*

## SUMMARY

This study aimed to develop wheat-based bread supplemented with heat-moisture treated mung bean powder and to measure the physicochemical properties of the composite flour and bread quality. The addition of modified mung bean powder increased the gelatinization temperature but reduced other pasting properties, swelling index, and solubility. Bread supplemented with modified mung bean powder exhibited a darker color, smaller size, and higher hardness value. Along with the additional increments of the heat-moisture treated mung bean powder into dough, these substituted breads contained lower amounts of rapidly digestible starch (56.39-63.32%) and higher concentrations of resistant starch (17.18-27.00%) as compared to those of wheat-based one (65.38% and 13.32% respectively). Thus, the heat-moisture treated mung bean powder, containing high resistant starch content, potentially reduced the amount of rapidly digestible starch and increased the percentage of resistant starch in the final product. Although the organoleptic profiles of the substituted bread were scored lower than those of the control bread, the composite bread made from 90% wheat flour and 10% heat-moisture treated mung bean powder achieved the highest overall acceptability among the three substituted breads. As a result, this product could be recognized as a "low-carb" bread beneficial for human health.

*Keywords:* Bread quality, digestibility, heat-moisture treatment, low-carb bread, mung bean powder, physicochemical properties.

## INTRODUCTION

Mung bean (*Vigna radiata*) is a highly-consumed legume crop, grown extensively from the lowlands to the mountainous regions in numerous Asian countries (Hou *et al.*, 2019). It is valued for its nutritional content, providing a well-balanced source of protein, amino acids, dietary fiber, minerals, vitamins, and a significant number of bioactive compounds (Gan *et al.*, 2017). Mung bean is also a key source of resistant starch (RS) in human diets (Duyen *et al.*, 2020), as starch accounts for over half of the mung bean's total weight, with amylose making up about 40% of the total starch. Studies have shown that heat-moisture treatment can significantly enhance the RS content in mung beans (Li, Gao, 2010). These modified mung beans can be eaten directly as seeds, sprouts, or in various processed forms. They are commonly used in soups, congee, and to improve the nutritional value of noodles, confectionery, and various snacks (Hou *et al.*, 2019). Using affordable staples like mung bean to supplement wheat flour (WF) can boost the nutritional quality of wheat-based products.

Wheat-based foods, such as bread, contain large amounts of quickly digestible starch, causing an undesirable spike in blood sugar levels after eating (Tien *et al.*, 2018). Therefore, there is a growing interest in developing carbohydrate-rich foods that are healthier for consumers while maintaining the quality of the bread. According to Hung *et al.* (2014), adding fiber often leads to lower quality bread, with reduced loaf volume, firmer crumb, and darker appearance compared to bread made from white flour. In contrast, RS provides health benefits similar to dietary fiber and improves the physicochemical properties of food during processing (Tien *et al.*, 2018). Replacing WF study tackled this issue by incorporating heat-moisture treated mung bean powder into bread dough, substituting 10%, 20%, and 30% of the WF. The study also examined the physicochemical properties of the composite flour and the quality of the bread.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Mung bean (DX208, SSC, Vietnam), all-purpose wheat flour (Meizan, Vietnam), refined sugar (Bien Hoa, Vietnam), salt (Thanh Phat, Vietnam), and instant dry yeast (Mauripan, Vietnam) were purchased in Coop-mart supermarket.



Enzymes including  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* (30 U/mg) and amyloglucosidase from *Aspergillus oryzae* (300 U/mL), and other chemicals were supplied by Sigma-Aldrich Company (St. Louis, Mo, USA).

## Methods

### Preparation of heat-moisture treated mung bean powder

Heat-moisture treated mung bean powder (HMT-MBP) was produced based on the modified method of Li and Gao (2010). Mung bean seeds were dehulled after being soaked in distilled water at room temperature for 3 hours, dried in an oven at 50°C for 24 hours, milled, and then sieved through 250-mesh into fine powder. The obtained powder was mixed well with water to achieve moisture levels of 30%, stabilized at room temperature for 24 hours, heated at 100°C for 6 hours, dried at 50°C to the uniform moisture content of 10%, milled, and then sieved through 250-mesh. The final product, HMT-MBP, was collected for the preparation of composite flour and the bread-making procedure.

### Preparation of composite flour and baking process

HMT-MBP was utilized to substitute WF at diverse concentrations to formulate the composite flour for baking bread. These replacement levels of HMT-MBP consisted of 10% (10MBF), 20% (20MBF), and 30% (30MBF). Additionally, bread using 100% WF was designated as WFB, while 10MBB, 20MBB, and 30MBB indicated bread prepared from 10MBF, 20MBF, and 30MBF, respectively.

All ingredients including 100 g of the composite flour of WF and HMT-MBP, 6 g of sugar, 1.5 g of salt, 2 g of yeast, and 62.6 mL of water were mixed well to form a dough, which was fermented at 30°C with a relative humidity of 85% for 90 minutes and a requirement of kneading every 30 minutes. The fermented output was divided into several small pieces, which were molded, later proofed at 38°C for 33 minutes with the relative humidity of 90 minutes, shaped, and finally baking oven at 180°C for 20 min. The final products, breads, were packed in plastic containers and further analysed.

### Physicochemical properties of composite flour

A micro visco-amylograph (Brabender GmbH & Co. KG, Germany) was applied to evaluate the pasting properties of composite flour according to the procedure described by Tien et al. (2019). The data was automatically recorded and expressed as gelatinization temperature (GT), maximum viscosity (MV), trough viscosity (TV), final viscosity (FV), breakdown (BD), and setback (SB). Furthermore, swelling and water solubility indexes of composite flour were measured based on the method described by Tien et al. (2019).

### Quality of bread

The *in vitro* digestibility of bread was manipulated based on the method of Tien et al. (2019) and expressed as rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS), and resistant starch (RS). In this assay, the combination of  $\alpha$ -amylase (1400 U/mL) and amyloglucosidase (13 AGU/mL) was first employed, and amyloglucosidase (50 AGU/mL) was then applied to hydrolyze to release glucose.

The color attributes of bread crumb and crust were identified using the Chroma meter PCE-CRM 40 and exhibited as L\*, a\*, and b\* values. The rapeseed displacement approach was conducted to estimate the volume of bread. The textural properties including hardness, springiness, and gumminess of breads were determined by a textural analyzer according to the operating conditions instructed by Tien et al. (2019). A five-point hedonic rating scale was performed by 30 untrained panelists, which was used to score breads in terms of color, appearance, texture, odor, flavor, and overall acceptability.

### Statistical analysis

All measurements were manipulated in triplicates. One way analysis of variance with Tukey's multiple-range test to compare the averages of results at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### Physicochemical properties of composite flour

Table 1. Physicochemical properties of composite flour

Samples	GT	MV	TV	FV	BD	SB	Swelling index (g/g)	Solubility (g/g)
WF	57.57 $\pm$ 1.19 <sup>c</sup>	964 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	950 $\pm$ 25 <sup>a</sup>	1050 $\pm$ 56 <sup>a</sup>	418 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	413 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	6.49 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	4.65 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>
10MBF	59.77 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	916 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	846 $\pm$ 44 <sup>b</sup>	965 $\pm$ 16 <sup>ab</sup>	380 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	352 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	5.57 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	3.64 $\pm$ 0.58 <sup>ab</sup>
20MBF	62.23 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	876 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	742 $\pm$ 32 <sup>c</sup>	911 $\pm$ 69 <sup>b</sup>	357 $\pm$ 6 <sup>bc</sup>	328 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	5.17 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	2.66 $\pm$ 0.59 <sup>bc</sup>
30MBF	63.5 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	773 $\pm$ 41 <sup>b</sup>	632 $\pm$ 13 <sup>d</sup>	782 $\pm$ 19 <sup>c</sup>	329 $\pm$ 13 <sup>c</sup>	311 $\pm$ 8 <sup>c</sup>	4.78 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>	1.34 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>

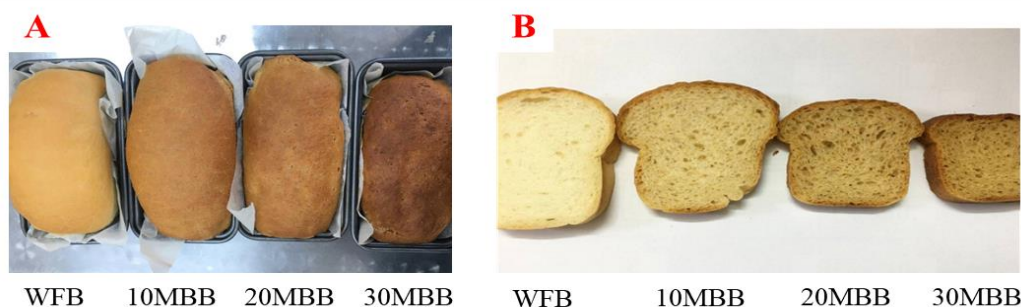
<sup>1</sup>HMT-MBP, Heat-moisture treated mung bean powder; WF, wheat flour; 10MBF, composite flour prepared from 90% WF and 10% of HMT-MBP; 20MBF, composite flour prepared from 80% WF and 20% of HMT-MBP; 30MBF, composite flour prepared from 70% WF and 30% of HMT-MBP.

<sup>2</sup>GT, gelatinization temperature (°C); MV, maximum viscosity (BU); TV, trough viscosity (BU); FV, final viscosity (BU); BD, breakdown (BU); SB, setback (BU).

<sup>3</sup>Data followed by the same superscript letter in the same column was not significantly different ( $p > 0.05$ ).

The physicochemical properties of the composite flours are shown in Table 1. The gelatinization temperature (GT) of the bread increased with higher levels of HMT-MBP substitution, while other pasting properties, the swelling index, and solubility decreased. This outcome can be attributed to differences in protein and amylose content. Protein denaturation and starch crystallization occur during heat-moisture treatment and baking, leading to the formation of protein-starch complexes. The more these complexes are formed, the less free starch remains, resulting in a higher pasting temperature. Additionally, the lower maximum and final viscosities of the composite flours are mainly due to reduced swelling and collapsing of the short-chain molecules in mung bean flour created during heat-moisture treatment (Tien *et al.*, 2019). The decrease in the swelling index of the composite flours could be due to the rearrangement of starch crystallites, the formation of amylose-amylopectin complexes, and the effective acceleration of molecular rearrangement and formation of starch-lipid complexes after treatment. Furthermore, the reduction in solubility of the composite flours might be due to the internal rearrangement of granular starch structures, the generation of amylopectin branches, and the presence of amylose-lipid complexes (Zavareze, Dias, 2011).

**Physical characteristics of bread**



**Figure 1. Photograph (A) and cross-sectional image (B) of substituted bread**

<sup>1</sup>WFB, bread made from WF; 10MBB, composite bread made from 10MBF; 20MBB, composite bread made from 20MBF; 30MBB, composite bread made from 30MBF; Abbreviations of 10MBF, 20MBF, and 30MBF are the same as in Table 1.

Figure 1 shows the appearance and cross-sectional view of the substituted bread, while Table 2 presents the color attributes of the crust and crumb. The shape of all substituted breads was similar to WFB, but they exhibited a rougher surface and darker crust and crumb color. The intensity of roughness and color increased with higher levels of HMT-MBP substitution. These results were consistent with the decreased L\* values and increased a\* and b\* values of the crust and crumb shown in Table 2. The darker color of the bread supplemented with HMT-MBP can be attributed to the high protein content of mung bean. Higher protein and starch levels in the recipe increase the likelihood of melanoidin formation through the Maillard reaction, resulting in a darker brown color.

**Table 2. Color attributes of crust and crumb bread**

Samples	Crust			Crumb		
	L	a	b	L	a	b
WFB	46.96 ± 1.61 <sup>a</sup>	44.37 ± 2.64 <sup>a</sup>	25.01 ± 1.31 <sup>a</sup>	50.92 ± 0.12 <sup>a</sup>	15.69 ± 4.47 <sup>c</sup>	11.88 ± 2.52 <sup>d</sup>
10MBB	36.80 ± 1.60 <sup>b</sup>	53.99 ± 7.32 <sup>a</sup>	36.76 ± 2.27 <sup>b</sup>	46.25 ± 1.16 <sup>b</sup>	28.65 ± 2.63 <sup>b</sup>	27.00 ± 0.26 <sup>c</sup>
20MBB	31.10 ± 0.96 <sup>c</sup>	53.99 ± 7.32 <sup>ab</sup>	43.21 ± 2.76 <sup>c</sup>	39.20 ± 1.00 <sup>c</sup>	38.52 ± 2.06 <sup>a</sup>	33.21 ± 2.92 <sup>b</sup>
30MBB	29.43 ± 0.13 <sup>c</sup>	64.64 ± 2.16 <sup>b</sup>	60.53 ± 1.46 <sup>d</sup>	39.10 ± 1.93 <sup>c</sup>	40.25 ± 0.78 <sup>a</sup>	40.00 ± 2.25 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Abbreviations are the same as in Figure 1.

<sup>2</sup>Data followed by the same superscript letter in the same column was not significantly different ( $p > 0.05$ ).

The volume of the substituted bread is shown in Table 3. The substitution of HMT-MBP significantly reduced the bread's volume. This finding is consistent with Figure 1B, where the bread size decreased with higher concentrations of HMT-MBP added to WF. The reduction in bread volume can be attributed to the lack of gluten in

HMT-MBP. Previous research has confirmed that the reduced elasticity and lower extensibility of the dough are due to the decreased gluten content in the composite flour (Tien *et al.*, 2018).

**Table 3. Volume and textural properties of substituted bread**

Samples	Volume (cm <sup>3</sup> )	Textural properties		
		Hardness (N)	Stringiness (mm)	Gumminess (N)
WFB	827.9 ± 2.6 <sup>a</sup>	2.88 ± 0.03 <sup>d</sup>	15.23 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.03 <sup>d</sup>
10MBB	751.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	6.47 ± 0.36 <sup>c</sup>	13.87 ± 0.34 <sup>b</sup>	2.54 ± 0.27 <sup>c</sup>
20MBB	642.4 ± 2.3 <sup>c</sup>	7.80 ± 0.78 <sup>b</sup>	12.82 ± 0.13 <sup>c</sup>	3.23 ± 0.32 <sup>b</sup>
30MBB	499.5 ± 2.5 <sup>d</sup>	13.11 ± 0.68 <sup>a</sup>	10.97 ± 0.32 <sup>d</sup>	5.35 ± 0.17 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Abbreviations are the same as in Figure 1.

<sup>2</sup>Data followed by the same superscript letter in the same column was not significantly different ( $p > 0.05$ ).

Table 3 also presents the textural properties of the substituted bread, including hardness, springiness, and gumminess. The addition of HMT-MBP significantly increased the hardness and gumminess of the bread while reducing the springiness. These results are consistent with previous research described by Tien *et al.*, (2018). The changes in the textural properties of the bread can be explained by gluten-starch interactions and starch retrogradation. Solubilized amylose and short-chain molecules in HMT-MBP retrograde more easily during the baking and cooling process, leading to increased stiffness and hardness (Tien *et al.*, 2018). Additionally, the gel formed by short-chain molecules leached from heat-moisture treated starch is stronger than the amylose leached from wheat starch, resulting in higher gumminess.

#### ***In vitro* digestibility of bread**

**Table 4. *In vitro* digestibility of substituted bread**

Samples	RDS	SDS	RS
WFB	65.38 ± 0.77 <sup>a</sup>	21.92 ± 0.67 <sup>a</sup>	13.32 ± 0.81 <sup>d</sup>
10MBB	63.32 ± 1.29 <sup>a</sup>	17.19 ± 0.24 <sup>b</sup>	17.18 ± 0.64 <sup>c</sup>
20MBB	59.23 ± 0.59 <sup>b</sup>	17.58 ± 0.26 <sup>b</sup>	23.86 ± 0.35 <sup>b</sup>
30MBB	56.39 ± 1.27 <sup>b</sup>	14.61 ± 0.90 <sup>c</sup>	27.00 ± 0.53 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Abbreviations are the same as in Figure 1.

<sup>2</sup>RDS, rapidly digestible starch; SDS, slowly digestible starch; RS, resistant starch.

<sup>3</sup>Data followed by the same superscript letter in the same column was not significantly different ( $p > 0.05$ ).

*In vitro* digestibility of substituted bread is expressed as concentrations of RDS, SDS, and RS and is demonstrated in Table 4. Along with rising substituted levels of HMT-MBP, RS content of substituted bread improved significantly, and the percentages of RDS and SDS reduced remarkably. The result was consistent with previous studies. The suitable explanation for the above results could be due to the high RS content of HMT-MBP. Li and Gao (2010) confirmed that heat-moisture treatment favorably improved the amount of RS in mung bean flour. Thus, the more HMT-MBP was added to dough, the higher the RS content existed in substituted bread. Furthermore, some amylose and short-chain molecules of wheat and mung bean starch were able to re-associate and then gelatinize during baking and retrograde afterward, resulting in the newly formed RS in bread (Hung *et al.*, 2005).

The *in vitro* digestibility of the substituted bread, expressed as concentrations of rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS), and resistant starch (RS), is shown in Table 4. As the levels of HMT-MBP increased, the RS content in the substituted bread significantly improved, while the percentages of RDS and SDS markedly decreased. This result aligns with previous studies. The likely explanation for these findings is the high RS content in HMT-MBP. Li and Gao (2010) confirmed that heat-moisture treatment significantly increases the RS content in mung bean flour. Therefore, the more HMT-MBP added to the dough, the higher the RS content in the substituted bread. Additionally, some amylose and short-chain molecules from wheat and mung bean starch can re-associate, gelatinize during baking, and retrograde afterward, leading to newly formed RS in the bread (Hung *et al.*, 2005).

**Organoleptic profiles of bread**

**Table 5. Organoleptic profiles of substituted bread**

Samples	Appearance	Color	Aroma	Taste	Texture	Overall acceptability
WFB	4.37 ± 0.62 <sup>a</sup>	4.67 ± 0.48 <sup>a</sup>	4.73 ± 0.45 <sup>a</sup>	4.67 ± 0.61 <sup>a</sup>	4.70 ± 0.47 <sup>a</sup>	4.50 ± 0.57 <sup>a</sup>
10MBB	3.53 ± 0.78 <sup>b</sup>	3.77 ± 0.68 <sup>b</sup>	3.13 ± 1.01 <sup>b</sup>	4.20 ± 0.85 <sup>a</sup>	4.70 ± 0.47 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.63 <sup>b</sup>
20MBB	4.50 ± 0.57 <sup>a</sup>	4.37 ± 0.72 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.88 <sup>b</sup>	3.13 ± 0.94 <sup>b</sup>	3.50 ± 1.28 <sup>b</sup>	3.23 ± 0.63 <sup>bc</sup>
30MBB	2.63 ± 0.56 <sup>c</sup>	3.50 ± 0.68 <sup>b</sup>	2.63 ± 0.85 <sup>b</sup>	2.20 ± 0.76 <sup>c</sup>	2.37 ± 0.77 <sup>c</sup>	2.90 ± 0.80 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Abbreviations are the same as in Figure 1.

<sup>2</sup>Data followed by the same superscript letter in the same column was not significantly different ( $p > 0.05$ ).

The organoleptic profiles of the substituted bread are shown in Table 5. WFB received high ratings, with an average score of over 4.5 out of 5 for all sensory attributes, except for appearance, which scored 4.37. The substitution of HMT-MBP significantly reduced the scores for all sensory attributes of the substituted bread. Although 20MBB had lower scores for aroma, taste, and texture compared to 10MBB, its appearance and color were rated higher among the three substituted breads. Consequently, the overall acceptability of 20MBB, while lower than that of WFB, was not statistically different from 10MBB.

**CONCLUSION**

HMT-MBP was successfully produced and mixed with WF to create various concentrations of composite flour for bread-making. The mixture of WF and HMT-MBP had higher gelatinization temperatures compared to WF alone, but lower values for other pasting properties, swelling index, and solubility. HMT-MBP contributed to a darker color, smaller size, and higher hardness value in the substituted bread. Additionally, bread made from WF and HMT-MBP had higher RS content but received moderate scores for all sensory attributes. Consequently, composite bread made from 90% WF and 10% HMT-MBP was considered a "low-carb" bread beneficial for human health.

**Acknowledgements:** *This research is funded by Vietnam National University in Ho Chi Minh City (VNU-HCM) under grant number A2024-28-02.*

**REFERENCES**

Duyen TTM, Huong NTM, Phi NTL, Hung PV (2020). Physicochemical properties and in vitro digestibility of mung-bean starches varying amylose contents under citric acid and hydrothermal treatments. *Int J Biol Macromol*, 164: 651-658.

Gan RY, Lui WY, Wu K, Chan CL, Dai SH, Sui ZQ, Corke H (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends Food Sci Technol*, 59:1–14.

Hou D, Yousaf L, Xue Y, Hu J, Wu J, Hu X, Feng N, Shen Q (2019). Mung Bean (*Vigna radiata* L.): Bioactive Polyphenols, Polysaccharides, Peptides, and Health Benefits. *Nutr*, 11(6): 1238.

Hung PV, My NTH, Phi NTL (2014). Impact of acid and heat-moisture treatment combination on physicochemical characteristics and resistant starch contents of sweet potato and yam starches. *Starch-Starke*, 66: 1013-1021.

Hung PV, Yamamori M, Morita N (2005). Formation of enzyme-resistant starch in bread as affected by high-amylose wheat flour substitutions. *Cereal Chem*, 82(6):690-694.

Li SL, Gao QY (2010). Effect of heat-moisture treatment on the formation and properties of resistant starches from mung bean (*Phaseolus radiatus*) starches. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 4(12): 907 – 914.

Tien NNT, Anh TNQ, Phi NTL, Hung PV (2018). In vitro and in vivo starch digestibility and quality of bread substituted with acid and heat-moisture treated sweet potato starch. *Starch-Starke*, 70(9-10), 1800069.

Tien NNT, Duyen TTM, Hung PV (2019). Substitution of wheat flour with highly enzyme-resisted cassava starch and its effect on starch digestibility and quality of breads. *J Food Meas Charact*, 13(2):1-7.

Zavareze EdR, Dias ARG (2011). Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohydr Polym*, 83(2): 317-328.

## NGHIÊN CỨU CÁC TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA BỘT PHỐI TRỘN VÀ CHẤT LƯỢNG CỦA BÁNH MÌ BỔ SUNG BỘT ĐẬU XANH XỬ LÝ NHIỆT-ẨM

Nguyễn Thị Cẩm Nhi, Nguyễn Ngọc Thanh Tiên, Mai Nguyễn Trâm Anh,  
Châu Minh Thuận, Phạm Văn Hùng

*Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam  
Phòng Thí nghiệm Phân tích và Nghiên cứu liên ngành Hóa, Thực phẩm và Môi trường, Trường Đại học Quốc tế  
Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phát triển sản phẩm bánh mì sử dụng bột đậu xanh xử lý nhiệt-ẩm thay thế một phần bột mì và xác định các tính chất lý hóa của bột phối trộn cũng như chất lượng bánh mì. Việc bổ sung bột đậu xanh xử lý nhiệt-ẩm làm tăng nhiệt độ hồ hóa nhưng giảm các tính chất hồ hóa khác, cũng như chỉ số trương nở và độ hòa tan. Bánh mì bổ sung bột đậu xanh xử lý nhiệt-ẩm có màu tối hơn, kích thước nhỏ hơn và độ cứng cao hơn. Cùng với việc bổ sung thêm bột đậu xanh đã được xử lý nhiệt-ẩm vào bột nhào, những loại bánh mì thay thế này chứa lượng tinh bột tiêu hóa nhanh thấp hơn (56,39-63,32%) và nồng độ tinh bột kháng cao hơn (17,18-27,00%) so với của loại làm từ lúa mì (lần lượt là 65,38% và 13,32%). Vì vậy, bột đậu xanh xử lý nhiệt-ẩm có chứa hàm lượng tinh bột kháng cao cho nên sản phẩm bánh mì có lượng tinh bột tiêu hóa nhanh thấp hơn hàm lượng tinh bột kháng cao hơn so với mẫu bánh mì đối chứng. Mặc dù các chỉ số cảm quan của bánh mì có bổ sung bột đậu xanh được đánh giá thấp hơn so với mẫu bánh mì đối chứng, nhưng bánh mì làm từ 90% bột mì và 10% bột đậu xanh xử lý nhiệt-ẩm đạt được độ chấp nhận tổng thể cao nhất trong số ba loại bánh mì bổ sung bột đậu xanh. Kết quả là, sản phẩm này có thể được sử dụng như là loại bánh mì ít carbohydrate có lợi cho sức khỏe con người.

*Từ khóa:* Chất lượng bánh mì, khả năng tiêu hóa, xử lý nhiệt-ẩm, bánh mì ít carbohydrate, bột đậu xanh, tính chất lý hóa.

---

\* Tác giả liên hệ: SĐT: 0988017119; Email: pvhung@hcmiu.edu.vn

# ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN LÊN MEN VÀ NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA NƯỚC UỐNG KOMBUCHA LÁ ỒI RỪNG (*Psidium guajava* L.)

Đặng Thị Ngọc Dung<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Trung<sup>2</sup>, Nguyễn Quang Vinh<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Tây Nguyên

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên

## TÓM TẮT

Những công bố gần đây cho thấy, lên men kombucha từ thảo dược có thể nâng cao hoạt tính sinh học của thảo dược đối với sức khỏe. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của thời gian lên men và hàm lượng đường sucrose đến chất lượng cảm quan và hoạt tính sinh học nước uống lên men kombucha có bổ sung lá ổi rừng. Nghiên cứu cho thấy, lên men kombucha lá ổi rừng có khả năng làm tăng tổng hàm lượng polyphenol (TPC), flavonoid (TFC), hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase so với dịch lá ổi rừng chưa lên men. Đồng thời, kết quả nghiên cứu cũng xác định được thời gian lên men phù hợp cho sản phẩm kombucha lá ổi rừng là 12 ngày với nồng độ đường bổ sung là 80g/L. Sản phẩm nước uống kombucha lá ổi rừng giàu hàm lượng polyphenol tổng (TPC = 20,21mg GAE/100mL) và flavonoid tổng (14,83 mg QE/100mL) với hoạt tính chống oxy hóa theo khả năng bắt gốc tự do DPPH (47,37%), ABTS (57,35%) và năng lực khử sắt FRAP (2,83) và hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase (83,5%). Nước uống kombucha lá ổi có hàm lượng chất khô hòa tan là 6,13%, hàm lượng đường khử là 11563,48  $\mu$ g/mL, độ pH là 2,84 và hàm lượng acid tổng là 6,61 g/L, với mức độ ưa thích chung của người tiêu dùng là 6,81 điểm.

**Từ khóa:** Kombucha lá ổi rừng, polyphenol, flavonoid, hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Kombucha là một sản phẩm lên men truyền thống từ trà đen hoặc trà xanh bởi hệ vi khuẩn acetic và nấm men. Ngoài trà đen và trà xanh, kombucha còn được lên men từ dịch chiết thảo mộc, dược liệu (Vitas *et al.*, 2020). Nhu cầu về kombucha tiếp tục tăng trên toàn cầu, chủ yếu là do lợi ích sức khỏe được công bố và các đặc tính cảm quan hấp dẫn của nó (Wang *et al.*, 2023). Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng kombucha có các hoạt tính sinh học quan trọng như giải độc, chống tác hại của các gốc tự do (Aung & Eun, 2021), cung cấp năng lượng và tăng cường hệ miễn dịch. Các hoạt tính sinh học của kombucha chủ yếu đến từ hoạt động của polyphenol và các hợp chất được tạo ra trong quá trình lên men (Kim *et al.*, 2023). Đáng chú ý, quá trình lên men có thể giúp gia tăng hàm lượng polyphenol và các chất chuyển hóa có lợi, TPC và TFC tăng lần lượt 3,53 và 5,2 lần (Kim *et al.*, 2023); catechin, epicatechin, caffeine, acid caffeic, acid gallic và rutin trong kombucha đã tăng lên; hoạt tính chống oxy hóa của kombucha được tăng cường lên tới 2,88 lần (Kim *et al.*, 2023). Bên cạnh đó, Francis M Mann và đồng tác giả (2017) đã chứng minh rằng kombucha trà đen có hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase tuyến tụy (IC<sub>50</sub> = 0,16±0,06% mL/U); trong khi đó hoạt tính này không có trong dịch trích trà đen (Mann *et al.*, 2017).

Lá ổi rừng (*Psidium guajava* L.) là cây thuốc mọc hoang tự nhiên tại rừng M'Đrak, tỉnh Đắk Lắk, được người dân địa phương sử dụng với nhiều mục đích khác nhau: kiểm soát tiêu chảy, giải quyết các vấn đề về dạ dày và điều chỉnh lượng đường trong máu ở những người mắc bệnh đái tháo đường (ĐTĐ). Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng lá ổi là nguồn giàu các thành phần polyphenolic và flavonoid, với các hợp chất chính là acid galic, catechin, rutin, quercetin, apigenin, quercitrin, vitexin và apigenin-7-O-D-glucopyranoside (Nguyen *et al.*, 2022). Chiết xuất lá ổi rừng có hoạt tính trung hoà gốc tự do, ức chế  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase cao nên có tiềm năng hỗ trợ bệnh đái tháo đường (Nguyen *et al.*, 2023; 2022). Các công bố gần đây cho thấy, polyphenol được xem là chất xơ sinh học có tiềm năng ứng dụng như một nhóm chất tiềm năng trong kích sự phát triển của lợi khuẩn như *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* và ức chế sự phát triển của hại khuẩn như *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* và *Helicobacter pylori* (Plamada & Vodnar, 2021). Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định được thời gian lên men và nồng độ đường bổ sung để sản xuất nước uống lên men kombucha có bổ sung lá ổi rừng có giá trị cảm quan và hoạt tính sinh học tốt.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Trà xanh: Trà Đại Gia - Thái Nguyên, Trà Đại Gia được sản xuất theo quy trình làm trà truyền thống của Tân Cương Thái Nguyên với quy mô công nghiệp. Lá ổi rừng được thu hái tại M'Đrak, tỉnh Đắk Lắk sấy ở 50°C đến

đạt độ ẩm <10% (w/w). SCOBY (Symbiotic culture of bacteria and yeast) được cung cấp bởi công ty TNHH Xuất nhập khẩu Foodplus.

Thuốc thử Folin – Ciocalteu, gallic acid, quercetin (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>), ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), α-amylase (Sigma, Mỹ); ethanol, methanol, DMSO (dimethylsulfoxide), tinh bột, NaCl, D-glucose, NaOH, Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate, NaNO<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Trichloroacetic acid, Ferric chloride (Xinglong, Trung Quốc). Các hoá chất nêu trên đều đạt tiêu chuẩn phân tích.

## Phương pháp nghiên cứu

### Bố trí thí nghiệm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian (0, 3, 6, 9, 12, 15 ngày) đến chất lượng kombucha lá ôi rừng, dịch trà được chuẩn bị bằng cách cho 100mL nước 80°C vào 5g hỗn hợp trà xanh – lá ôi rừng (lá trà xanh/lá ôi = 25/75 (g/g)), siêu âm 20 phút; sau đó lấy 24g scoby + 60ml dịch chiết trà + 15ml dịch môi (dịch nuôi scoby) cho vào bình chứa 1000ml dịch đường 5%; tiến hành lên men trong ở nhiệt độ phòng. Theo thời gian lên men sẽ xác định hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học (hàm lượng polyphenol tổng - TPC, flavonoids tổng - TFC), hoạt tính chống oxy hóa xác định theo phương pháp bắt gốc tự do DPPH, bắt gốc tự do ABTS<sup>+</sup>, đánh giá năng lực khử sắt FRAP), hoạt tính ức chế α-amylase, lượng đường khử, giá trị cảm quan để chọn thời gian lên men thích hợp cho sản phẩm kombucha lá ôi rừng.

Tiếp theo, các nghiệm thức với nồng độ đường khác nhau (40, 50, 60, 70 và 80 g/L) được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường trong quá trình lên men đến chất lượng kombucha. Các nghiệm thức nồng độ đường khác nhau của kombucha lá ôi rừng được đánh giá về hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học TPC, TFC, hoạt tính chống oxy hóa xác định theo phương pháp bắt gốc tự do DPPH, bắt gốc tự do ABTS<sup>+</sup>, đánh giá năng lực khử sắt FRAP, hoạt tính ức chế α-amylase, độ pH, hàm lượng acid tổng, hàm lượng đường khử và giá trị cảm quan của sản phẩm.

pH: xác định bằng cách sử dụng thiết bị đo Hanna HI2210-02.

**Phương pháp xác định hàm lượng acid tổng:** được xác định theo TCVN 4589:1988. Hàm lượng acid tổng được tính theo công thức:  $TA = \frac{K \cdot V}{v} \times 1000 \text{ (g/L)}$ ; Trong đó V: thể tích trung bình của NaOH 0,1N, mL; v: thể tích mẫu đem chuẩn độ, mL; K: hệ số của loại acid tương ứng với 1mL NaOH 0,1N.

**Phương pháp xác định hàm lượng đường khử:** phương pháp DNS (Axit Dinitrosalicylic) theo Trần Thị Giang và đồng tác giả (2022).

**Phương pháp xác định hàm lượng chất khô hòa tan (TSS):** được xác định theo độ Brix bằng cách sử dụng khúc xạ kế.

**Phương pháp xác định hàm lượng polyphenol tổng (TPC):** được xác định theo phương pháp của Folin- Ciocalteu, 1927.

**Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid tổng (TFC):** được xác định theo phương pháp của Jia & đồng tác giả (1999).

**Hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH:** hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp bắt gốc tự do DPPH (2,2- diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) được tiến hành theo Nguyen Quang Vinh và Eun (2011). Trolox được sử dụng làm đối chứng dương. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH được tính theo mg trolox equivalent (mg TE/g chất khô).

**Hoạt tính chống oxy hóa theo ABTS:** hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp bắt gốc tự do ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) được tiến hành theo Nguyen Quang Vinh và Eun (2011). Trolox được sử dụng làm đối chứng dương. Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS<sup>+</sup> được tính theo mg trolox equivalent (mg TE/g chất khô).

### Hoạt tính chống oxy hóa theo FRAP: theo Nguyen Quang Vinh và Eun (2011)

Lấy 1ml của dịch trà được trộn với dung dịch đệm phosphate (2,5ml, 0,2M, pH 6,6) và kali ferricyanua [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (2,5ml, 1%). Các hỗn hợp này sau đó được ủ ở 50°C trong 20 phút. Sau đó bổ sung thêm (2,5ml) acid trichloroacetic (10%), sau đó hỗn hợp này được ly tâm trong 10 phút ở 1036 x g. Lớp trên của các dung dịch (2,5ml) được trộn riêng với nước cất (2,5ml) và FeCl<sub>3</sub> (0,5ml, 0,1%), và các mức độ hấp thụ được đo ở bước sóng 700nm bằng máy đo UV-Vis. Kết quả thu được dựa trên chất chuẩn là Trolox hấp thụ tại bước sóng 700nm.

### Phương pháp xác định hoạt tính ức chế α-amylase theo Nguyen và đồng tác giả (2022)

Quá trình tiến hành bằng cách trộn 200 μL dịch kombucha với nồng độ nghiên cứu với 300 μL dung dịch α-amylase (2 μg/mL) và ủ ở 37°C trong 10 phút. Tiếp theo, bổ sung 400 μL dung dịch tinh bột 1% trong đệm phosphate và tiếp tục ủ ở 37°C trong 20 phút. Phản ứng kết thúc bằng cách bổ sung 2 mL dinitrosalicylic acid và đun sôi 10 phút, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ của mẫu ở bước sóng 540 nm. Kết quả được so sánh với mẫu kiểm chứng chỉ chứa 500 μL dung dịch đệm, 400 μL dung dịch tinh bột và 2 mL

dinitrosalicylic acid.

**Phương pháp đánh giá cảm quan thị hiếu được xác định** (Cung Thị Tố Quỳnh *et al.*, 2018): Mục đích nhằm đánh giá mức độ ưa thích về mùi, vị, màu sắc, trạng thái, mức độ chấp nhận chung của các mẫu kombucha lên men theo các công thức khác nhau. Hội đồng cảm quan gồm 60 người. Mỗi người thử sẽ nhận được 5 cốc mẫu trà được mã hóa bằng ba chữ số tránh sự trùng lặp và 1 cốc nước thanh vị. Một phiếu hướng dẫn yêu cầu người đánh giá mức độ ưa thích của mình đối với các chỉ tiêu trên thang điểm thị hiếu bao gồm 9 điểm. Cục kì không thích: 1; Rất không thích: 2; Không thích: 3; Tương đối không thích: 4; Không thích, không ghét: 5; Tương đối thích: 6; Thích: 7; Rất thích: 8; Cục kì thích: 9.

**Phương pháp xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại. Kết quả nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 22 để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, độ chính xác, sự khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p \leq 5\%$  giữa các mẫu. Các biểu đồ được vẽ trên phần mềm excel 2016.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hoạt tính sinh học, chất lượng cảm quan sản phẩm kombucha lá ổi rừng**

Thực vật đã được sử dụng như một nguồn cung cấp thành phần hoạt tính sinh học trong hàng ngàn năm và nhu cầu về các thành phần tự nhiên đã tăng lên trong thập kỷ qua. Một số nghiên cứu cho thấy quá trình lên men kombucha có thể làm thay đổi thành phần và tăng hoạt tính sinh học của các dịch chiết thực vật (Aung & Eun, 2021; Cardoso *et al.*, 2020). Bảng 1 thể hiện sự thay đổi về thành phần và hoạt tính sinh học của nước uống kombucha lá ổi rừng theo thời gian lên men. Kết quả cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) và flavonoid tổng số (TFC) tăng theo thời gian lên men và đạt giá trị lớn nhất vào ngày thứ 12 (23,29 mg GAE/100mL và 17,48 mg QE/100mL). Xu hướng tăng TPC và TFC theo thời gian lên men từ ngày 0 đến ngày thứ 12 tương đồng với kết quả nghiên cứu của Thinzar Aung & Jong-Bang Eun (2021) trên kombucha táo biển. Sự thay đổi hàm lượng polyphenol tổng số có thể do hoạt động của enzyme và/hoặc độ pH thấp trong quá trình lên men đã phân cắt các hợp chất phenolic glucoside hoặc tannin trong nguyên liệu thành các hợp chất phenolic tự do (Cardoso *et al.*, 2020).

Hoạt tính chống oxy hóa tăng dần trong giai đoạn đầu của quá trình lên men và sau đó giảm xuống trong các ngày tiếp theo (Bảng 1). Trong đó, hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH tăng dần và đạt cao nhất 51,79% (ngày thứ 9), sau đó giảm xuống 45,21% vào ngày thứ 12, và 44,15% vào ngày thứ 15. Tuy nhiên, hoạt tính chống oxy hóa theo ABTS của nghiên cứu đạt cao nhất vào ngày thứ 12 (53,24%), sau đó giảm xuống 51,14% vào ngày thứ 15. Quá trình lên men có liên quan đến việc tăng hoạt tính chống oxy hóa vì có sự giải phóng các hợp chất có hoạt tính sinh học cao vào môi trường sau khi lên men (Cardoso *et al.*, 2020). Hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH và các gốc hydroxyl tăng lên khi tăng thời gian lên men kombucha từ trà đen và trà xanh (Massoud *et al.*, 2022). Sự gia tăng khả năng chống oxy hóa có mối tương quan thuận với hàm lượng polyphenol tổng số trong quá trình lên men (Aung & Eun, 2021).

**Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian lên men lên TPC, TFC, hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH, ABTS, FRAP, hoạt tính ức chế  $\alpha$  amylase, hàm lượng đường khử của kombucha lá ổi rừng**

Thời gian lên men (ngày)	0 (D-0)	3 (D-3)	6 (D-6)	9 (D-9)	12 (D-12)	15 (D-15)
Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) (mg GAE/100 mL)	18,06±0,36 <sup>e</sup>	19,9±0,16 <sup>d</sup>	20,31±0,12 <sup>c</sup>	21,43±0,15 <sup>b</sup>	23,29 <sub>a</sub> ±0,26	23,03±0,2 <sup>a</sup>
Hàm lượng flavonoid tổng (TFC) (mg QE/100 mL)	13,38±0,82 <sup>d</sup>	14,03±0,47 <sup>c</sup>	15,18±0,59 <sup>c</sup>	16,45±0,35 <sup>b</sup>	17,48 <sub>a</sub> ±0,60	16,05±0,68 <sup>e</sup>
Hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH (%)	42,03±1,35 <sup>d</sup>	47,95±0,7 <sup>b</sup>	48±0,6 <sup>b</sup>	51,79±0,74 <sup>a</sup>	45,21 <sub>c</sub> ±0,05	44,15±0,67 <sup>c</sup>
Hoạt tính chống oxy hóa theo ABTS (%)	45,87±1,82 <sup>c</sup>	47,38±0,34 <sup>c</sup>	49,9±0,3 <sup>b</sup>	50,43±0,68 <sup>b</sup>	53,24 <sub>a</sub> ±0,61	51,14±1,74 <sup>b</sup>
Hoạt tính chống oxy hóa theo FRAP	2,55±0,04 <sup>b</sup>	2,31±0,07 <sup>d</sup>	2,41±0,06 <sup>c</sup>	2,47±0,0 <sup>bc</sup>	2,77±0,01 <sup>a</sup>	2,47±0,09 <sup>bc</sup>
Hoạt tính ức chế $\alpha$ amylase (%)	16,89±0,98 <sup>e</sup>	27,89±1,28 <sup>d</sup>	40,31±7,25 <sup>c</sup>	48,47±1,38 <sup>b</sup>	55,68 <sub>a</sub> ±1,53	44,41±1,92 <sup>b</sup>
Hàm lượng đường khử ( $\mu$ g/mL)	1815,43±13,88 <sup>f</sup>	3884,37±34,57 <sup>e</sup>	5498,81±14,95 <sup>d</sup>	7160,50±36,28 <sup>c</sup>	7508,69±209,87 <sup>b</sup>	9908,75±119,29 <sup>a</sup>

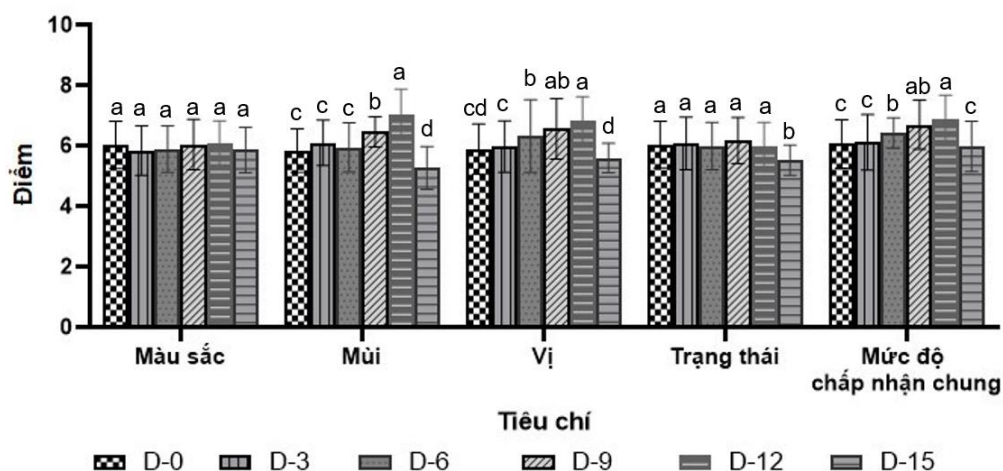
a-f: Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa giữa các ngày lên men khác nhau ( $p < 0,05$ ).



Năng lực khử là phương pháp đánh giá khả năng khử ion sắt (III) thành ion sắt (II), là một phương pháp đơn giản và thường được sử dụng để đánh giá khả năng chống oxy hóa do khả năng chuyển điện tử của hợp chất (Vitas *et al.*, 2020). Năng lực khử sắt FRAP có mối tương quan thuận với thời gian lên men và hàm lượng các hợp chất polyphenol (Aung & Eun, 2021). Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, năng lực khử sắt của dịch kombucha tăng theo thời gian lên men và đạt giá trị cao nhất vào ngày lên men thứ 12 ( $2,77 \pm 0,01$ ) và sau đó giảm vào ngày lên men thứ 15 ( $2,47 \pm 0,09$ ). Xu hướng thay đổi năng lực khử sắt FRAP tương đồng với nghiên cứu của Zhou và đồng tác giả (2022), năng lực khử sắt FRAP tăng dần theo thời gian lên men sau đó giảm xuống (Zhou *et al.*, 2022). Nghiên cứu của Jakubczyk và đồng tác giả (2020) cũng chỉ ra rằng năng lực khử sắt FRAP có mối tương quan thuận với thời gian lên men (trong một khoảng giới hạn) và hàm lượng các hợp chất polyphenol (Jakubczyk *et al.*, 2020).

Kết quả tương tự đối với hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase, tăng ở giai đoạn đầu của quá trình lên men kombucha và đạt hoạt tính ức chế cao nhất vào ngày lên men thứ 12 (55,68%); sau đó giảm xuống 44,41% vào ngày lên men thứ 15. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Euis Thinzar Aung và Jong-Bang Eun (2022), cho thấy hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase của kombucha tảo biển tăng lên cực đại vào ngày thứ 14 của quá trình lên men lần lượt là 92% và 83% ở nghiệm thức nhiệt độ lên men 25°C và 30°C; sau đó giảm hoạt tính ức chế vào ngày thứ 22 lần lượt là 52 và 24% cho các nghiệm thức tương ứng (Aung & Eun, 2022). Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase tăng lên trong quá trình lên men, có thể do sự gia tăng tổng hàm lượng polyphenol và các hợp chất có hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase trong quá trình thủy phân tinh bột, bất hoạt  $\alpha$ -amylase do pH thấp (Mann *et al.*, 2017). Hàm lượng đường khử của các nghiệm thức đều tăng theo thời gian lên men. Độ tăng nồng độ đường khử sau 15 ngày lên men cao nhất là  $9908,75 \pm 119,29$  ( $\mu\text{g/mL}$ ); Điều này có thể do các enzyme từ VSV thủy phân sucrose tạo thành glucose và fructose là nguyên nhân lượng đường khử tăng lên trong quá trình lên men kombucha (Tu *et al.*, 2019; Zubaidah *et al.*, 2018). Xu hướng tăng lượng đường khử theo thời gian lên men phù hợp với kết quả nghiên cứu trên kombucha tảo biển (Aung & Eun, 2021).

Chất lượng cảm quan của thực phẩm đóng vai trò quan trọng trong quá trình thương mại hoá sản phẩm. Vì vậy, sản phẩm kombucha sẽ được đánh giá chất lượng cảm quan thông qua mức độ ưa thích sản phẩm của người tiêu dùng theo thời gian lên men để xác định được thời gian lên men phù hợp. Kết quả cho thấy, về chỉ tiêu cảm quan màu sắc và ngày lên men thứ 0 là cao nhất (6,03 điểm) và thấp nhất vào ngày lên men thứ 15 (5,87 điểm). Điểm cảm quan về mùi, nghiệm thức vào ngày lên men thứ 12 là cao nhất (7,05 điểm), thấp nhất vào ngày thứ 15 (5,27 điểm). Vào ngày lên men thứ 15, sản phẩm có mùi chua nồng, mùi thơm nhẹ của lá ổi và vào ngày lên men thứ 12, sản phẩm có mùi lá ổi và mùi sản phẩm lên đặc trưng. Điểm cảm quan về vị, cao nhất đạt 6,82 điểm (ngày thứ 12), và thấp nhất là 5,6 điểm (ngày thứ 15). Nhìn chung, điểm cảm quan cao nhất về vị là vào ngày lên men thứ 12; ngày lên men thứ 9, sản phẩm có vị ngọt nhẹ, không quá chua; sản phẩm có độ ngọt cao và ít chua (ngày thứ 0, 3, 6); sản phẩm có độ chua cao, không còn độ ngọt gắt khó chịu (ngày thứ 15). Điểm cảm quan về trạng thái, ngày thứ 9 cho giá trị cao nhất (6,18 điểm) và thấp nhất vào ngày lên men thứ 15 (5,53 điểm). Nhìn chung, các nghiệm thức đều có trạng thái lỏng, không quá đục và không có cặn, riêng mẫu vào ngày 15 có độ đục nhiều hơn. Mức độ chấp nhận chung về cảm quan vào ngày thứ 12 có số điểm cao nhất (6,87 điểm), sau đó đạt 6,7 (ngày thứ 9), tiếp theo đạt 6,43 (ngày thứ 6) và cuối cùng là 5,88; 6,12; 5,98 (ngày 0, 3, 15 tương ứng).

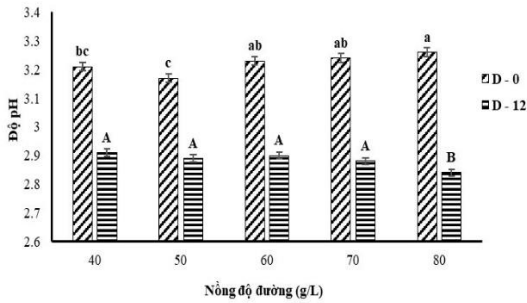


Hình 1. Chất lượng cảm quan của các nghiệm thức theo thời gian lên men

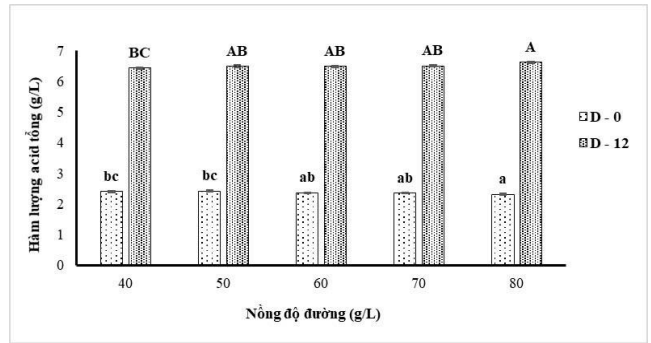
a-d: Các chữ cái khác nhau trong cùng một tiêu chí biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa giữa các ngày lên men khác nhau ( $p < 0,05$ ).

Từ các kết quả cho thấy, thời gian lên men phù hợp nhất là 12 ngày; nước uống kombucha lá ổi rừng có hàm lượng hàm lượng polyphenol tổng (TPC) và flavonoid tổng (TFC) cao nhất, tương ứng 23,29 mg GAE/100mL và 17,48 mg QE/100mL; với hoạt tính chống oxy hóa theo ABTS (%), hoạt tính chống oxy hóa theo FRAP, hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase và giá trị cảm quan cao nhất; tương ứng 53,24%; 2,77; 55,68% và 6,87 điểm.

**Ảnh hưởng của nồng độ dịch đường lên men đến pH, hàm lượng acid tổng, hàm lượng chất rắn hòa tan (TSS), hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học, chất lượng cảm quan sản phẩm kombucha lá ổi rừng**



**Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến độ pH của kombucha theo thời gian lên men**



**Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến hàm lượng acid tổng của kombucha theo thời gian lên men**

a-c: Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ở ngày lên men thứ 0 và các chữ in hoa A-C biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ở ngày lên men thứ 12 ( $p < 0,05$ ).

Kết quả Hình 2 cho thấy, pH của các nghiệm thức giảm sau 12 ngày lên men; nghiệm thức 80 g/L có giá trị pH thấp nhất (2,84) và nghiệm thức 40 g/L có giá trị pH cao nhất (2,91); tương ứng với độ giảm pH là 11,57 và 8,1%. Độ pH giảm là do các acid được sinh ra trong quá trình lên men bởi nấm men và vi khuẩn. Xu hướng giảm pH theo thời gian lên men phù hợp với kết quả của Chunhai Tu và đồng tác giả (2019) khi lên men kombucha whey đậu nành. Độ pH giảm là do các acid được sinh ra trong quá trình lên men (Aung & Eun, 2021). Nấm men sẽ chuyển hóa glucose và fructose thành ethanol; sau giai đoạn lên men ethanol, vi khuẩn acetic sẽ sử dụng glucose để sinh ra acid glucuronic và chuyển hóa ethanol thành acid acetic (Vanida Osiripun, 2021). Kết quả cho thấy việc sử dụng nồng độ đường cao là nguồn carbon chính cho các vi sinh vật trong quá trình lên men kombucha. Đối với độ giảm pH nhanh ở các nghiệm thức 60, 70, 80 g/L sẽ gây khó khăn cho việc kiểm soát hoạt động của nấm men và vi khuẩn acetic; nghiệm thức 40 g/L có độ giảm pH ổn định nhất. Kết quả Hình 3, hàm lượng acid tổng của các nghiệm thức của ngày lên men thứ 12 so với ngày thứ 0 đều tăng, nghiệm thức 80 g/L có hàm lượng acid tổng cao nhất (6,61 g/L) và nghiệm thức 40 g/L có hàm lượng acid tổng thấp nhất (6,43 g/L). Xu hướng thay đổi độ acid này là đặc trưng cho quá trình lên men kombucha và nó có xu hướng tương đồng với nghiên cứu kombucha táo biển (Aung & Eun, 2021). Tổng số acid tăng lên vì đường được chuyển hóa bởi vi khuẩn để tạo ra acid hữu cơ, vì vậy quá trình lên men càng dài, lượng acid hữu cơ được tạo thành càng cao (Tu *et al.*, 2019). Các loại nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) chuyển hóa glucose tạo thành ethanol và CO<sub>2</sub>. Ethanol sau đó được oxy hóa thành acetaldehyde bởi *Acetobacter*, sau đó được chuyển thành acid acetic.

Quá trình lên men kombucha nhờ vi khuẩn và nấm men sẽ chuyển hóa đường thành acid hữu cơ nên nồng độ đường (hàm lượng chất khô hòa tan (TSS)) sẽ giảm theo thời gian lên men. Kết quả Bảng 2 cho thấy trong quá trình lên men, TSS của các nghiệm thức đều giảm sau 12 ngày. TSS cao nhất là của nghiệm thức 80 g/L (6,13 °Bx) và TSS thấp nhất là nghiệm thức 40g/L (2,87 °Bx); tương ứng với độ giảm Brix lần lượt là 12,43% và 23,05% so với ngày đầu lên men. Xu hướng thay đổi TSS này phù hợp với nghiên cứu của Wang và đồng tác giả (2023) trên kombucha trà đen, TSS có xu hướng giảm theo thời gian lên men, TSS của kombucha giảm 4,87±0,06% xuống 3,13±0,21% trong suốt quá trình lên men trong 14 ngày.

Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số cao nhất tìm thấy ở nghiệm thức bổ sung 40 g/L lần lượt là 24,66±0,22 mg GAE/100mL và 20,33±0,3 mg QE/100mL và thấp nhất là của nghiệm thức 80 g/L lần lượt là 20,21±0,2 mg GAE/100mL và 14,83±0,11 mgQE/100mL (Bảng 2). So với ngày đầu lên men, TPC, TFC của tất cả các nghiệm thức đều tăng. Kết quả này tương đồng với báo cáo của Thinzar Aung và Jong-Bang Eun (2021) về độ tăng TPC và TFC của sản phẩm kombucha táo biển (Aung & Eun, 2021). Sự gia tăng TPC và TFC có thể do sự thủy phân các hợp chất polyphenol do trao đổi chất của VSV (Hsieh *et al.*, 2021).

Hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH và theo ABTS đều tăng sau 12 ngày lên men; hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH của nghiệm thức 80 g/L là cao nhất (47,37±0,96%) và thấp nhất là nghiệm thức 40 g/L (44,09±0,85%); hoạt tính chống oxy hóa theo ABTS của nghiệm thức 40 g/L là cao nhất (60,38±1,07%) và thấp nhất là nghiệm thức 80 g/L (57,35±0,33%) (Bảng 2). Tuy nhiên, hoạt tính chống oxy hóa theo ABTS giữa các nghiệm thức 50, 60, 70 và 80 g/L không có sự khác biệt có ý nghĩa. Các nghiệm thức khác nhau có hoạt tính chống oxy hoá khác nhau, có thể liên quan đến chất nền và ảnh hưởng bởi hoạt động trao đổi chất của nấm men và vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy. Sự gia tăng hoạt tính chống oxy hóa có thể do TPC tăng, do hoạt động của enzyme và/hoặc độ pH thấp trong quá trình lên men làm tăng các hợp chất phenolic có trọng lượng phân tử nhỏ (Cardoso *et al.*, 2020).

Kết quả tương tự đối với năng lực khử sắt FRAP (Bảng 2), năng lực khử sắt FRAP của các nghiệm thức vào ngày lên men thứ 12 đều cao hơn so với ngày đầu lên men. Nghiệm thức 70 g/L có năng lực khử sắt FRAP cao

nhất (2,86), nghiệm thức 40 g/L có năng lực khử sắt FRAP là thấp nhất (2,79). Việc tăng năng lực khử sắt FRAP có liên quan đến việc giải phóng các hợp chất polyphenol và flavonoid trong quá trình lên men (Aung & Eun, 2021).

**Bảng 2. Ảnh hưởng nồng độ đường của dịch trà lên TSS, TPC, TFC, hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH, ABTS, FRAP, hoạt tính ức chế  $\alpha$  amylase, hàm lượng đường khử của kombucha lá ổi rừng**

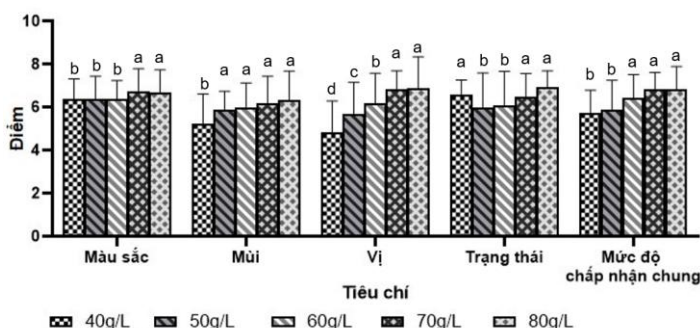
Nồng độ đường (g/L)	40		50		60		70		80	
Thời gian lên men (Ngày)	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12
Hàm lượng chất khô hòa tan (TSS) (độ Brix)	3,73± 0,12 <sup>e</sup>	2,87± 0,12 <sup>E</sup>	4,5± 0,1 <sup>d</sup>	3,6± 0 <sup>D</sup>	5,2± 0 <sup>c</sup>	4,53± 0,12 <sup>C</sup>	6,2± 0 <sup>b</sup>	5,4± 0 <sup>B</sup>	7± 0 <sup>a</sup>	6,13± 0,12 <sup>A</sup>
Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) (mg GAE/100 mL)	19,55± 0,32 <sup>a</sup>	24,66± 0,22 <sup>A</sup>	19,12± 0,36 <sup>a</sup>	20,97± 0,42 <sup>B</sup>	18,33± 0,23 <sup>b</sup>	20,03± 0,02 <sup>D</sup>	18,41± 0,09 <sup>b</sup>	20,63± 0,13 <sup>BC</sup>	17,69± 0,23 <sup>c</sup>	20,21± 0,2 <sup>CD</sup>
Hàm lượng flavonoid tổng (TFC) (mg QE/100 mL)	13,65± 0,62 <sup>a</sup>	20,33± 0,3 <sup>A</sup>	11,21± 0,28 <sup>b</sup>	14,72± 0,22 <sup>C</sup>	12,94± 0,33 <sup>a</sup>	14,99± 0,04 <sup>C</sup>	12,95± 0,27 <sup>a</sup>	15,85± 0,12 <sup>B</sup>	11,41± 0,38 <sup>b</sup>	14,83± 0,11 <sup>C</sup>
Hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH (%)	35,7± 1,7 <sup>c</sup>	44,09± 0,85 <sup>C</sup>	41,93± 0,21ab	46,91± 0,49 <sup>A</sup>	43,67± 0,91 <sup>a</sup>	45,35± 0,2 <sup>B</sup>	41,36± 0,21 <sup>b</sup>	45,16± 0,3 <sup>BC</sup>	42,87± 1,36 <sup>ab</sup>	47,37± 0,96 <sup>A</sup>
Hoạt tính chống oxy hóa theo ABTS (%)	39,05± 0,9 <sup>c</sup>	60,38± 1,07 <sup>A</sup>	39,63± 0,66 <sup>c</sup>	57,84± 0,71 <sup>B</sup>	45,05± 1,28 <sup>a</sup>	57,92± 0,48 <sup>B</sup>	41,76± 0,81 <sup>b</sup>	58,82± 0,95 <sup>B</sup>	38,89± 0,74 <sup>c</sup>	57,35± 0,33 <sup>B</sup>
Hoạt tính chống oxy hóa theo FRAP	2,39± 0 <sup>d</sup>	2,79± 0 <sup>C</sup>	2,55± 0,02 <sup>c</sup>	2,82± 0,01 <sup>B</sup>	2,52± 0,02 <sup>c</sup>	2,84± 0,01 <sup>AB</sup>	2,66± 0,01 <sup>a</sup>	2,86± 0 <sup>A</sup>	2,6± 0,02 <sup>b</sup>	2,83± 0,01 <sup>B</sup>
Hoạt tính ức chế $\alpha$ amylase (%)	21,1± 1,49	51,44± 0,42 <sup>E</sup>	21,02± 3,37	58,94± 1,53 <sup>D</sup>	20,34± 3,03	72,18± 0,35 <sup>C</sup>	18,48± 0,9	77,47± 0,23 <sup>B</sup>	22,54± 0,69	83,5± 5,59 <sup>A</sup>
Đường khử ( $\mu$ g/mL)	1931,96 ± 17,96 <sup>c</sup>	5122,61 ± 107,06 <sup>E</sup>	2082,39 ± 10,04 <sup>a</sup>	6248,7 ± 60,41 <sup>D</sup>	1845,87 ± 11,49 <sup>d</sup>	7446,96 ± 162,5 <sup>C</sup>	2088,04 ± 26,22 <sup>a</sup>	9576,52 ± 64,06 <sup>B</sup>	2032,61 ± 34,32 <sup>b</sup>	11563,48 ± 53,29 <sup>A</sup>

a-e: Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ở ngày lên men thứ 0 và các chữ in hoa A-E biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ở ngày lên men thứ 12 ( $p < 0,05$ ).

Bên cạnh đó, hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase của các nghiệm thức vào ngày lên men thứ 12 đều tăng so với ban đầu (ngày thứ 0); trong đó nghiệm thức 80 g/L cho thấy hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase là cao nhất (83,5%), thấp nhất đối với nghiệm thức 40 g/L với hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase là 51,44%. Hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase tăng trong quá trình lên men là do sự gia tăng tổng hàm lượng phenolic, sự thay đổi thành phần của các hợp chất polyphenol trong điều kiện pH thấp và sự gia tăng của các hợp chất có hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase do quá trình lên men (Mann *et al.*, 2017).

Lượng đường khử của các nghiệm thức đều tăng vào ngày lên men thứ 12 so với ngày lên men thứ 0, cao nhất là nghiệm thức 80 g/L, hàm lượng đường khử 11563,48  $\mu$ g/mL; thấp nhất là nghiệm thức nghiệm thức 40 g/L, hàm lượng đường khử 5122,618  $\mu$ g/mL. Lượng đường khử tăng là do sucrose được thủy phân thành glucose và fructose bởi bởi nấm men trong môi trường acid (Tu *et al.*, 2019). Xu hướng tăng lượng đường khử theo thời gian lên men phù hợp với kết quả nghiên cứu trên kombucha táo biển (Aung & Eun, 2021).

Theo Hình 4, kết quả mô tả cảm quan của các nghiệm thức dựa trên thang điểm 9. Về màu sắc, nghiệm thức 70 g/L cho điểm cảm quan cao nhất (6,75), và thấp nhất là các nghiệm thức 40, 50 và 60 g/L, cùng đạt 6,38 điểm. Tuy nhiên, điểm cảm quan về màu sắc không có ý nghĩa thống kê. Điểm cảm quan về mùi, nghiệm thức 80 g/L là cao nhất (6,31 điểm) và thấp nhất là nghiệm thức 40 g/L (5,25 điểm). Nhìn chung, các nghiệm thức đều có mùi đặc trưng của lá ổi, mùi sản phẩm lên men; tuy nhiên, mùi của các nghiệm thức đều không quá gắt.



**Hình 4. Kết quả mức độ yêu thích sản phẩm kombucha theo nồng độ đường**

a-c: Các chữ cái khác nhau trong cùng một tiêu chí biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức nồng độ đường khác nhau ( $p < 0,05$ )

Điểm cảm quan về vị, nghiệm thức 80 g/L cao nhất đạt 6,88 điểm và thấp nhất là nghiệm thức 40g/L (4,81 điểm). Nhìn chung, các nghiệm thức đều có vị chua nhẹ, không gắt, có vị ngọt dịu; tuy nhiên, nghiệm thức 40 g/L và 50 g/L, cảm quan viên đánh giá có độ chua cao hơn; điều này là do độ ngọt thấp nên tỷ lệ hàm lượng đường/hàm lượng acid thấp; do đó, 2 nghiệm thức này có mức độ ưa thích về vị thấp hơn so với các nghiệm thức 70 g/L và 80 g/L. Điểm cảm quan về trạng thái, nghiệm thức 80 g/L là cao nhất (6,94 điểm) và nghiệm thức 50 g/L là thấp nhất (6 điểm). Các mẫu có trạng thái lỏng, trong, không đục, màu trà đặc trưng. Cuối cùng là mức độ chấp nhận chung của các mẫu với số điểm cao nhất là nghiệm thức 80 g/L và 70 g/L đạt 6,81 điểm, thấp nhất là nghiệm thức 40 g/L (5,75 điểm). Kết quả này cho thấy, điều kiện lên men kombucha lá ôi rừng là bổ sung đường sucrose 80 mg/L, sản phẩm tạo thành có hương vị hài hòa và hàm lượng chất có hoạt tính sinh học, hoạt tính chống oxy hóa hầu hết đều hơn trong các mẫu nghiên cứu.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy, lên men kombucha đã làm thay đổi tổng hàm lượng polyphenol và flavonoid của dịch lá ôi rừng theo thời gian và dẫn đến sự gia tăng hoạt tính chống oxy hóa và ức chế  $\alpha$ -amylase của sản phẩm. Kết quả nghiên cứu cũng đã xác định được thời gian lên men kombucha lá ôi rừng phù hợp là 12 ngày với nồng độ đường 80 g/L. Sản phẩm nước uống kombucha lá ôi rừng có chứa hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng tương ứng 20,21 mg GAE/100mL; TFC là 14,83 mg QE/100mL với hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH cao nhất, theo ABTS, theo FRAP và hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase cao nhất lần lượt là 47,37%; 57,35%; 2,83 và 83,5%. Sản phẩm có tổng chất chất hòa tan, đường khử, pH và hàm lượng acid tổng lần lượt là 6,13%; 11563,48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 2,84; 6,61 g/L với mức độ ưa thích chung của người tiêu dùng là cao nhất với 6,81 điểm.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Thành phố Hồ Chí Minh và Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên về việc hỗ trợ kinh phí, cơ sở vật chất để hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aung T, & Eun JB (2021). Production and characterization of a novel beverage from laver (*Porphyra dentata*) through fermentation with kombucha consortium. *Food Chem*, 350: 129274.
- Aung T, & Eun JB (2022). Impact of time and temperature on the physicochemical, microbiological, and nutraceutical properties of laver kombucha (*Porphyra dentata*) during fermentation. *LWT*, 154: 112643.
- Cardoso RR, Neto RO, dos Santos D'Almeida CT, do Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L, Martino HSD, Cameron LC, Ferreira M SL, & de Barros FAR (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Res Int*, 128: 108782.
- Hsieh Y, Chiu MC, & Chou JY (2021). Efficacy of the kombucha beverage derived from green, black, and Pu'er teas on chemical profile and antioxidant activity. *J Food Quality*, 2021(1): 1725959.
- Jakubczyk K, Kalduńska J, Kochman J & Janda K (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants*, 9(5): 447.
- Kim H, Hur S, Li, J, Jin K, Yang T, Keehm I, Kim SW, Kim T & Kim D (2023). Enhancement of the phenolic compounds and antioxidant activities of Kombucha prepared using specific bacterial and yeast. *Food Bioscience*, 56: 103431.
- Mann FM, Dickmann M, Schneider R, Armando S, Seehusen K, Hager P & Strauss MJ (2017). Analysis of the role of acidity and tea substrate on the inhibition of  $\alpha$ -amylase by Kombucha. *Journal of Nutrition, Food Research and Technology*, 0(0): 1–5.
- Massoud R, Jafari-Dastjerdeh R, Naghavi N & Khosravi-Darani K (2022). All aspects of antioxidant properties of kombucha drink. *Biointerface Res Appl Chem*, 12(3): 4018–4027.
- Nguyen, QV, Doan MD, Bui Thi BH, Nguyen MT, Tran Minh D, Nguyen AD, Le TM, Nguyen TH, Nguyen TD Tran, VC Hoang (2023). The effect of drying methods on chlorophyll, polyphenol, flavonoids, phenolic compounds contents, color and sensory properties, and *in vitro* antioxidant and anti-diabetic activities of dried wild guava leaves. *Drying Technol*, 41(8): 1291-1302.
- Nguyen QV, Huyen BThiB, Tran MĐ, Nguyen MT, Doan MD, Nguyen AD, Minh Le T, Tran VC, & Pham TN (2022). Impact of Different Drying Temperatures on *In Vitro* Antioxidant and Antidiabetic Activities and Phenolic Compounds of Wild Guava Leaves Collected in the Central Highland of Vietnam. *Nat Prod Commun*, 17(4): 1-10.
- Plamada D, & Vodnar DC (2021). Polyphenols-Gut Microbiota Interrelationship: A Transition to a New Generation of Prebiotics. *Nutrients*, 14(1): 137.
- Quang Vinh Nguyen, & Eun JongBang EJ (2011). Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. *J Med Plants Res*, 5 (13): 2798-2811.
- Tu C, Tang S, Azi F, Hu W & Dong M (2019). Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *J Funct Foods*, 52: 81–89.
- Vanida Osiripun (2021). Polyphenol and antioxidant activities of Kombucha fermented from different teas and fruit juices. *Journal of Current Science and Technology*, 11: 188-196.
- Vitas J, Popović L, Čakarević J, Malbaša R & Vukmanović S (2020). In vitro assessment of bioaccessibility of the antioxidant activity of kombucha beverages after gastric and intestinal digestion. *Food and Feed Research*, 47(1): 33-42.
- Wang B, Rutherford-Markwick K, Naren N, Zhang X-X & Mutukumira AN (2023). Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Black Tea Kombucha Fermented with a New Zealand Starter Culture. *Foods*, 12(12): 2314.
- Zhou DD, Saimaiti A, Luo M, Huang SY, Xiong RG, Shang A, Gan RY & Li HB (2022). Fermentation with tea residues enhances antioxidant activities and polyphenol contents in kombucha beverages. *Antioxidants*, 11(1): 155.

## EFFECTS OF FERMENTATION TIME AND SUCROSE CONCENTRATION ON THE QUALITY AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF WILD GUAVA LEAF KOMBUCHA

Dang Thi Ngoc Dung<sup>1</sup>, Nguyen Minh Trung<sup>2</sup>, Nguyen Quang Vinh<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>*Ho Chi Minh City University of Technology and Education, Ho Chi Minh City, Vietnam*

<sup>2</sup>*Tay Nguyen University, Dak Lak Province, Vietnam*

<sup>3</sup>*Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, Dak Lak Province, Vietnam*

### SUMMARY

Recent publications show that fermenting kombucha from herbs can enhance the biological activity of the herbs for health benefits. The current study describes the effects of fermentation time and sucrose concentration on the sensory quality and biological activity of kombucha supplemented with wild guava leaf extract. The study found that wild guava leaf kombucha fermentation increased the total polyphenol content, flavonoid content, antioxidant activity, and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity compared to unfermented wild guava leaf extract. Moreover, the results indicated that the suitable fermentation time for wild guava leaf kombucha was 12 days with an added sugar concentration of 80 g/L. The wild guava leaf kombucha product was rich in total polyphenol content (20.21 mgGAE/100mL) and total flavonoid content (14.83 mgQE/100 mL) with antioxidant activity measured by DPPH radical scavenging (47.37%), ABTS (57.35%), and FRAP reducing power (2.83) and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity (83.5%). The kombucha beverage had a soluble solid content of 6.13%, the reducing sugar content is 11563.48  $\mu$ g/mL, the pH is 2.84, and the acidity is 6.61 g/L, with a general consumer preference score of 6.81 points.

*Keywords:* Wild guava leaf kombucha, polyphenol, flavonoids,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0948337164; Email: nqvinh@ttn.edu.vn; vinh12b@gmail.com

# PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG THUỘC NHÓM VI KHUẨN SINH ACID LACTIC VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *CANDIDA ALBICANS*

Lê Phương Linh<sup>1</sup>, Hồ Thị Quỳnh<sup>1</sup>, Lê Sỹ Phan Anh<sup>2</sup>, Lê Thị Hải Yến<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Hòa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn các chủng thuộc nhóm vi khuẩn sinh acid lactic từ mẫu ruột gà tại chợ Hoàng Mai, Hà Nội và đánh giá khả năng đối kháng lại mầm bệnh “cơ hội” *Candida albicans*. Hoạt tính đối kháng của chủng phân lập với nấm men *Candida albicans* được thực hiện bằng phương pháp nhỏ giọt, đồng nuôi cấy trực tiếp chủng phân lập với nấm men và sử dụng dịch ly tâm loại sinh khối (Cell – Free Supernatants CFS) để đánh giá khả năng ức chế hình thành màng sinh học của *Candida albicans*. Kết quả cho thấy đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn sinh acid lactic từ mẫu ruột gà dựa theo màu sắc, kích thước, hình thái khuẩn lạc và kích thước vòng hòa tan. Cả 6 chủng đều cho kết quả kháng nấm sơ bộ là khả quan và tiềm năng, trong đó chủng phân lập 1.1 cho hoạt tính kháng mạnh mẽ nhất. Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA cho thấy chủng phân lập 1.1 tương đồng gần nhất với loài *Lactobacillus pentosus*. Kết quả thí nghiệm đã cho thấy tiềm năng sinh học khi sử dụng chủng vi khuẩn sinh acid lactic trong việc phòng ngừa và chống lại bệnh nhiễm trùng nấm *Candida*.

Từ khóa: *Candida albicans*, kháng nấm, LAB, phân lập, vi khuẩn sinh acid lactic.

## MỞ ĐẦU

*Candida albicans* (*C. albicans*) được biết đến là loài nấm men hội sinh sống phổ biến ở bề mặt niêm mạc miệng, da, đường ruột và bộ phận sinh dục của con người. Thông thường, *C. albicans* tồn tại ở trạng thái vô hại nhưng khi hệ vi sinh vật trong cơ thể con người bị xáo trộn, hàng rào miễn dịch bị tổn hại, chúng có thể thay đổi trạng thái và gây ra bệnh nhiễm trùng nấm đặc biệt nguy hại. Viêm âm đạo do nấm *Candida* là tình trạng phổ biến và được quan tâm nhiều nhất khi khoảng 70% phụ nữ ghi nhận từng bị viêm âm đạo do nấm ít nhất một lần trong đời và ước tính khoảng 8% phụ nữ có khả năng bị tái nhiễm nấm sau khi dừng điều trị (Jeanmonod *et al.*, 2024). Bệnh nhiễm trùng máu do *Candida* là nguyên nhân thứ tư gây nhiễm trùng máu bệnh viện ở Hoa Kỳ và thứ bảy ở châu Âu, với tỷ lệ gây tử vong chung được xác định là từ 22 – 75% (Barantsevich, Barantsevich, 2022). Hiện nay, các loại thuốc kháng nấm vẫn đang được sử dụng một cách khá hiệu quả, tuy nhiên tiềm ẩn về những tác động tới sức khỏe con người cũng như làm gia tăng khả năng kháng thuốc cho các chủng thuộc chi *Candida* vẫn là một vấn đề cần được quan tâm.

Vi khuẩn sinh acid lactic (Lactic Acid Bacteria – LAB) là những vi khuẩn có khả năng sinh ra acid lactic trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Bên cạnh khả năng sinh tổng hợp acid lactic, người ta đã nghiên cứu được những hợp chất khác cũng như một số đặc điểm khiến LAB trở nên tiềm năng trong việc sản xuất các chế phẩm probiotic hay các loại thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe như các acid hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, exopolysaccharide, các chất giống bacteriocin (Bacteriocin – Like Substances), ... (Vazquez-Munoz, Dongari-Bagtzoglou, 2021). Có thể thấy, với những nguy hiểm luôn tiềm ẩn ở loài nấm men hội sinh này, cùng với việc tốc độ phát triển các phương pháp điều trị bệnh nấm *Candida* đang chậm lại, mong muốn có thể tìm ra các chế phẩm sinh học an toàn từ nhóm vi khuẩn sinh acid lactic, đặc biệt là LAB có khả năng kháng nấm *Candida* tốt là vô cùng cần thiết. Các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực này sẽ mở ra những hướng đi hứa hẹn hơn cho việc sử dụng LAB/ hợp chất LAB trong công nghệ sinh học bảo vệ sức khỏe con người.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Mẫu ruột gà mới mổ được thu thập tại chợ Hoàng Mai, Hà Nội và chủng nấm men *C. albicans* ATCC10231 từ Trung tâm Vi sinh vật Công nghiệp – Viện Công nghiệp thực phẩm.

### Phân lập vi khuẩn sinh acid lactic

Mẫu ruột gà được đồng nhất trong NaCl 0,9% vô trùng trong 30 phút sau đó pha loãng theo hệ số 10 tới các độ pha loãng  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  và tiến hành cấy trải lên đĩa thạch môi trường MRS bổ sung 0,5%  $\text{CaCO}_3$ . Các đĩa thạch được nuôi ở điều kiện 37°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc riêng rẽ có hình thái khác nhau được lựa chọn để

cấy chuyển sang đĩa môi trường MRS CaCO<sub>3</sub> cho đến khi thu được các khuẩn lạc đồng nhất. Quan sát hình thái khuẩn lạc sau 48 giờ nuôi cấy nhằm ghi nhận hình dạng, kích thước, màu sắc khuẩn lạc. Sau khi đã phân lập thuần chủng, hình dạng tế bào các chủng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi quang học, đồng thời tiến hành các thí nghiệm đặc tính khác như thử nghiệm oxidase, catalase.

### Xác định khả năng kháng *C. albicans* của các chủng phân lập

Các chủng phân lập được hoạt hóa qua đêm trong 8 mL môi trường lỏng MRS ở 37°C. Nhỏ 3 µL canh trường mỗi chủng (điều chỉnh về OD<sub>600nm</sub> = 1) lên bề mặt đĩa thạch môi trường MRS, sau đó nuôi ở tủ ấm 37°C trong 24 giờ để giọt khuẩn lạc LAB phát triển. Cùng lúc đó, *C. albicans* được hoạt hóa qua đêm trong 10 mL môi trường lỏng YPD ở 30°C, 150 vòng/ phút. Canh trường nấm men được điều chỉnh về 1 – 5 x 10<sup>6</sup> CFU/mL sau đó bổ sung 1% (v/v) vào môi trường YPD bán rắn (0,7% agar) ổn nhiệt ở 50°C. Phủ đều môi trường sau khi bổ sung nấm men lên bề mặt đĩa thạch đã nhỏ giọt vi khuẩn sau đó đem đi nuôi ở tủ ấm 30°C. Quan sát vòng ức chế, kháng nấm xuất hiện quanh bề mặt khuẩn lạc LAB. Khả năng ức chế sự phát triển nấm men *C. albicans* của các chủng phân lập được xác định như sau: ΔD = D – d, trong đó D là đường kính vòng ức chế (mm), d là đường kính khuẩn lạc LAB (mm) (Atanasov *et al.*, 2023).

### Đồng nuôi cấy chủng phân lập và nấm men *C. albicans*

Chủng phân lập cho vòng ức chế tốt nhất thu được ở thí nghiệm trên được nuôi hoạt hóa qua đêm trong 8 mL môi trường lỏng MRS ở 37°C. Cùng lúc đó, *C. albicans* được hoạt hóa qua đêm trong 10 mL môi trường lỏng YPD ở 30°C, 150 vòng/ phút. Giá trị OD<sub>600nm</sub> của canh trường vi khuẩn và nấm men được xác định và tính toán thể tích cấp vào 20 mL môi trường lỏng MRS sao cho giá trị OD<sub>600nm</sub> cuối của nấm men và vi khuẩn là 0,1. Sau khi cấp giống, các bình tam giác được nuôi lắc ở 150 vòng/ phút, 37°C. Mẫu kiểm chứng là *C. albicans* và chủng phân lập được nuôi riêng rẽ trong các bình tam giác chứa 20 mL môi trường lỏng MRS. Buồng đếm hồng cầu được sử dụng để khảo sát số tế bào nấm men sinh trưởng và phát triển (Lima, 2019).

### Chuẩn bị dịch ly tâm loại sinh khối CFS

Chủng phân lập cho vòng ức chế tốt nhất được nuôi trong môi trường lỏng MRS ở 37°C trong 24 giờ. Canh trường vi khuẩn sau đó được ly tâm lạnh 10000 vòng/ phút trong 20 phút ở 4°C để thu phần dịch nổi sau ly tâm. Dịch ly tâm loại sinh khối sau đó được chia làm hai phần, với một phần giữ nguyên pH ban đầu và phần còn lại được trung hòa pH đến 7 bằng NaOH 3N. Lọc dịch bằng màng lọc 0,22 µm, thu và bảo quản ở -20°C.

### Đánh giá khả năng ức chế hình thành màng sinh học *C. albicans* của dịch ly tâm loại sinh khối CFS

*C. albicans* được nuôi cấy qua đêm trong 10 mL môi trường lỏng YPD ở 30°C, 150 vòng/ phút. Hút 10 µL canh trường nấm men *C. albicans* (điều chỉnh về 10<sup>7</sup> CFU/ mL) phân phối vào đĩa 96 giếng. Thêm 140 µL môi trường YPD bổ sung 2,5% glucose phủ lên trên các giếng. Bổ sung thể tích của dịch ly tâm CFS theo các nồng độ 40%, 1/2, 1/4 và 1/8 của nồng độ dịch CFS 40% vào các giếng. Giếng chứa *C. albicans* và môi trường không bổ sung CFS là kiểm chứng dương. Ủ giếng ở 35°C trong 48 giờ. Sau thời gian ủ, tiến hành rửa nhẹ các mẫu 3 lần với đệm Phosphate Buffered Saline (PBS, pH = 7) vô trùng. Để khô và cố định màng bằng 200 µL methanol 99% trong 15 phút. Tiến hành loại bỏ dung dịch methanol và để khô trong 5 phút. Màng sinh học được giữ bằng 200 µL thuốc nhuộm tím tinh thể Crystal Violet trong 5 phút. Các giếng sau đó được rửa nhẹ nhàng bằng nước cất vô trùng nhằm giữ lại các phần màng sinh học đã bắt thuốc nhuộm và để khô. Bổ sung 160 µL acid acetic 33% để hòa tan và giải phóng thuốc tím. Kết quả được quan sát và đo ở bước sóng 540nm. Khả năng ức chế hình thành màng sinh học của chủng phân lập được tính toán theo công thức sau: % ức chế hình thành màng sinh học =  $(1 - \frac{OD_1}{OD_2}) \times 100\%$ , trong đó OD<sub>1</sub> là độ hấp thụ của giếng chứa *C. albicans* có bổ sung dịch CFS, OD<sub>2</sub> là độ hấp thụ của giếng chứa *C. albicans* không bổ sung dịch CFS (García-Gamboa *et al.*, 2022).

### Định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Chủng phân lập cho khả năng ức chế nấm mạnh nhất được chọn để tách chiết DNA tổng số và khuếch đại vùng gen 16S rRNA bằng cặp mồi đặc hiệu 27F và 1492R. Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn được so sánh với các trình tự trong ngân hàng dữ liệu của NCBI bằng công cụ BLAST. Tỷ lệ tương đồng với các trình tự trên cơ sở dữ liệu là cơ sở để định danh vi khuẩn đối kháng.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả phân lập vi khuẩn sinh acid lactic

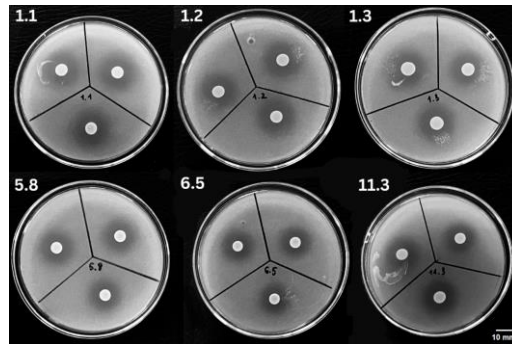
Kết quả thí nghiệm đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn sinh acid lactic dựa trên đặc điểm về kích thước và hình thái khuẩn lạc, kích thước vòng hòa tan quan sát được sau 48 giờ nuôi cấy. Chủng phân lập đa số có hình thái khuẩn lạc tròn, bề mặt nhẵn đến hơi lồi và màu từ trắng sữa đến trắng sữa hơi vàng. Hình thái tế bào được quan sát ở độ phóng đại 1000 lần cho thấy đa số có dạng hình que và hình que ngắn, đều ghi nhận là Gram dương, có thử nghiệm oxidase và catalase âm tính. Các đặc điểm hình thái, sinh hóa của các chủng phân lập được thể hiện ở bảng 1 dưới đây.

**Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng phân lập sau 2 ngày nuôi cấy**

Chủng	Đường kính vòng hòa tan (mm)	Đường kính khuẩn lạc (mm)	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
1.1	10	4	Tròn, bề mặt hơi lồi, bóng, trắng sữa hơi vàng	Hình que, Gram dương
1.2	4	1,5	Tròn, bề mặt lồi, bóng, trắng sữa hơi ánh vàng	Hình que ngắn, nổi đôi, Gram dương
1.3	5	2,5	Tròn, bề mặt nhẵn, bóng, trắng hơi vàng	Hình que, nổi chuỗi, Gram dương
5.8	5	2	Tròn, bề mặt lồi, trắng sữa	Hình que ngắn, nổi đôi, Gram dương
6.5	4	2,5	Tròn, bề mặt lồi, bóng, trắng hơi vàng	Hình que, Gram dương
11.3	7	3	Tròn, bề mặt hơi lồi, bóng, trắng sữa	Hình que ngắn, nổi đôi, Gram dương

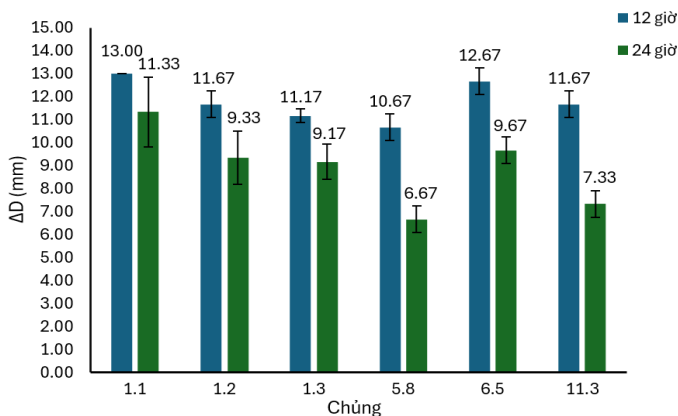
**Khả năng kháng *C. albicans* của các chủng phân lập**

Sau quá trình phân lập, sáu chủng LAB được đánh giá khả năng kháng nấm sơ bộ sử dụng phương pháp đổ thạch hai lớp. Kết quả cho thấy cả sáu chủng bước đầu đều cho hoạt tính kháng nấm với khoảng vùng trong xung quanh bề mặt giọt vi khuẩn là vùng xảy ra sự ức chế và ngoài vùng đó nấm men vẫn có sự phát triển bình thường (Hình 1).



**Hình 1. Khả năng kháng nấm *C. albicans* của các chủng phân lập**

Kết quả được quan sát sau 12 giờ nuôi cấy và 24 giờ nuôi cấy nhằm kiểm tra hoạt tính ức chế và khả năng kéo dài thời gian ức chế nấm men của các chủng phân lập. Hình 2 cho thấy chủng 1.1 sau 12 và 24 giờ đều cho hoạt tính kháng nấm mạnh mẽ nhất với khả năng ức chế nấm tương ứng là 13 và 11,33 mm. Kết quả có phần tiềm năng và khả quan hơn so với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Tăng Phú và Nguyễn Thị Liên (2019) khi sử dụng 48 dòng vi khuẩn LAB được phân lập từ mẫu sữa mẹ và phân trẻ em chỉ ghi nhận 1 dòng vi khuẩn HF4.2 có khả năng kháng lại *C. albicans* với  $\Delta D$  là 5,67 mm (Phú, Liên, 2019). Chủng 1.1 cho khả năng kháng tốt nhất được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

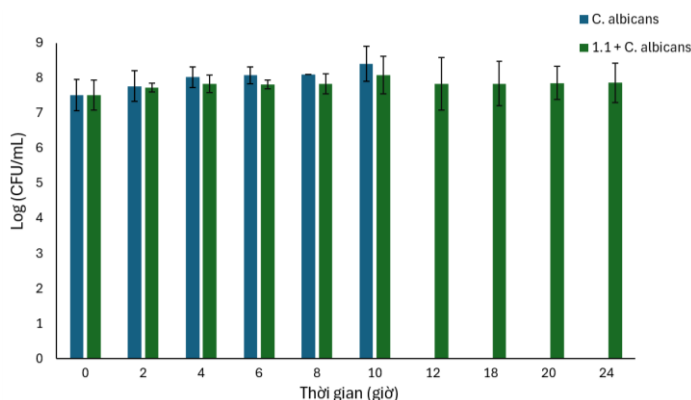


**Hình 2. Khả năng ức chế sự phát triển nấm men *C. albicans* của các chủng phân lập sau 12 và 24 giờ**



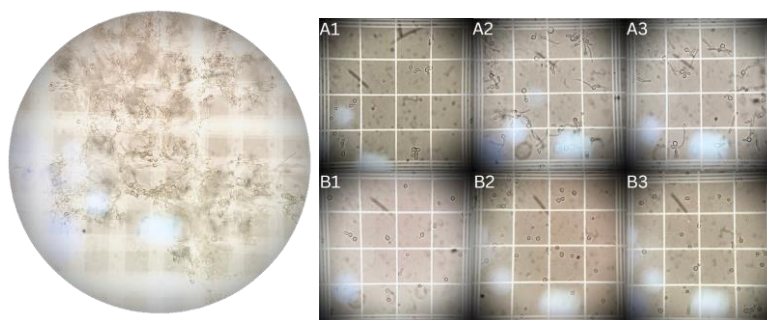
### Kết quả đồng nuôi cấy chủng phân lập với nấm men *C. albicans*

Ảnh hưởng trực tiếp giữa chủng phân lập 1.1 với nấm men *C. albicans* trong quá trình sinh trưởng được thử nghiệm sử dụng phương pháp đồng nuôi cấy. Có thể thấy đã có sự ức chế phát triển nấm men khi cùng nuôi cấy với chủng 1.1, điều đó được thể hiện qua việc số lượng tế bào nấm men qua các giờ đều phát triển chậm hơn so với mẫu kiểm chứng *C. albicans*. Tại thời điểm từ 2 – 10 giờ, mẫu kiểm chứng (*C. albicans*) có số lượng tế bào tăng từ 7,77 log lên 8,41 log (tăng 0,64 log), trong khi đối với mẫu đồng nuôi cấy (1.1 + *C. albicans*), giá trị tế bào ghi nhận tăng từ 7,73 log lên 8,08 log (tăng 0,35 log). Có thể thấy, trong quá trình phát triển, LAB gây ra sự cạnh tranh về dinh dưỡng, sinh ra acid hữu cơ làm giảm pH môi trường, cũng như có thể đã tiết ra các hợp chất khác từ đó có tác động đến mầm bệnh và làm giảm sự sinh trưởng của chúng. Bên cạnh đó, sau 24 giờ nuôi cấy, giá trị số tế bào sống của *C. albicans* khi cùng nuôi với chủng 1.1 duy trì ở khoảng 7,87 log (Hình 3).



Hình 3. Kết quả đồng nuôi cấy chủng phân lập 1.1 và *C. albicans*

Có thể kết luận rằng, sự tác động của LAB 1.1 đã giúp ức chế sự sinh trưởng và phát triển của *C. albicans*, và khả năng ức chế này được kéo dài đến 24 giờ theo dõi. Kết quả mẫu kiểm chứng *C. albicans* chỉ được ghi nhận đến thời điểm 10 giờ do trong quá trình nuôi cấy ghi nhận có sự thay đổi hình thái từ nấm men sang dạng nấm men chuyển đổi sợi nấm – một yếu tố độc lực quan trọng của *C. albicans*. Trạng thái tồn tại ở cả dạng nấm men và dạng nấm men chuyển đổi sợi nấm đã được quan sát thấy kể từ sau 2 giờ nuôi cấy. Từ sau thời điểm 10 giờ, trạng thái sợi nấm chiếm ưu thế hơn, dẫn đến khó khăn trong việc quan sát và đếm tế bào khi sử dụng buồng đếm hồng cầu. Tại thời điểm 24 giờ, dạng sợi nấm phát triển và tạo thành các pellet gần như bao phủ lên buồng đếm hồng cầu (Hình 4).



Hình 4. Hình thái tế bào nấm quan sát bằng buồng đếm hồng cầu

(Ghi chú: Bên trái: Hình thái tế bào sợi nấm *C. albicans* ở mẫu kiểm chứng tại thời điểm 24 giờ

Bên phải: A1, A2, A3: Mẫu kiểm chứng *C. albicans* tại các thời điểm 0, 12, 24 giờ

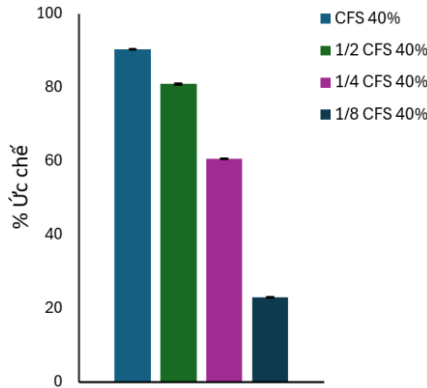
B1, B2, B3: Mẫu đồng nuôi cấy 1.1 + *C. albicans* tại các thời điểm 0, 12, 24 giờ)

Ngược lại, đối với *C. albicans* khi đồng nuôi cấy cùng chủng phân lập 1.1, không quan sát thấy hiện tượng chuyển hình thái giữa nấm men – sợi nấm. Hình thái tế bào nấm men tồn tại duy nhất và duy trì trong suốt 24 giờ theo dõi (Hình 4). Điều này cho thấy trong quá trình nuôi cấy, bên cạnh việc ức chế sự phát triển của nấm men, chủng phân lập 1.1 còn biểu hiện khả năng ức chế hình thành sợi nấm của *C. albicans*. Được cho là một yếu tố độc lực quan trọng của *C. albicans*, trạng thái sợi nấm đóng vai trò tiên quyết trong việc bám dính và xâm lấn vào các tế bào biểu mô, từ đó dẫn đến tổn thương các mô. Chính vì vậy, hạn chế hình thành sợi nấm được cho là một mục tiêu hấp dẫn trong việc điều trị và giúp cân bằng, duy trì trạng thái hội sinh của nấm men *C. albicans*.

### Khả năng ức chế hình thành màng sinh học của dịch ly tâm loại sinh khối CFS

Việc điều trị nhiễm nấm *Candida* một phần gặp khó khăn do khả năng hình thành màng sinh học trên các bề mặt sinh học và phi sinh học của chúng. Trong thí nghiệm này, các nồng độ khác nhau của dịch CFS sẽ được bổ

sung và thử khả năng ức chế hình thành màng sinh học dựa vào phương pháp nhuộm màu tím tinh thể crystal violet. Kết quả thí nghiệm thể hiện ở hình 5 dưới đây cho thấy tất cả các nồng độ chiết suất của dịch CFS đều cho khả năng ức chế hình thành màng sinh học *C. albicans*. Theo đó, khả năng ức chế tốt nhất được ghi nhận khi bổ sung thêm dịch CFS 40%, với kết quả giảm hình thành màng sinh học lên tới khoảng 90,25%. Với các nồng độ 1/2, 1/4 và 1/8 CFS 40%, kết quả thu được giảm dần là 80,87%; 60,62% và 22,96%. Kết quả thể hiện là tương đối khả quan khi đánh giá ở giá trị 1/4 dịch CFS 40% bổ sung, khả năng ức chế hình thành màng sinh học vẫn đạt được tới 60%.



Hình 5. Khả năng ức chế hình thành màng sinh học *C. albicans* của dịch ly tâm CFS từ chủng phân lập 1.1

Tác giả Zeinab S. Hashem và Ahmed S. Hashem (2021) khi nghiên cứu về khả năng ức chế hình thành màng sinh học của các loài *Candida* sử dụng dịch CFS của *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus acidophilus* cho hiệu quả trung bình là từ 50 – 72% và 74 – 85% (Hashem, Hashem, 2021). García-Gamboa và đồng tác giả (2022) khi bổ sung 50% dịch CFS của *Lactobacillus rhamnosus* cho thấy hiệu quả giảm hình thành màng sinh học đạt 88,25% (García-Gamboa et al., 2022). Nhìn chung, hoạt tính ức chế hình thành màng sinh học của dịch CFS có thể liên quan đến một số khả năng như hình thành các acid hữu cơ gây acid hóa nội bào, ảnh hưởng đến sự trao đổi chất của tế bào, cũng như tiết ra các chất có khả năng thay đổi tính chất lý hóa của bề mặt như chất hoạt động bề mặt sinh học, ... Kết quả bước đầu chứng minh khả năng tồn tại các hợp chất có tác dụng ức chế sự hình thành màng sinh học, và hiệu quả ức chế là khá tiềm năng.

**Kết quả định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự đoạn gen 16S rRNA**

Kết quả so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA của chủng phân lập 1.1 với trình tự gen của các loài vi khuẩn khác trong cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI cho thấy, trình tự vùng gen 16S rRNA của chủng 1.1 có độ tương đồng cao nhất với trình tự của loài vi khuẩn *Lactobacillus pentosus* (*L. pentosus*). Peptide TV35B có chiều dài trung bình được tinh chế từ *L. pentosus* chính là 1 trong 2 hợp chất bản chất protein có khả năng kháng nấm *C. albicans* đã được công bố và ghi nhận cho đến nay (Magnusson, 2003). García-Hernández và đồng tác giả (2016) cũng đã phân lập được một chủng *L. pentosus* LB-31 từ phân gà cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ cũng như khả năng chịu được muối mật và pH thấp (García-Hernández et al., 2016).

Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự 16S rRNA của chủng phân lập 1.1

Tên chủng	Mã truy cập	Độ bao phủ	Độ tương đồng
<i>Lactobacillus pentosus</i> F087A	MT846003.1	100%	99,93%
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> HBUAS59039	QM301925.1	100%	99,86%
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> 15261	MW463767.1	100%	99,86%

**KẾT LUẬN**

Từ mẫu ruột gà mua tại chợ Hoàng Mai, Hà Nội, kết quả đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn sinh acid lactic. Thử nghiệm cho thấy cả 6 chủng đều cho hoạt tính kháng nấm *C. albicans* với khả năng ức chế nấm từ 9,33 – 13 mm sau 12 giờ quan sát. Chủng phân lập 1.1 thể hiện khả năng ức chế tốt nhất quan sát được sau 12 và 24 giờ nuôi cấy. Tương tác trực tiếp giữa chủng 1.1 và nấm men *C. albicans* cũng đã được nghiên cứu và kết quả cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của *C. albicans*. Bên cạnh đó, chủng phân lập 1.1 cũng thể hiện hoạt tính ức chế hình thành sợi nấm xâm lấn của *C. albicans*, qua đó cho thấy tiềm năng trong việc tác động và ức chế các yếu tố độc lực quan trọng của *C. albicans*. Dịch ly tâm loại sinh khối của chủng phân lập 1.1 cũng cho thấy tiềm năng trong việc ức chế hình thành màng sinh học – một yếu tố độc lực khác của chủng nấm men gây bệnh này. Hệ số ức chế cao nhất lên tới 90% đối với dịch ly tâm được giữ nguyên chưa qua xử lý. Kết quả định danh chủng 1.1 xác định sự tương đồng gần nhất với loài *L. pentosus*.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Atanasov N, Evstatieva Y, Nikolova D (2023). Antagonistic Interactions of Lactic Acid Bacteria from Human Oral Microbiome against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Microorganisms*, 11(6): 1604.
- Barantsevich N, Barantsevich E (2022). Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. *Antibiotics*, 11(6): 718.
- Lima CDA (2019). Physiological studies of co-cultivating *Candida albicans* or *Candida glabrata* in the presence of *Lactobacillus reuterii*. *MSc thesis. Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico Av. Rovisco Pais 1, Lisboa, Portugal.*
- García-Gamboa R, Domínguez-Simi M, Gradilla-Hernández MS, Bravo J, Moya A, Ruiz-Álvarez B, González-Avila M (2022). Anticandidal and Antibiofilm Effect of Synbiotics including Probiotics and Inulin-Type Fructans. *Antibiotics*, 11(8): 1135.
- García-Hernández Y, Pérez-Sánchez T, Boucourt R, Balcázar JL, Nicoli JR, Moreira-Silva J, Rodríguez Z, Fuertes H, Nuñez O, Albelo N, Halaihel N (2016). Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Res Vet Sci*, 108: 125–132.
- Hashem ZS, Hashem AS (2021). An in vitro study on the antifungal and antibiofilm activities of probiotic bacteria against *Candida* species isolated from orthodontic appliances and dental caries. *Novel Research in Microbiology Journal*, 5(2): 1176–1193.
- Jeanmonod R, Chippa V, Jeanmonod D (2024). Vaginal Candidiasis. *StatPearls*.
- Magnusson J (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. *Doctor's dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences.*
- Phú NT, Liên NT (2019). ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA VI KHUẨN ACID LACTIC PHÂN LẬP TỪ SỮA MẸ VÀ PHÂN TRỂ EM. *Tạp Chí Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ*, 55(2): 41–48.
- Vazquez-Munoz R, Dongari-Bagtzoglou A (2021). Anticandidal Activities by *Lactobacillus* Species: An Update on Mechanisms of Action. *Frontiers in Oral Health*, 2: 689382.

## ISOLATION, SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA STRAINS AND EVALUATION OF THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *CANDIDA ALBICANS*

Le Phuong Linh<sup>1</sup>, Ho Thi Quynh<sup>1</sup>, Le Sy Phan Anh<sup>2</sup>, Le Thi Hai Yen<sup>1</sup>, Nguyen Thanh Hoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

<sup>2</sup>Faculty of Biology, Hanoi University of Science

**SUMMARY**

The research focused on isolating and selecting of lactic acid bacteria from chicken intestines obtained from Hoang Mai market, Hanoi and evaluating their antagonistic effect on the opportunistic pathogen *Candida albicans*. The antagonistic activity of the isolated strains was assessed using the dual agar overlay method, co – culture technique, and the cell – free supernatants (CFS) was also used to evaluate the ability to inhibit biofilm formation of *Candida albicans*. The results showed that 6 strains of lactic acid bacteria were isolated based on color and size of colony morphology and size of the calcium solubilization. All 6 strains exhibited promising antifungal results, with strain 1.1 demonstrating the strongest activity. Through 16S rRNA sequencing analysis, the strain 1.1 was most closely related to *Lactobacillus pentosus*. The experimental results indicate the biotechnological potential of using lactic acid bacteria in preventing *Candida* fungal infections.

**Keywords:** *Candida albicans*, antifungal, LAB, isolation, lactic acid bacteria.

\* Author for correspondence: Tel: 0374869808; Email: hoa.nguyenthanh@hust.edu.vn

# ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH PROBIOTICS VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CHỦNG *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D3 VÀ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D5

Dương Diệu Linh<sup>1</sup>, Nguyễn Thùy My<sup>1</sup>, Lê Thị Hải Yên<sup>1</sup>, Lê Sỹ Phan Anh<sup>2</sup>, Nguyễn Thanh Hòa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

## TÓM TẮT

Vi khuẩn axit lactic (LAB) là một loại lợi khuẩn đã được chứng minh là an toàn (GRAS) và có nhiều ứng dụng trong cuộc sống. *Lactobacillus* là chi lớn nhất trong nhóm vi khuẩn lactic, chúng cũng được chứng minh có nhiều đặc tính có lợi như: lên men thực phẩm, kháng khuẩn, tạo nhiều enzyme ứng dụng trong công nghiệp,... Nhóm nghiên cứu đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* và sàng lọc khả năng kháng nấm *Candida albicans* của chúng. Chủng D3 và D5 có hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* ATCC10231 tốt nhất đã được thử nghiệm trước đó và được lựa chọn cho nghiên cứu này nhằm mục đích xác định khả năng sống sót của hai chủng này trong môi trường pH thấp và môi trường chứa nồng độ axit muối mật cao của chúng. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hai chủng nghiên cứu không có khả năng sống sót ở môi trường có pH = 2 sau 2 giờ nuôi cấy. Môi trường pH = 3 không làm ảnh hưởng đến khả năng sống sót của chủng D3, tuy nhiên có tác động đến khả năng sống sót của chủng D5 (số lượng tế bào giảm 2log so với mẫu kiểm chứng tại thời điểm 3 giờ sau nuôi cấy). Cả hai chủng đều phát triển tốt trong môi trường có nồng độ muối mật 0.3%, số lượng tế bào gần như không có sự thay đổi sau 4 giờ nuôi cấy. Hai chủng cũng cho thấy khả năng kháng *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* tương đối tốt với đường kính vòng kháng từ 14,17 – 22 mm. Kết quả này cũng cho thấy được tiềm năng ứng dụng của chúng trong phát triển các sản phẩm probiotics có hoạt tính kháng nấm cũng như kháng khuẩn.

*Từ khóa:* Kháng khuẩn, *Lactobacillus*, môi trường pH thấp, muối mật, thực phẩm lên men, vi khuẩn lactic.

## MỞ ĐẦU

Vi khuẩn axit lactic (LAB) là một nhóm vi khuẩn có khả năng lên men cacbohydrate thành axit lactic là sản phẩm chính hoặc sản phẩm duy nhất. LAB là vi khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, cầu khuẩn không di động hoặc hình que, có thể hô hấp kỵ khí hoặc hiếu khí tùy tiện, catalase âm tính, có khả năng chịu đựng cao đối với pH thấp. Chúng là vi khuẩn không gây bệnh và được chứng minh là an toàn (GRAS) (Mozzi, 2015). Ngoài axit lactic, nhiều loài vi khuẩn LAB còn có khả năng tạo ra các chất ức chế sinh trưởng như bacteriocin, hydrogen peroxide, diacyls,... ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm và mầm bệnh (Mokoena, 2017). *Lactobacillus* là chi lớn nhất trong nhóm vi khuẩn lactic và có 168 loài thuộc chi này đã được phát hiện cho đến nay. *Lactobacillus* là vi khuẩn kỵ khí tùy tiện, vi khuẩn gram dương, catalase âm tính, không hình thành bào tử, hình que, có khả năng lên men đường tạo ra axit lactic (Ibrahim Salam, 2016). Chúng là những sinh vật có nhu cầu dinh dưỡng phức tạp bao gồm carbohydrate, acid amin, peptit, bazo nucleic, axit béo vitamin và khoáng chất. Đa số các loài *Lactobacillus* đã được phân lập từ đường tiêu hóa của người và động vật. Ngoài ra, *Lactobacillus* còn được tìm thấy từ rau và các sản phẩm lên men của chúng, thực vật (đặc biệt là thực vật đang thối rữa), ngũ cốc, sữa và các sản phẩm lên men từ sữa,... (Mokoena, 2017). Vi khuẩn *Lactobacillus* là vi sinh vật an toàn và có nhiều ứng dụng to lớn trong công nghiệp thực phẩm, công nghệ sinh học, y học; chúng còn là lợi khuẩn không thể thiếu trong hệ tiêu hóa của người và động vật. *Lactobacillus* thường được chọn làm men vi sinh vì thể hiện nhiều đặc tính quan trọng như: khả năng chịu acid và muối mật cao, khả năng bám vào bề mặt ruột, ức chế các loài có khả năng gây bệnh (hoạt tính kháng khuẩn), kháng kháng sinh, sản xuất exopolysacarides và loại bỏ cholesterol...

Chúng tôi đã phân lập được các chủng vi khuẩn lactic từ nước dưa chua mua tại chợ Hoàng Mai, quận Hoàng Mai, Hà Nội và đánh giá hoạt tính kháng nấm của chúng, đặc biệt là khả năng kháng nấm *Candida albicans* ATCC10231. Kết quả đánh giá cho thấy rằng chủng D3 và D5 có khả năng kháng nấm *C. albicans* mạnh nhất với đường kính vòng kháng lên tới 15mm (số liệu không thể hiện). Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định khả năng sống sót của hai chủng này trong môi trường pH thấp và môi trường chứa nồng độ axit muối mật cao, đây là môi trường mô phỏng hệ tiêu hóa của con người. Đồng thời, khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* của hai chủng lactic này cũng được nghiên cứu sơ bộ thông qua phương pháp đổ thạch hai lớp.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Hai chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* (D3 và D5) được phân lập từ nước dưa chua mua tại chợ Hoàng Mai, quận Hoàng Mai, Hà Nội. Các chủng vi khuẩn chỉ thị bao gồm: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 từ Bệnh viện bệnh Nhiệt đới Trung ương cơ sở 2.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp xác định khả năng chịu pH thấp của chủng

Các chủng đã phân lập được nuôi cấy riêng rẽ trong 5mL môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 24 giờ. Hút 100 microlit canh trường vào 5mL môi trường MRS đã điều chỉnh pH về giá trị 2 và 3 bằng HCl 1N. Ủ ở 37°C trong 3 giờ, sau đó hút 100 microlit canh trường sau mỗi giờ khảo sát đem trang đều trên đĩa thạch chứa môi trường MRS. Nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Làm tương tự với mẫu kiểm chứng dương (các chủng thí nghiệm được nuôi cấy trong 5mL môi trường MRS có pH=7).

#### Phương pháp xác định khả năng sống trong môi trường chứa muối mật

Khả năng sống trong môi trường có muối mật của các chủng vi sinh vật được kiểm tra bằng cách ủ tế bào trong môi trường MRS lỏng chứa 0,3% muối mật. Khả năng này được đánh giá dựa trên số lượng khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri sau khi ủ tế bào ở 37°C trong các khoảng thời gian 0, 1, 2, 3 và 4 giờ, tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong ruột non.

#### Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn

##### Phương pháp kẻ một đường thẳng

Thử nghiệm này sử dụng phương pháp đồ thạch hai lớp đã biến đổi (overlay method) được tham khảo từ nghiên cứu của Muhammad Saleem Kalhoro (2023) và Hong – Jae Lee (2023) (Kalhoro *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023). Đầu tiên, nuôi cấy sinh *E. coli* và *S.aureus* trong 5 mL môi trường LB lỏng ở 37°C, 150 rpm, trong 24 giờ. Lấy một lượng khuẩn lạc vi khuẩn Lactic kẻ thành một đường thẳng trên đĩa MRS agar, nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, phủ lên bề mặt thạch bằng một lớp 10 mL môi trường LB bán rắn (0,7% agar) đã trộn với 1% (v/v) canh trường vi khuẩn chỉ thị (đã điều chỉnh về OD<sub>600nm</sub> = 1). Môi trường LB bán rắn được để trong bể ổn nhiệt ở 55°C trước khi trộn với vi khuẩn chỉ thị. Đĩa thạch được ủ trong 24 giờ ở 37°C và quan sát vòng ức chế xuất hiện quanh đường khuẩn lạc.

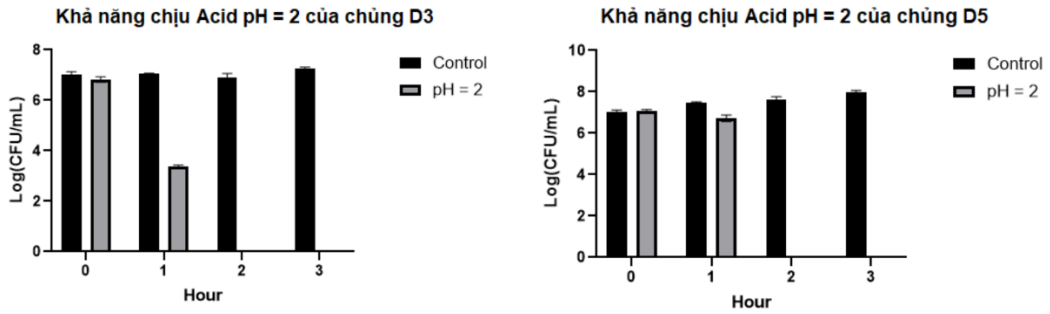
##### Phương pháp nhỏ giọt

Thử nghiệm này sử dụng phương pháp đồ thạch hai lớp (overlay method) được tham khảo từ nghiên cứu của Zhixiang Qian (2020), Muhammad Saleem Kalhoro (2023) và Hong – Jae Lee (2023) (Kalhoro *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023; Qian *et al.*, 2020). Đầu tiên, nuôi cấy sinh vi khuẩn LAB đã phân lập trong 5 mL môi trường MRS lỏng ở 37°C, 150 rpm, trong 24 giờ. Nhỏ 3 µL canh trường vi khuẩn lactic (đã điều chỉnh về OD<sub>600nm</sub> = 1) lên đĩa môi trường MRS agar, để khô rồi đem ủ ở 37°C, 24 giờ. Tiếp theo, nuôi cấy sinh vi khuẩn *E.coli* và *S.aureus* trong 5 mL môi trường LB lỏng ở 37°C, 150rpm, trong 24 giờ. Sau đó, phủ lên bề mặt thạch bằng một lớp 10 mL môi trường LB bán rắn (0,7% agar) đã trộn với 1% (v/v) canh trường vi khuẩn chỉ thị (đã điều chỉnh về OD<sub>600nm</sub> = 1). Môi trường LB bán rắn được để trong bể ổn nhiệt ở 55°C trước khi trộn với khuẩn chỉ thị. Đĩa thạch được ủ trong 24 giờ ở 37°C và quan sát vòng ức chế xuất hiện quanh khuẩn lạc. Vi khuẩn được xem là có khả năng ức chế nếu đường kính vòng ức chế rộng hơn 2 mm.

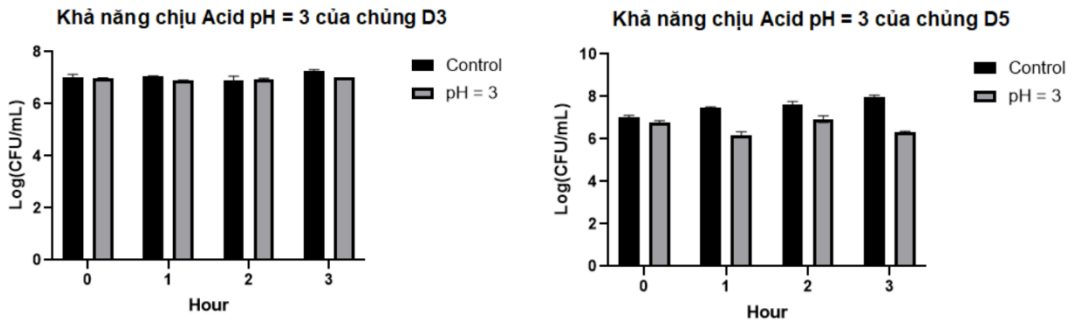
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả khả năng chịu pH thấp của chủng

Kết quả nghiên cứu khả năng tồn tại của *Lactobacillus* trong môi trường acid thấp được điều chỉnh bằng acid HCl để giả lập như môi trường acid của dạ dày. Tại giá trị pH = 2, cả 2 chủng D3 và D5 đều không có tế bào vi khuẩn nào sống sót sau 2 giờ đầu tiên, chứng tỏ vi khuẩn này không thể tồn tại trong môi trường acid khắc nghiệt (Hình 1). Khả năng phát triển và tồn tại của chủng D5 đã có sự giảm đáng kể tại giá trị pH = 3, trong khi chủng D3 vẫn duy trì số lượng tế bào như ban đầu (Hình 2). Chan HK và đồng tác giả báo cáo rằng các acid như acid clohydric (HCl) cũng được tìm thấy trong dạ dày của con người và phá vỡ các phân tử sinh học của tế bào như acid béo, protein và DNA. Môi trường pH thấp có thể ức chế quá trình trao đổi chất và làm giảm sự phát triển cũng như khả năng tồn tại của *Lactobacillus* (Sahadeva *et al.*, 2011). Các nghiên cứu khác cũng cho rằng việc tiếp xúc với acid dạ dày có pH ≤ 2 sau 3 giờ ủ làm giảm đáng kể số lượng vi khuẩn sống sót. Theo Prasad và Chan, điểm ngưỡng để xác định trạng thái kháng acid được đặt ở pH = 2 và pH = 3 trong thời gian ủ 3 giờ vì nó mô phỏng sự cư trú của vi khuẩn trong dạ dày (Prasad *et al.*, 1998).



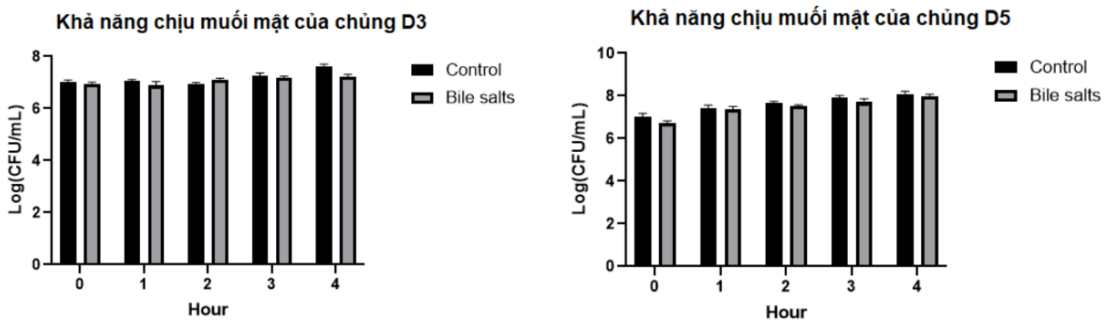
Hình 1. Khả năng chịu Acid pH = 2 của hai chủng D3 và D5



Hình 2. Khả năng chịu Acid pH = 3 của hai chủng D3 và D5

**Kết quả khả năng sống trong môi trường chứa muối mật**

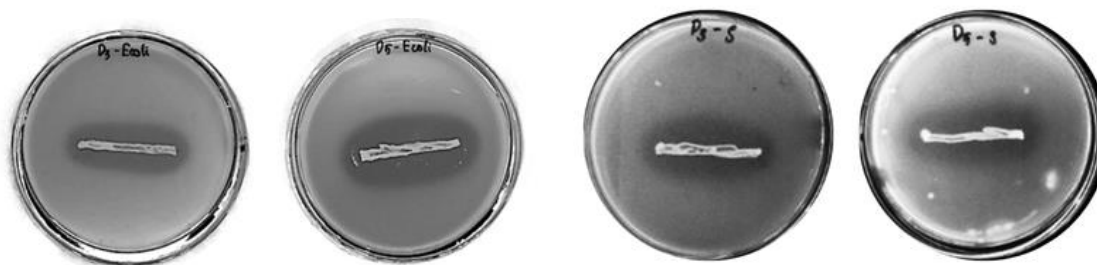
Khả năng chịu nồng độ muối mật 0.3% được khảo sát sau 4 giờ ủ và có lấy mẫu sau mỗi giờ (Hình 3). Cả hai chủng D3 và D5 đều tồn tại và phát triển trong môi trường muối mật. So sánh số lượng khuẩn lạc khi nuôi ở môi trường có và không có muối mật tốc độ phát triển của chủng không thay đổi nhiều, chỉ có chủng D3 thể hiện sự kém thích nghi hơn so với mẫu kiểm chứng sau 4 giờ nuôi cấy. Tóm lại, hai chủng này cho kết quả kháng muối mật tốt sau 4 giờ ủ. Theo S. Mandal sau khi vi khuẩn tiếp xúc với muối mật, sự phá vỡ cân bằng nội môi tế bào xảy ra dẫn đến sự phân ly và phá vỡ tính nguyên vẹn của lớp màng kép lipid và protein làm giảm số lượng vi khuẩn và cuối cùng tế bào chết (Mandal *et al.*, 2006).



Hình 3. Khả năng chịu muối mật nồng độ 0.3% của hai chủng D3 và D5

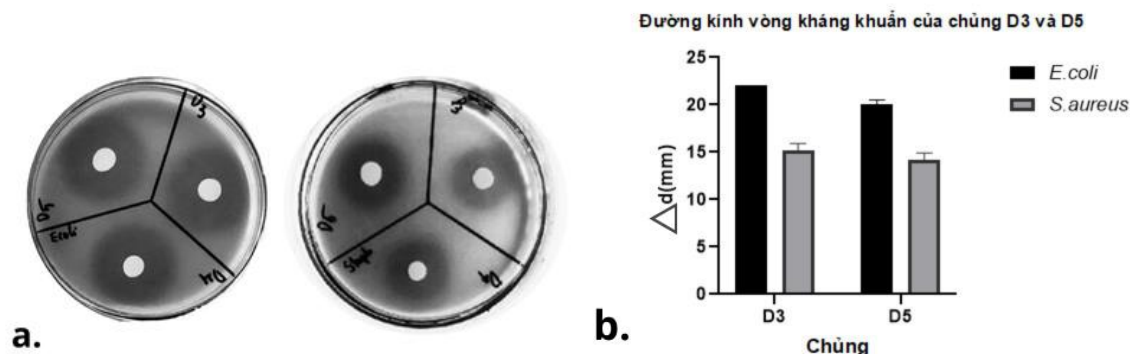
**Kết quả khả năng kháng khuẩn của chủng**

Kết quả thử nghiệm đã cho thấy xung quanh đường nuôi cấy *Lactobacillus* xuất hiện vùng kháng khuẩn tương đối rõ rệt, tại đó hai loại vi khuẩn chỉ thị không phát triển (vùng có màu trong hơn xung quanh). Ngoài vùng kháng khuẩn, vi khuẩn vẫn phát triển bình thường (Hình 4). Qua thử nghiệm này có thể bước đầu khẳng định cả 2 chủng *Lactobacillus* nghiên cứu đều có khả năng kháng lại *E.coli* và *S.aureus*.



Hình 4. Khả năng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5

Sau thử nghiệm định tính khả năng kháng hai vi khuẩn chỉ thị của các chủng D3 và D5, thử nghiệm sử dụng phương pháp nhỏ giọt đã được thực hiện như một cách định lượng khả năng kháng khuẩn của các chủng nghiên cứu. Phương pháp này là một phương pháp khá phổ biến để xác định và so sánh chính xác tính kháng khuẩn, kháng nấm của các chủng lợi khuẩn. Kết quả thu được ở Hình 5 cho thấy, cả hai chủng D3 và D5 đều kháng lại *E.coli* mạnh hơn *S.aureus*. Đường kính vòng kháng *E.coli* và *S.aureus* của D3 lần lượt là 22 mm và 15,17 mm. Đối với chủng D5 thì các con số tương ứng là 20 mm và 14,17 mm. Theo kết quả này có thể thấy rằng chủng D3 có khả năng kháng lại hai loại vi khuẩn chỉ thị mạnh hơn chủng D5. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu trước đây như của Muhammad Saleem Kalhoro và đồng tác giả (2022) đối với chủng *Lactobacillus* phân lập từ sữa trâu thô nhằm kháng vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 (đường kính vòng kháng 16,6 – 19,3 mm) và vi khuẩn *S.aureus* với đường kính vòng kháng 17,3 – 20,3 mm (Kalhoro *et al.*, 2023). Ở Việt Nam, Nguyễn Tăng Phú và Nguyễn Thị Liên đã thực hiện với chủng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa mẹ với đường kính vòng kháng từ 5,33 – 23,00 mm đối với *E.coli* và 2,67 – 12,67 mm đối với *S.aureus* (Phú & Liên, 2019).



Hình 5. a. Hình ảnh vòng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5; b. Kết quả thử nghiệm định lượng khả năng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng hai chủng vi khuẩn *Lactobacillus* D3 và D5 có thể sống sót và phát triển tốt ở môi trường có pH = 3 và nồng độ muối mật là 0.3%. Các chủng vi khuẩn này có khả năng tồn tại trong điều kiện pH thấp cho thấy tiềm năng trong việc sống sót trong môi trường dạ dày có độ acid cao và nồng độ muối mật ở ruột non. Khả năng kháng *E.coli* và *S.aureus* của chủng D3 và D5 đã được thử nghiệm và có kết quả tương đối cao so với các công bố trước đó với đường kính vòng kháng lớn nhất là 22 mm. Các nghiên cứu về cơ chế kháng nấm kháng khuẩn của hai chủng sẽ tiếp tục được thực hiện. Ngoài ra, các nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung vào việc đánh giá tiềm năng sử dụng hai chủng vi khuẩn này trong các sản phẩm thực phẩm chức năng và probiotic, nhằm ứng dụng vào việc phòng ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường ruột.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ibrahim Salam. A (2016). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. *Reference Module in Food Science*, 125-131.
- Kalhoro MS, Anal AK, Kalhoro DH, Hussain T, Murtaza G, & Mangi MH (2023). Antimicrobial Activities and Biopreservation Potential of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Raw Buffalo (*Bubalus bubalis*) Milk. *Oxid Med Cell Longev*, 2023: 8475995.
- Lee HJ, Lee JB, Park SY, Choi IS, & Lee SW (2023). Antimicrobial Activity of *Ligilactobacillus animalis* SWLA-1 and Its Cell-Free Supernatant against Multidrug-Resistant Bacteria and Its Potential Use as an Alternative to Antimicrobial Agents. *Microorganisms*, 11(1): 182.
- Mandal S, Puniya AK, & Singh K (2006). Effect of Alginate Concentrations on Survival of Microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int Dairy J*, 16(10): 1190–1195.

- Mokoena MP (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8): MDPI AG.
- Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Lucena-Padrós H, Ruiz-Barba JL (2013). "Induction of Bacteriocin Production by Coculture Is Widespread among Plantaricin-Producing *Lactobacillus Plantarum* Strains with Different Regulatory Operons." *Food Microbiol* 33 (1): 40–47.
- Mozzi F (2015). Lactic Acid Bacteria. In *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Inc. 501-508.
- Phú NT, & Liên NT (2019). *Đánh giá tiềm năng kháng khuẩn của vi khuẩn lactic phân lập từ sữa mẹ và phân trẻ* Title: *Determination of Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Mothers' breast Milk and Children Stools* *TÓM TẮT*. 55(2): 41–48.
- Prasad J, Gill H, Smart J, & Gopal PK (1998). Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. *Int Dairy J*, 8(12): 993-1002.
- Qian Z, Zhao D, Yin Y, Zhu H, & Chen D (2020). Antibacterial Activity of *Lactobacillus* Strains Isolated from Mongolian Yogurt against *Gardnerella vaginalis*. *BioMed Res Int*, 2020: 3548618.
- Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV, Wong SYW, & Chan, \*. (2011). Survival of Commercial Probiotic Strains to pH and Bile. *International Food Research Journal*, 18(4): 1515-1522.

## EVALUATION OF PROBIOTICS AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D3 AND *LACTOBACILLUS PLANTARUM* D5

Duong Dieu Linh<sup>1</sup>, Nguyen Thuy My<sup>1</sup>, Le Thi Hai Yen<sup>1</sup>, Le Sy Phan Anh<sup>2</sup>, Nguyen Thanh Hoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

<sup>2</sup>Faculty of Biology, VNU University of Science

### SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) is a type of probiotic that has been proven to be safe (GRAS) and has many applications in life. *Lactobacillus* is the largest genus in the lactic acid bacteria group. They have also been shown to have many beneficial properties such as: food fermentation, antibacterial ability, creating many enzymes for industrial applications, ... Six strains of *Lactobacillus* bacteria had been isolated and screened their ability to resist *Candida albicans* fungus. Two strains D3 and D5 with the best antifungal activity were selected for this study with the aim of determining the ability of these two strains to survive in low pH and high concentrations of bile salt acids environments. The results showed that the two researched strains were not able to survive in an environment with pH = 2 after 2 hours of culture. The pH = 3 environment does not affect the survival ability of strain D3, but has an impact on the survival ability of strain D5 (the number of cells decreased by 2log compared to the control sample at 3 hours after incubation). Both strains grew well in an environment with 0.3% bile salt concentration, with almost no change in cell number after 4 hours of culture. The two strains also showed relatively good resistance to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with resistance zone diameters ranging from 14.17 to 22 mm. This result also shows the potential application of the strain in developing probiotic products with antifungal and antibacterial activities.

**Keywords:** Antibacterial, *Lactobacillus*, low pH environment, bile salts, fermented foods, lactic bacteria.

\* Author for correspondence: Tel: 0374869808; Email: hoa.nguyenthanh@hust.edu.vn



# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM CỦA DẦU DỪA VÀ DỊCH CHIẾT TỎI ĐỐI VỚI NẤM MEN GÂY HẠI *Candida tropicalis* NM1 PHÂN LẬP TỪ TRÁI VẢI *Litchi chinensis* Sonn. SAU THU HOẠCH

Nguyễn Lê Huy Khanh<sup>1</sup>, Phạm Thị Ái Niệm<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Huyền<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Vải thiều (*Litchi chinensis* Sonn.) là loại trái theo mùa, mọng nước, có dinh dưỡng cao vì thế trái vải là môi trường lí tưởng để vi sinh vật gây hại xâm nhập, gây nên tổn thất về giá trị dinh dưỡng và kinh tế. Do đó việc xác định tác nhân vi sinh vật gây hại cũng như tìm các biện pháp để kiểm soát tác nhân gây hại đó là rất cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định được loài nấm gây hại ở trên trái vải và bước đầu đánh giá khả năng ức chế nấm gây hại bằng dịch chiết từ tỏi và dầu dừa. Từ các mẫu trái vải thiều bị hư hỏng, ba chủng nấm men MN1, MN2 và MN3 đã được phân lập bằng phương pháp cấy trái trên môi trường thạch YPD. Quan sát hình thái khuẩn lạc của nấm men bằng mắt thường và hình thái tế bào của nấm men bằng kính hiển vi quang học cho thấy đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 3 chủng này không có sự khác biệt đáng kể nên chủng NM1 được chọn ngẫu nhiên để định danh đến loài bằng phương pháp sinh học phân tử. Kết quả phân tích trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA* của chủng nấm men NM1 cho thấy chủng nấm men NM1 thuộc loài *Candida tropicalis* với độ tương đồng 100%. Thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo đã xác định được nấm men *Candida tropicalis* NM1 là tác nhân gây hỏng trái vải. Thử nghiệm ức chế nấm men *C. tropicalis* NM1 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho thấy dịch chiết tỏi có tính kháng nấm mạnh hơn dầu dừa và dịch phối trộn dịch chiết tỏi và dầu dừa với tỷ lệ 2:1 cho hiệu quả kháng chủng nấm men này tốt nhất (đường kính vòng kháng nấm là  $19,33 \pm 0,67$  mm). Các kết quả thu được đã cho thấy *C. tropicalis* NM1 là nấm men gây hại cho trái vải đồng thời cho thấy tiềm năng sử dụng các hỗn hợp chất tự nhiên như dầu dừa, dịch chiết tỏi trong việc kiểm soát nấm men gây hại trên trái vải thiều sau thu hoạch.

**Từ khóa:** *Candida tropicalis*, dầu dừa, dịch chiết tỏi, nấm men, trái vải thiều.

## MỞ ĐẦU

Trái vải (*Litchi chinensis* Sonn.) là loại trái cây có hàm lượng đường cao, có giá trị kinh tế cao, được trồng phổ biến ở các nước có khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Trong những năm gần đây, việc trồng vải chủ yếu phân bố sang các nước trong khu vực Đông Nam Á, trong đó Trung Quốc là nước sản xuất lớn nhất, tiếp theo là Thái Lan, Việt Nam và Ấn Độ. Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu vải lớn nhất thế giới. Tuy sản lượng vải thu hoạch lớn nhưng điều kiện thu hái, kỹ thuật bảo quản trái sau thu hoạch còn hạn chế nên chất lượng trái có xu hướng không ổn định và suy giảm, gây ảnh hưởng đến hương vị, giá trị dinh dưỡng, hiệu quả kinh tế. Một trong các tác nhân gây ra tình trạng hư hỏng trái vải sau thu hoạch là nấm bệnh. Nấm men *Candida* được phát hiện là một trong các tác nhân gây hư hỏng ở một số trái cây như cam, trà là (Oviasogie *et al.*, 2015; Aljasass *et al.*, 2016). Gần đây việc bảo quản trái cây sau khi thu hoạch từ các nguyên liệu có nguồn gốc từ tự nhiên được quan tâm. Một số hợp chất tự nhiên như dầu dừa và tỏi đều có tính kháng nấm (Ogbolu *et al.*, 2007; Agustantina, Soekartono, 2021). Vì thế, trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung xác định nấm gây hại trên trái vải cũng như thăm dò khả năng kháng nấm gây hại của 2 hợp chất tự nhiên dầu dừa và tỏi để từ đó đưa ra khuyến cáo về việc bảo quản trái vải sau thu hoạch để hạn chế thiệt hại kinh tế do nấm gây hại đó gây ra.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Các mẫu trái vải (có nguồn gốc từ tỉnh Bắc Giang) được thu thập tại các cửa hàng trái cây trên địa bàn quận Bình Tân, Thành phố Hồ Chí Minh.

Dầu dừa được mua ở dạng thương phẩm trên thị trường (Dầu dừa Organic Vietcoco, ép lạnh nguyên chất, Vietcoco).

Tỏi cô đơn Lý Sơn (Quảng Ngãi) được sử dụng. Dịch chiết tỏi được chiết xuất bằng cách xay nhuyễn tỏi với nước cất và thu dịch ép.

### Môi trường nuôi cấy

Môi trường dịch và thạch YPD thương phẩm (Titan Biotech, Ấn Độ) được sử dụng để tăng sinh, phân lập và giữ giống các chủng nấm men từ trái vải hư hỏng.

Dung dịch SPW (saline peptone water) bao gồm 10 g/L peptone, 9 g/L NaCl, dùng để pha loãng mẫu nấm men.

### Phân lập, làm thuần và lưu trữ các chủng nấm men

Chọn ngẫu nhiên các trái vải có dấu hiệu hư hỏng để tiến hành phân lập nấm men. Dùng dao vô trùng cắt 10g bao gồm thịt trái và vỏ trái cho vào môi trường lỏng YPD, sau đó tiến hành nuôi tĩnh trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy sau đó được pha loãng đến nồng độ  $10^{-5}$  bằng dung dịch SPW, rồi cấy trải trên môi trường thạch YPD. Đĩa sau đó được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24-72 giờ. Các khuẩn lạc nấm men xuất hiện được làm thuần, quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào bằng kính hiển vi quang học và được lưu trữ trong dung dịch glycerol 30% ở nhiệt độ -80°C.

### Định danh chủng nấm men được lựa chọn bằng giải trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA*

Chủng nấm men được tuyển chọn được nuôi cấy 24 giờ trên môi trường thạch YPD ở nhiệt độ phòng. Genome của chủng này được tách chiết theo phương pháp của Korabecna (2007). Sau đó, vùng ITS và LSU của gen *rRNA* được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đa năng đặc hiệu cho phổ rộng các loài nấm gồm: ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3') và LS5 (5'- TCC TGA GGG AAA CTT CG -3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: Buffer 10X, dNTP, mồi xuôi (10uM), mồi ngược (10uM), DNA khuôn (10-100ng), Tag DNA polymerase, nước cất. Chu trình phản ứng PCR bao gồm: biến tính 5 phút ở 95°C, sau đó là 30 chu kỳ 95°C 1 phút, gắn mồi ở 56°C 45 giây, kéo dài 72°C 1 phút, và cuối cùng là 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) và giải trình tự trên máy 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Kết quả giải trình tự của chủng tuyển chọn được xử lý bằng phần mềm BioEdit và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank nhờ công cụ BLAST trên NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6.

### Lây nhiễm nhân tạo chủng nấm men được tuyển chọn

Khả năng gây hại của chủng nấm men được lựa chọn được đánh giá bằng phương pháp gây bệnh nhân tạo theo nguyên tắc Koch (Burgess *et al.*, 2009). Các trái vải to khỏe, mọng nước, không dị dạng, đồng đều về kích thước và không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài được lựa chọn cho thí nghiệm. Chủng nấm men được lựa chọn được tăng sinh trong môi trường YPD lỏng ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Pha loãng dịch tăng sinh để đạt mật độ  $10^4$  cfu/mL theo nguyên cứu Aljasass và đồng tác giả (2016) với mật độ nấm gây hại từ  $10^4 - 10^7$  cfu/mL. Thí nghiệm được tiến hành với 5 nghiệm thức: (1) Trái vải nguyên không xử lí, (2) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh vào dung dịch Javen 5% rồi để ráo nước, (3) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh vào nước cất rồi để ráo nước rồi được nhúng vào dung dịch nấm men  $10^4$  cfu/mL, (4) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh nước Javen 5% rồi để ráo nước rồi tạo vết thương trên trái (không làm rách màng bao ruột trái), (5) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh nước Javen 5% rồi để ráo nước rồi tạo vết thương trên trái (không làm rách màng bao ruột trái) sau đó được nhúng vào dung dịch nấm men  $10^4$  cfu/mL. Các trái vải của từng nghiệm thức được để lên các khay khác nhau và được bảo quản bằng cách quấn màng bao thực phẩm xung quanh khay đựng. Quan sát, ghi nhận các triệu chứng trên trái vải lây bệnh nhân tạo so với trái đối chứng về màu sắc vỏ (vỏ xuất hiện màu nâu, thối, có vị chua) và thời gian bệnh phát triển (thời điểm xuất hiện bệnh lý đến khi quả hỏng hoàn toàn, phân hủy nặng). Khi kết thúc thí nghiệm, tiến hành tái phân lập nấm men từ vị trí vết bệnh trên môi trường YPD thạch và quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng nấm men phân lập được quan sát bằng kính hiển vi quang học và định danh chủng tái phân lập thông qua phân tích trình tự gen vùng ITS và LSU của gen *rRNA* nhằm xác định chính xác loại nấm men tái phân lập gây hại trên trái vải. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### Đánh giá hiệu lực kháng nấm men của các hợp chất hữu cơ tự nhiên

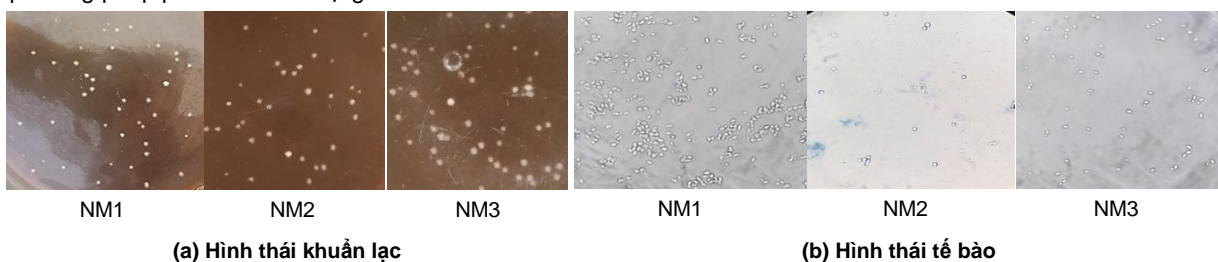
Chủng nấm men được lựa chọn được hoạt hóa trong môi trường YPD lỏng ở nhiệt độ phòng trong 24h. Hút 0,1 mL dịch nuôi cấy cấy trải trên môi trường thạch YPD. Đặt các khoan giấy lọc Whatmann 4 lần lượt chứa 0,5 mL nguyên liệu kháng nấm men bao gồm: dầu dừa nguyên chất, dịch ép tỏi, hỗn hợp dịch ép tỏi và dầu dừa lên trên đĩa đã cấy trải nấm men. Đây là nghiên cứu đầu tiên khảo sát khả năng kết hợp dịch chiết tỏi và dầu dừa để kháng nấm nên chúng tôi tiến hành thử nghiệm các tỉ lệ phối trộn dịch chiết tỏi và dầu dừa tương ứng sau: 1:1, 2:1, 1:2, 4:1 và 1:4 (tỷ lệ 4 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa có mùi tỏi khá nồng nên tỷ lệ dịch chiết tỏi cao hơn không được thử nghiệm). Kháng sinh Tetracyclin 1 mg/mL, nước cất lần lượt được sử dụng làm đối chứng dương và âm (McCool *et al.*, 2008). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát vòng kháng nấm men sau 24-96 giờ. Khả năng kháng nấm men được đánh giá thông qua đường kính vòng kháng được tính bằng mm theo công thức: đường kính vòng kháng nấm  $D_{kn}$  (mm) = D - d. Trong đó: D (mm) là đường kính vòng ức chế (bao gồm đường kính khoan giấy lọc Whatmann 4) ; d (mm) là đường kính khoan giấy lọc Whatmann 4. Đường kính vòng kháng nấm  $\leq 1,1$  cm, 1,2 cm - 1,5 cm,  $\geq 1,6$  cm lần lượt được cho là có tính kháng yếu, trung bình và cao

(Balcázar *et al.*, 2006). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm R. Các nhân tố được phân tích nhờ phương pháp ANOVA một chiều. Giá trị trung bình được đánh giá nhờ phép so sánh Tukey một chiều với giới hạn tin cậy là 95%.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

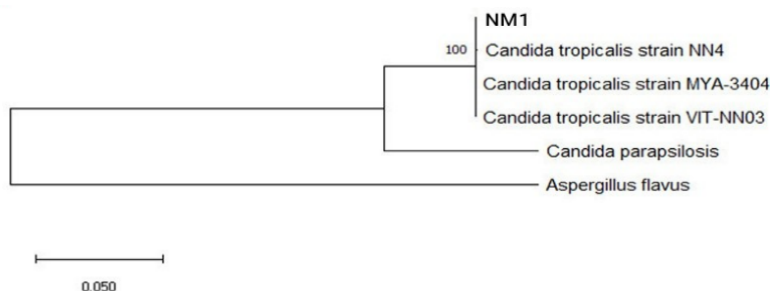
### Phân lập và định danh chủng nấm men NM1

Từ các mẫu trái vải được thu nhập ngẫu nhiên trên địa bàn quận Bình Tân, Thành phố Hồ Chí Minh có xuất hiện triệu chứng bệnh lý điển hình là bệnh thối nâu trên vỏ trái như phần vỏ trái chuyển thành từng mảng màu nâu, ăn sâu vào thịt trái gây thối nhũn thịt trái, biến màu và có mùi chua lên men, chúng tôi đã tiến hành phân lập nhằm xác định thành phần nấm men có trên trái hồng. Kết quả đã phân lập và làm thuần được 3 chủng (NM1, NM2, NM3) đều có đặc điểm khuẩn lạc đặc trưng của nấm men như: có hình tròn, màu trắng đục, bề mặt bóng, viền xung quanh nhẵn (Hình 1a). Kết hợp với quan sát tế bào dưới kính hiển vi quang học (Hình 1b), chúng tôi nhận thấy tế bào các chủng có hình ovan hoặc hình trứng, và rất nhiều tế bào đang phân chia theo hình thức nảy chồi. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng phân lập được đều là các đặc điểm cơ bản thường gặp ở nấm men (Barnett *et al.*, 2000). Do 3 chủng nấm men (NM1, NM2, NM3) có hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào không có sự khác biệt đáng kể nên chủng NM1 được lựa chọn ngẫu nhiên để định danh đến loài bằng phương pháp phân tích trình tự gen *rRNA*.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào các chủng nấm men được quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính 40X

Kết quả phân tích trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA* của chủng NM1 cho thấy mức đồng nhất trình tự đạt 100% với các loài *Candida tropicalis* strain NN4, *Candida tropicalis* strain MYA-3404 và *Candida tropicalis* strain VIT-NN03 (Hình 3). Theo Kurtzman và đồng tác giả (2011), các khuẩn lạc *C. tropicalis* trên môi trường YPD có màu trắng đến kem, kết cấu dạng kem, bề ngoài mịn và có thể có mép hơi nhẵn. Đặc điểm khuẩn lạc của chủng nấm men NM1 được phân lập được có nét tương đồng (khuẩn lạc có màu trắng sữa, rìa tròn, bề mặt phẳng láng mịn, kích thước khuẩn lạc 1,5 mm) (Hình 1). Như vậy dựa vào đặc điểm hình thái và đặc điểm trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA*, chủng nấm men NM1 phân lập từ vết bệnh thối nâu vỏ trái vải sau thu hoạch thuộc loài *Candida tropicalis* với độ tương đồng 100%.

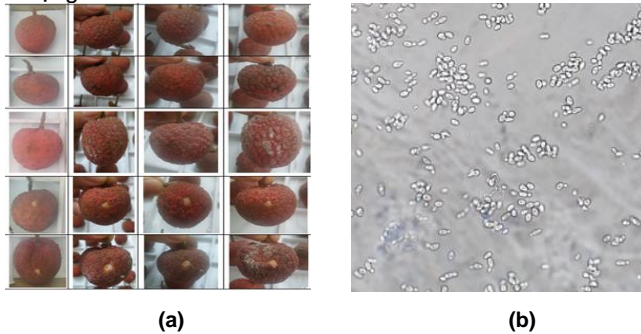


Hình 2. Sơ đồ cây phát sinh loài của chủng nấm men *C. tropicalis* NM1

### Lây bệnh nhân tạo trên trái vải

Nấm men *C. tropicalis* được phát hiện là một trong các tác nhân gây hư hại trên đối tượng trái cam ở Nigeria (Oviasogie *et al.*, 2015). Bên cạnh đó, *C. tropicalis* được đánh giá là một trong những tác nhân gây bệnh khi chủng được phân lập từ nguồn mẫu trái chà là tươi (Aljasass *et al.*, 2016). Tuy nhiên, nấm men *C. tropicalis* YZ27 lại được cho là tác nhân thúc đẩy trong quá trình chống lại sự thối rữa sau thu hoạch, duy trì chất lượng của trái vải thiều Bombay (Kumar, Anal, 2021). Vì vậy cần đánh giá xem chủng nấm men *C. tropicalis* NM1 phân lập được có phải thực sự là tác nhân gây hại cho trái vải, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo và đánh giá tác động của nấm men đến hình thái và chất lượng trái vải. Kết quả hình 3a cho thấy các nghiệm thức không nhúng trái vải vào dung dịch nấm men (nghiệm thức 1, 2, 4) thì trái vải bị hỏng chậm hơn so với các nghiệm thức có nhúng trái vào vào dịch nấm men (nghiệm thức 3 và 5). Cụ thể, tại thời điểm ngày thứ 2 trở đi, nghiệm thức có nhúng dịch nấm men cho kết quả trái vải bị nhiễm bệnh nhanh chóng, hiện tượng lên men chua,

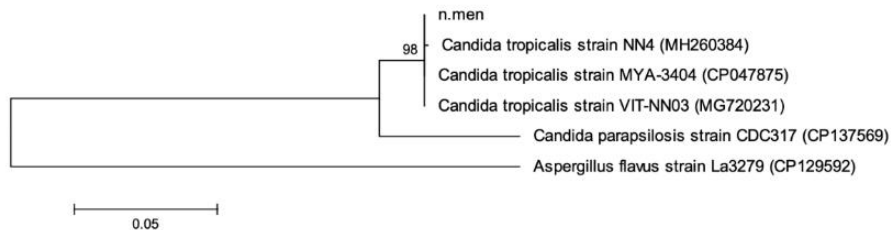
có mùi hôi nhẹ, phần vỏ và thịt trái vải tại vị trí vết thương có dấu hiệu mềm nhũn, màu sắc vỏ chuyển dần sang nâu đậm, kèm theo là sự xuất hiện của các mảng xám trắng và sau đó lan rộng ra xung quanh, gây thối quả sau khoảng 5 ngày lây nhiễm. Đặc biệt là nghiệm thức 5, sự tạo vết thương trên trái làm cho quá trình hỏng của trái vải nhanh hơn và nghiêm trọng hơn.



**Hình 3. Kết quả thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo (a) Mẫu trái vải có dấu hiệu bệnh lý sau khi lây nhiễm nhân tạo (mỗi hàng tương ứng với 1 nghiệm thức từ ngày 1 đến ngày 4 sau lây nhiễm nhân tạo. Từ hàng trên cùng đến hàng cuối cùng lần lượt tương ứng là nghiệm thức 1 đến 5), (b) Hình thái tế bào của chủng nấm men tái phân lập dưới kính hiển vi vật kính 40X**

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái nấm *C. tropicalis* MN1 phân lập được trên trái vải hỏng**

Chủng nấm men	Hình thái khuẩn lạc	Kết quả quan sát dưới kính hiển vi 40X
Chủng tái phân lập	Khuẩn lạc có màu trắng sữa, rìa tròn, bề mặt phẳng láng mịn, dạng S, kích thước khuẩn lạc: 2mm	Tế bào có hình tròn hoặc bầu dục



**Hình 4. Sơ đồ cây phát sinh loài của chủng nấm men tái phân lập được từ vết mẫu bệnh trên trái vải hỏng**

Chủng nấm men sau khi tái phân lập từ vết bệnh có đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào (Hình 3 và Bảng 1) tương tự như chủng nấm men NM1 ban đầu. Mặt khác, kết quả lây bệnh nhân tạo đối với nấm *C. tropicalis* NM1 ghi nhận tỷ lệ bệnh sau lây nhiễm là 100%, đồng thời sau khi tái phân lập nấm và phân tích trình tự gen vùng ITS và LSSU của gen *rRNA* cho kết quả có mức tương đồng 100% với loài *Candida tropicalis* (Hình 4). Điều này cho thấy nguyên nhân gây hỏng nhanh ở quả vải thiếu là do nấm men *Candida tropicalis*. Kết quả này cho thấy sự tương đồng trong nhận định *C. tropicalis* là tác nhân gây hại cho một số trái cây của một số tác giả Oviasogje và đồng tác giả (2015), Aljasass và đồng tác giả (2016) nhưng trái ngược với kết quả của Kumar, Anal (2021) rằng *C. tropicalis* ngăn cản quá trình thối rữa trái vải sau thu hoạch. Điều này có thể do đặc tính riêng biệt của từng chủng. Vì thế, để có nhận định chính xác hơn thì cần có nghiên cứu sâu hơn sau này.

**Khả năng kháng nấm gây hại của dịch chiết hữu cơ trong điều kiện in vitro**

Dầu dừa có tính kháng nấm vì có chứa các axit béo chuỗi trung bình như axit lauric, axit caprylic, axit capric, khả năng kháng nấm của dầu dừa cao nhất với MIC là 100% (không pha loãng). Dầu dừa được biết đến với khả năng kháng *Candida albicans* cao (Ogbolu *et al.*, 2007). Sử dụng dầu dừa nguyên chất mặc dù hiệu quả về mặt kháng nấm nhưng không hiệu quả về mặt kinh tế. Tuy nhiên, do dầu dừa có độ bóng nên có thể góp phần làm tăng tính thẩm mỹ của trái sau thu hoạch. Cùng với dầu dừa, hợp chất allicin có trong tỏi cũng là chất chống nấm tự nhiên. Dịch chiết tỏi lại được biết đến có khả năng kháng lại *C. tropicalis* cao hơn so với kháng *C. albicans* (Jafari *et al.*, 2007). Ngày nay, các hoạt chất chống nấm có trong tỏi đã được sản xuất thương mại hóa. Khả năng chống nấm của tỏi đạt mức kháng mạnh nhưng việc xử lý mùi trong các hợp chất được chiết xuất là một vấn đề khó khăn trong việc bảo quản nông sản. Từ trước đến nay chưa có công trình nào công bố về việc phối trộn 2 nguyên liệu này trong việc kháng nấm nói chung mà nấm *C. tropicalis* nói riêng. Vì vậy, trong nghiên cứu này, ngoài việc chúng tôi thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm riêng lẻ của từng chất để đánh giá khả năng kháng nấm *C. tropicalis* của dầu dừa cũng như để khẳng định thêm khả năng kháng nấm *C. tropicalis* của dịch chiết tỏi, chúng tôi còn lần đầu thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm *C. tropicalis* của hỗn hợp 2 nguyên liệu này nhằm xác định xem sự kết hợp này có mang lại hiệu quả kháng nấm tốt hơn riêng lẻ hay không và tỷ lệ phối trộn nào cho hiệu quả kháng nấm tốt nhất. Kết quả thử nghiệm được thể hiện qua bảng 2 và hình 5.



Hình 5. Đánh giá kháng nấm *C.tropicalis* NM1 của dịch ép tỏi và dầu dừa (tỷ lệ 2:1) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Ghi chú: (+) tetraaxilin; (-) nước cất; (\*) nghiệm thức

Bảng 2. Khả năng kháng nấm *C.tropicalis* NM1 của dầu dừa và dịch ép tỏi

Nghiệm thức	Đường kính kháng nấm (mm)
Kháng sinh tetraaxilin	11,33de ± 0,33
Nước cất	-
100% dầu dừa nguyên chất	10,00e ± 0,58
100% tỏi nguyên chất	19,00a ± 0,58
1 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa	15,33bc ± 0,33
2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa	19,33a ± 0,67
2 dầu dừa : 1 dịch chiết tỏi	13,67cd ± 0,33
4 dầu dừa : 1 dịch chiết tỏi	12,33 de ± 0,88
4 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa	17,67ab ± 0,33

Kháng sinh tetraaxilin được biết đến là chất có khả năng kháng *C. ablican* mạnh (McCool *et al.*, 2008). Trong nghiên cứu này cho thấy tetraaxilin cũng kháng *C. tropicalis* nhưng tính kháng yếu. Dầu dừa tuy có tính kháng nấm *C. tropicalis* nhưng tính kháng đó cũng yếu. Dịch chiết tỏi có tính kháng *C. tropicalis* mạnh và rõ rệt hơn. Trong các nghiệm thức khảo sát phối trộn dịch chiết tỏi và dầu dừa thì ở các nghiệm thức có bổ sung dịch chiết tỏi đều làm tăng tỷ lệ kháng nấm so với dầu dừa nguyên chất. Với cùng 1 tỷ lệ dịch chiết tỏi thì việc tăng tỷ lệ dầu dừa làm giảm hiệu quả kháng nấm cho thấy việc kháng nấm chủ yếu do vai trò của tỏi và dầu dừa có thể làm giảm khả năng kháng nấm của tỏi. Ở chiều ngược lại, tỷ lệ kháng nấm không tăng tuyến tính với tăng tỷ lệ dịch chiết tỏi trong phối hợp với dầu dừa. Tỷ lệ 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa có khả năng kháng nấm cao hơn 1 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa, tuy nhiên tỷ lệ 4 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa lại có hoạt tính kháng nấm thấp hơn so với tỷ lệ 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa. Dầu dừa chứa chủ yếu là các acid béo bão hoà có tính tan kém, trong khi dịch chiết tỏi trong dung môi nước có tính tan tốt hơn (Aswini *et al.*, 2024). Hợp chất lưu huỳnh kháng nấm trong tỏi khi chiết bằng nước chủ yếu là allicin (Bajac *et al.*, 2018). Allicin có khả năng phản ứng cao nhưng tính ổn định thấp (Argüelles *et al.*, 2024). Trong nghiên cứu này, kết quả thực nghiệm đã đưa ra gợi ý về tỷ lệ phối trộn 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa cho hiệu quả kháng *C. tropicalis* tốt nhất (đường kính vòng kháng 19,33 ± 0,67 mm). Các kết quả thu được một lần nữa khẳng định lại nhận định của Jafari và đồng tác giả (2007) về hoạt tính kháng nấm *C. tropicalis* cao của dịch chiết tỏi và cho thấy dầu dừa có khả năng kháng nấm *C. tropicalis* yếu. Đồng thời, các kết quả này cũng cho thấy việc kết hợp giữa dịch ép tỏi và dầu dừa có khả năng kháng nấm *C. tropicalis* và tỉ lệ 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa cho hiệu quả kháng nấm tốt nhất trong các nghiệm thức thử nghiệm. Điều này đã gợi mở biện pháp phối trộn 2 loại nguyên liệu này cho việc bảo quản trái vải sau thu hoạch.

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 3 chủng nấm men NM1, NM2 và NM3 được phân lập từ trái vải *Litchi chinensis* Sonn. sau thu hoạch. Chủng nấm men NM1 thuộc loài nấm men *Candida tropicalis* với độ tương đồng 100% và là tác nhân gây hại cho trái vải *Litchi chinensis* Sonn. sau thu hoạch. Nấm men *C. tropicalis* NM1 bị ức chế bởi dịch chiết tỏi và dầu dừa và trong điều kiện in vitro, tỷ lệ phối trộn 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa có hiệu lực kháng nấm hiệu quả nhất (D=19,33 ± 0,67 mm).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aljasass FM, Aleid SM, Hamad SH (2016). Potential pathogenic yeasts isolated from fresh date fruits (Rutab). *Pak J Agric Sci* 53(2), 461-465.
- Agustantina TH, Soekartono RH (2021). Antifungal Activity from Garlic Extract (*Allium sativum*) Against *Candida albicans* Growth. *J Dent Indones* 4(2), 60-62.
- Argüelles JC, Sánchez-Fresneda R, Alejandra Argüelles A, Solano F (2024). Natural Substances as Valuable Alternative for Improving Conventional Antifungal Chemotherapy: Lights and Shadows. *J Fungi*, 10, 334. <https://doi.org/10.3390/jof10050334>.
- Aswini T, Dhanusha K, Priya K, Shalini R, Sumithra S, Helen W (2024). Essential oils: Characteristics, extraction and pharmacological activities. *Int J Sci Res Arch* 12(01), 2457-2475.

- Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114(3-4): 173-186.
- Bajac J, Nikolovski B, Kocić-Tanackov S, Tomšik A, Mandić A, Gvozdanović-Varga J, Vlajić S, Vujanović M, Radojković M (2018). Extraction of different garlic varieties (*Allium sativum* L.)-Determination of organosulfur compound and microbiological activity. *IV Int Cong "Food Technology, Quality and Safety"*, 104-109.
- Barnett JA, Payne, Yarrow D (2000). *Yeasts: characteristics and identification*, 3rd Ed. Cambridge University Press.
- Burgess LW, Timothy EK, Tesoriero L, Phan TH (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR).
- Korabecna M (2007). The Variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application in medical mycology. *Comm Curr Res Edu Topics and Trends in Appl Microbiol*, 2, 783-787.
- Kumar V, Anal AKD (2021). Postharvest Diseases of Litchi and Their Management. In *Postharvest Handling and Diseases of Horticultural Produce* (pp. 231-238): CRC Press.
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Jafari AA, Bafghi AF, Anvari MH, Zarinfar H (2007) In Vitro Synergism Effect of an Aqueous Garlic Extracts against Six Commonly Clinical Isolated *Candida* Species. *Iran J Public Health* 36(Supple 2):1-2.
- McCool L, Mai H, Esmann M, Lasen B (2008). Tetracycline Effects on *Candida albicans* Virulence Factors. *Infect Dis Obstet Gynecol*. doi:10.1155/2008/493508.
- Ogbolu DO, Oni AA, Daini OA, Oloko AP (2007). In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. *J Med Food* 10(2), 384-387.
- Oviasogie FE, Ogofure AG, Beshiru A, Ode JN, Omeje FI (2015). Assessment of fungal pathogens associated with orange spoilage. *Afr J Microbiol Res* 9(29), 1758-1763.

## EVALUATION OF THE FUNGAL INHIBITION ABILITY OF COCONUT OIL AND GARLIC EXTRACT AGAINST *Candida tropicalis* NM1 ISOLATED FROM POST-HARVESTED LYCHEE FRUIT (*Litchi chinensis* Sonn.)

Nguyen Le Huy Khanh<sup>1\*</sup>, Pham Thi Ai Niem<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Huyen<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Viet Nam

<sup>2</sup>Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Viet Nam

### SUMMARY

Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) is a seasonal, succulent, highly nutritious fruit, so the lychee fruit is an ideal environment for harmful microorganisms to invade causing damage in terms of nutritional and economic value. Therefore, it is necessary to identify harmful microorganisms as well as find the solution to control those harmful agents. This study was conducted to identify harmful fungi on lychee and initially evaluate the ability to inhibit harmful fungi by garlic extract and coconut oil. From damaged lychee samples, three yeast strains MN1, MN2 and MN3 were isolated by spreading plate method on YPD agar medium. Observation of the colony morphology of yeast with the naked eye and the cell morphology of yeast with an optical microscope showed that the colony and cell morphology of these three strains did not differ significantly, so strain NM1 was randomly selected for species identification by molecular biology methods. Sequence analysis of the ITS and LSU regions of the *rRNA* gene of the yeast strain NM1 showed that the yeast strain NM1 belongs to the species *Candida tropicalis* with 100% similarity. Artificial infection test has determined the yeast *Candida tropicalis* NM1 as the causative agent of lychee spoilage. The inhibition test of the yeast *C. tropicalis* NM1 by the agar diffusion method showed that garlic extract had stronger antifungal properties than coconut oil and the mixture of garlic extract and coconut oil at a ratio of 2:1 showed the most effective antifungal properties (the diameter of the antifungal zone was  $19,33 \pm 0,67$  mm). The obtained results showed that *C. tropicalis* NM1 is a harmful yeast for lychee fruit and showed the potential of using natural mixtures such as coconut oil and garlic extract in controlling harmful yeasts on lychee fruit after harvest.

**Keywords:** *Candida tropicalis*, coconut oil, garlic extract, lychee fruit, yeast.

\* Author for correspondence: Tel: 0982158438; Email: huyenntthu@huit.edu.vn

# ĐÁNH GIÁ HIỆN TRẠNG MÔI TRƯỜNG ĐẤT VÀ ĐẶC ĐIỂM NHÓM VI KHUẨN BẢN ĐỊA CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DẦU TRONG ĐẤT NHIỄM DẦU VEN BIỂN VỊNH CAM RANH, KHÁNH HÒA

Đỗ Thị Tuyền<sup>1,4</sup>, Nguyễn Kim Thùy<sup>1</sup>, Trần Thị Thanh Thúy<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Thanh<sup>1</sup>, Đinh Thị Thu Trang<sup>1</sup>, Trịnh Ngọc Hoàng<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thanh Lợi<sup>3,4</sup>, Phí Quyết Tiến<sup>3,4</sup>, Ngô Cao Cường<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên

<sup>3</sup>Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

## TÓM TẮT

Hiện trạng ô nhiễm dầu ở các khu vực ven biển đã đặt ra yêu cầu cấp thiết về nghiên cứu và xử lý ô nhiễm môi trường nơi đây. Nghiên cứu đã phân tích các mẫu đất ven biển vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa nhằm đánh giá hiện trạng môi trường đất và đặc điểm nhóm vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy dầu ở điều kiện nhiễm mặn. Kết quả từ 5 mẫu đất đại diện 5 khu vực tương ứng CR2, CR3, CR4, CR5 và CR7 cho thấy, đặc điểm chung của đất khu vực khảo sát có thành phần cơ giới nhẹ, hàm lượng cát hạt cao (89,360%), trong khi hàm lượng sét thấp (4,90%). Đất có phản ứng ít chua và từ không mặn đến mặn nhẹ. Các mẫu đất có hàm lượng chất hữu cơ, đạm, lân và kali ở mức nghèo đến trung bình; hợp chất thơm đa vòng và chlorobenzene trong ngưỡng cho phép. Tuy nhiên, chỉ số tổng hydrocarbon dầu (TPH) dao động lớn từ 32,08 đến 3854,07 mg/kg, với 4 khu vực được xác định ô nhiễm dầu, đặc biệt mẫu CR5 có mức độ nhiễm cao gấp gần 8 lần giới hạn cho phép (QCVN 03:2023/BTNMT). Từ các mẫu đất thu tại 3 khu vực tương ứng CR3, CR4 và CR7 được đánh giá là có ô nhiễm dầu trong đất với hàm lượng TPH trong khoảng (500 – 600 mg/kg) đã nuôi cấy, làm giàu, phân lập, và định danh được 22 chủng vi khuẩn thuộc về 5 chi vi khuẩn *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, và *Niveispirillum*. Kết quả này cho thấy sự đa dạng vi khuẩn trong các mẫu đất nhiễm dầu tại vùng ven biển Cam Ranh, Khánh Hòa, mở ra tiềm năng sử dụng các chủng vi khuẩn này cho công tác xử lý ô nhiễm dầu trong tương lai.

*Từ khóa:* Phân hủy dầu, phân tích đất, vi khuẩn bản địa, vi khuẩn phân hủy dầu, vịnh Cam Ranh.

## MỞ ĐẦU

Trong bối cảnh biến đổi khí hậu và sự gia tăng tần suất các sự cố tràn dầu, việc đánh giá hiện trạng môi trường đất và tìm kiếm các biện pháp khắc phục hiệu quả trở thành yêu cầu cấp bách đối với các khu vực ven biển. Vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa là một trong những khu vực ven biển quan trọng của Việt Nam cũng đang đối diện với những thách thức liên quan đến ô nhiễm dầu mỏ (Nguyễn Thị Kim Thanh, 2023).

Dầu mỏ và các sản phẩm từ nhiên liệu hóa thạch là nguồn năng lượng quan trọng đối với nền kinh tế toàn cầu, nhưng việc sử dụng và vận chuyển chúng mang đến nguy cơ lớn cho môi trường. Sự cố tràn dầu gây ô nhiễm đất, làm thay đổi cấu trúc và chức năng của hệ sinh thái đất, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và động thực vật (Corwin *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2019). Các chỉ tiêu quan trắc độ phì đất bao gồm: dung trọng, pH<sub>KCl</sub>, thành phần cơ giới (cát; limon; sét), tổng số muối tan (TSMT) độ dẫn điện (EC), dung tích hấp thu (CEC), chất hữu cơ tổng số OM (%), N (%), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (%), K<sub>2</sub>O (%) đã được xác định có sự thay đổi ở các khu vực sinh thái đặc thù khác nhau và có xu hướng tiệm cận về giá trị dinh dưỡng nghèo đến trung bình trong đất cát ven biển (Ngô Trung Dũng, 2023; Nguyễn Ngọc Bảo Châu, 2021; TCVN 9236-2:2012). Trong khi đó, khả năng phục hồi của hệ sinh thái đất bị ô nhiễm dầu phụ thuộc lớn vào đặc điểm của nhóm vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy dầu đã được công bố (Van Hamme *et al.*, 2003).

Nghiên cứu về đặc điểm và khả năng của các vi khuẩn bản địa trong việc phân hủy dầu là một hướng đi tiềm năng trong việc giảm thiểu tác động của ô nhiễm dầu (Van Hamme *et al.*, 2003). Các vi khuẩn này có khả năng chuyển hóa các hợp chất hydrocarbon phức tạp thành các hợp chất đơn giản, ít độc hại hơn. Tuy nhiên, hiểu biết về nhóm vi khuẩn này tại khu vực ven biển vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa vẫn còn khá hạn chế.

Một nghiên cứu được thực hiện giai đoạn 6/2022 – 6/2024 đã xác định có ô nhiễm dầu trong đất theo khu vực và theo độ sâu tầng đất tại một số khu vực thuộc ven biển vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa (Nguyễn Thị Kim Thanh, 2023). Qua nghiên cứu khảo sát, thu thập thông tin và kết quả phân tích thành phần tổng hydrocarbon dầu (TPH) trong 84 mẫu đất thu tại 21 điểm theo 4 tầng độ sâu của phẫu diện đất (0 - 30 cm, 30 - 60 cm, 60 - 90 cm, 90 - 120 cm)

tại đây đã xác định được 5 khu vực có mức độ ô nhiễm dầu khác nhau (Dữ liệu chưa được công bố). Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiện trạng môi trường đất ven biển vịnh Cam Ranh bị nhiễm dầu và xác định đặc điểm của nhóm vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy dầu. Kết quả nghiên cứu không chỉ cung cấp cái nhìn tổng quan về mức độ ô nhiễm môi trường đất mà còn mở ra khả năng ứng dụng các vi khuẩn bản địa trong công tác khắc phục và xử lý ô nhiễm dầu. Qua đó, góp phần bảo vệ và phát triển bền vững môi trường ven biển, đồng thời nâng cao năng lực quản lý và ứng phó với các sự cố môi trường.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu nghiên cứu

Dựa trên các thông tin khảo sát và các nghiên cứu thăm dò của nhóm nghiên cứu, tổng số 15 mẫu đất được thu nhận tại 5 khu vực có kí hiệu CR2, CR3, CR4, CR5 và CR7 thuộc ven biển Vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa (nằm trên địa phận thành phố Cam Ranh và huyện Cam Lâm). Khu vực nghiên cứu có độ cao trung bình là 4,64 m so với mực nước biển và khoảng cách tới mép bờ biển trung bình 306 m. Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ 9/2023 – 6/2024.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp khảo sát, lấy mẫu ngoài thực địa

Dựa trên kết quả nghiên cứu thăm dò về mức độ ô nhiễm dầu trong đất của nhóm nghiên cứu trước đó (Đỗ Thị Tuyền, 2023; Nguyễn Thị Kim Thanh, 2023), tiến hành xây dựng hệ thống 15 điểm lấy mẫu đất tại 5 khu vực thuộc cùng hệ sinh thái ven biển bán đảo Cam Ranh (3 điểm/khu vực). Tại mỗi điểm, tiến hành đào 1 phẫu diện đất tới độ sâu 120 cm và lấy mẫu đất theo phương pháp lấy mẫu hỗn hợp, 1 mẫu hỗn hợp gồm 4 mẫu đơn được thu ở các độ sâu 0 - 30 cm, 30 - 60 cm, 60 - 90 cm, 90 - 120 cm. Các mẫu hỗn hợp trên được sử dụng để phân lập và định danh các chủng vi khuẩn phân hủy dầu. Đối với phân tích tính chất vật lý, hoá học và chỉ tiêu chất ô nhiễm trong đất sử dụng các mẫu đại diện theo khu vực. Theo đó, cứ mỗi 3 mẫu hỗn hợp thuộc 1 khu vực được trộn đều với nhau để thu được 1 mẫu đại diện cho khu vực đại diện và có kí hiệu mẫu tương ứng CR2, CR3, CR4, CR5 và CR7. Các mẫu đất sau khi thu thập được ghi chú, bảo quản trong túi nilon và vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích các chỉ tiêu chất lượng môi trường (Theo hướng dẫn của thông tư số: 60/2015/TT-BTNMT).

#### Phương pháp phân tích mẫu đất

Các mẫu đất được phân tích áp dụng theo các tiêu chuẩn Việt Nam và các tiêu chuẩn ngành chi tiết theo Bảng 1. Các mẫu đất được phân tích tại Phòng thí nghiệm Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, đồng thời được gửi phân tích đánh giá ở đơn vị đánh giá độc lập.

Bảng 1. Chỉ tiêu và phương pháp phân tích đánh giá mẫu môi trường đất

TT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp phân tích	TT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp phân tích
I	Nhóm chỉ tiêu tính chất vật lý của đất		III	Nhóm chỉ tiêu chất ô nhiễm trong đất	
1	Thành phần cơ giới	TCVN 8567:2010	1	Hàm lượng chất thơm đa vòng EPA 8270C; EPA 8100 PAHs, clobenzen...	
2	Độ ẩm	TCVN 6648:2000	2	Tổng hydrocacbon dầu	US EPA method 4030
3	Độ xốp	TCVN 11399:2016			
II	Nhóm chỉ tiêu tính chất hoá học của đất				
1	pH (pH <sub>KCl</sub> )	TCVN 5979:2007	6	Nitơ tổng số	TCN 6498-1999
2	Tổng số muối tan	TCVN 12615:2019	7	Phospho tổng số	TCVN 8940:2011
3	Độ dẫn điện	TCVN 6650:2000	8	Lưu huỳnh tổng số	TCVN 7371 : 2004
4	Dung tích hấp thu đất	TCVN 8568:2010	9	Kali tổng số	TCVN 8660:2011
5	Chất hữu cơ tổng số	TCVN 6644:2000			

Đánh giá mức độ ô nhiễm dầu trong đất áp dụng theo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng đất QCVN 03:2023/BTNMT quy định giới hạn tối đa hàm lượng của một số thông số trong đất phù hợp với mục đích sử dụng. Căn cứ mục đích sử dụng, khu vực nghiên cứu được xếp vào nhóm loại 1, giá trị giới hạn tối đa hàm lượng của tổng hydrocarbon dầu (TPH) là 500 mg/kg.

#### Phương pháp phân lập các chủng vi khuẩn phân hủy dầu

Nuôi cấy, làm giàu, phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân hủy dầu trên môi trường muối khoáng GOST 9023-74 có bổ sung 5% hỗn hợp dầu thô pha trong DO (tỷ lệ 5:95, v/v), 15‰ NaCl theo phương pháp đã được mô tả (Đỗ Thị Tuyền, 2023; Nguyễn Thị Kim Thanh, 2023). Sau khi cấy truyền làm giàu 3 lần, dịch nuôi cấy ở lần làm giàu thứ 3 được phân lập trên môi trường đĩa thạch MPA ở 30°C trong 24 giờ.



**Phương pháp định danh các chủng vi khuẩn phân hủy dầu**

DNA tổng số của vi khuẩn được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research, UK) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F và 1492R. Trình tự các đoạn gene 16S rRNA được tinh sạch và gửi đến công ty First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) để giải trình tự. Phần mềm BioEdit 7.2 được sử dụng để kiểm tra trình tự gen hai chiều, kết quả căn chỉnh được so sánh với các gen tham chiếu trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank.

**Phương pháp xử lý số liệu**

Kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

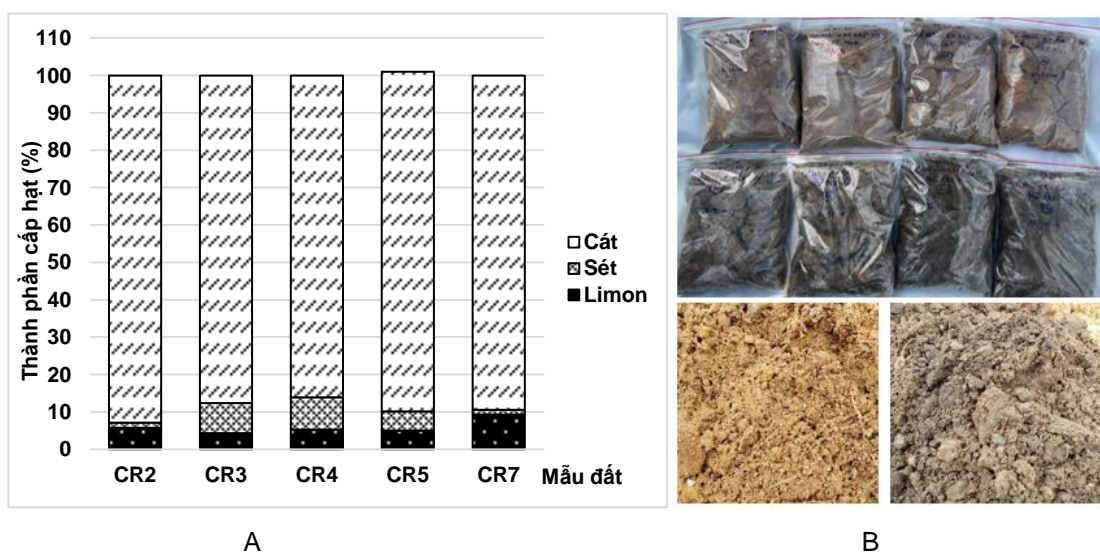
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Tính chất vật lý cơ bản của đất tại khu vực ven biển Vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa**

Kết quả phân tích ở Bảng 2 và Hình 1 cho thấy tỷ lệ cấp hạt chiếm 90,264% (dao động 86,1- 93,18%), cấp hạt limon 5,857% (dao động 4,3- 9,3%) và cấp hạt sét 4,177% (dao động 1,3- 8,6%). Trong khi đó, độ xốp của các mẫu đất dao động từ 35,94% (CR7) đến 51,57% (CR5), với giá trị trung bình là 43,046% ± 6,538%. Căn cứ bảng phân loại đất theo thành phần cơ giới của FAO-UNESCO dạng tam giác đều cho thấy đất tại khu vực căn cứ quân sự Cam Ranh có thành phần cơ giới nhẹ, chủ yếu là đất cát pha và đất cát. Đất có độ xốp cao cho thấy đất có khả năng thấm nước và lưu thông khí tốt do các hạt cát lớn hơn và không sắp xếp chặt chẽ như hạt sét (TCVN 6857 : 2001).

**Bảng 2. Một số tính chất vật lý của 5 mẫu đất thu tại Cam Ranh, Khánh Hòa**

TT	Ký hiệu mẫu đất	Thành phần cơ giới (%)			Độ xốp (%)	Loại đất
		Cát	Limon	Sét		
1.	CR2	92,86	5,8	1,34	42,3	Đất cát
2.	CR3	87,6	4,3	8,1	47,56	Đất cát pha
3.	CR4	86,1	5,3	8,6	37,86	Đất cát pha
4.	CR5	90,84	5,0	5,16	51,57	Đất cát pha
5.	CR7	89,4	9,3	1,3	35,94	Đất cát pha
6.	<b>Trung bình (TB ± SD)</b>	<b>89,360 ± 2,654</b>	<b>5,940 ± 1,955</b>	<b>4,90 ± 3,522</b>	<b>43,046 ± 6,538</b>	



**Hình 1. Đồ thị biểu diễn tỉ lệ thành phần cấp hạt của 5 mẫu đất (A) và hình ảnh các mẫu đất thu tại Cam Ranh, Khánh Hòa (B)**

**Tính chất hoá học của một số mẫu đất tại khu vực Vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa**

**Độ chua, tổng muối tan, độ dẫn điện và dung tích hấp thu của đất**

Kết quả phân tích các chỉ tiêu hoá học pH<sub>KCl</sub>, TSMT, EC, CEC được trình bày trong Bảng 3. Từ các chỉ số EC và TSMT có thể đánh giá độ mặn của đất trong khu vực vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa (Corwin *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2019).

**Bảng 3. Độ pH, tổng muối tan, độ dẫn điện và dung tích hấp thu của 5 mẫu đất thu tại Cam Ranh, Khánh Hòa**

TT	Ký hiệu mẫu đất	pH <sub>KCl</sub>	TSMT (%)	(EC, $\mu\text{s/cm}$ )	CEC (meq/100g)
1.	CR2	6,17	0,129	384	2,12
2.	CR3	7,36	0,268	433	4,28
3.	CR4	7,84	0,272	532	2
4.	CR5	7,09	0,297	497	1,81
5.	CR7	6,17	0,237	227	1,52
6.	<b>Trung bình (TB <math>\pm</math> SD)</b>	6,926 $\pm$ 0,741	0,241 $\pm$ 0,066	414,6 $\pm$ 119,42	2,346 $\pm$ 1,105

**Độ pH (pH<sub>KCl</sub>):** Đất cát ven biển tại khu vực nghiên cứu có pH từ 6,17 đến 7,87, trung bình là 6,926  $\pm$  0,741, phần lớn ít chua. Mẫu CR2 và CR7 có pH axit (6,17), trong khi các mẫu CR3, CR4 và CR5 có pH từ trung tính đến kiềm nhẹ (7,09 - 7,84).

**Hàm lượng Tổng muối tan (TSMT):** Dao động từ 0,129% đến 0,297%, trung bình là 0,241%  $\pm$  0,066%, cho thấy đất không mặn hoặc mặn nhẹ. Mẫu CR2 có TSMT thấp nhất (0,129%) và CR5 cao nhất (0,297%). Mẫu CR2 và CR7 thuộc loại đất mặn nhẹ (<0,2%), còn CR3, CR4 và CR5 thuộc loại đất có độ mặn trung bình (0,2% - 0,4%) (Corwin *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2019).

**Độ dẫn điện (EC):** Dao động từ 227  $\mu\text{s/cm}$  đến 532  $\mu\text{s/cm}$ , trung bình là 414,6  $\pm$  119,42  $\mu\text{s/cm}$ , nằm trong ngưỡng không mặn hoặc mặn nhẹ. Theo các ngưỡng thông thường trong nông nghiệp, đất có độ dẫn điện dưới 2000  $\mu\text{s/cm}$  được coi là không mặn hoặc mặn nhẹ (Corwin *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2019).

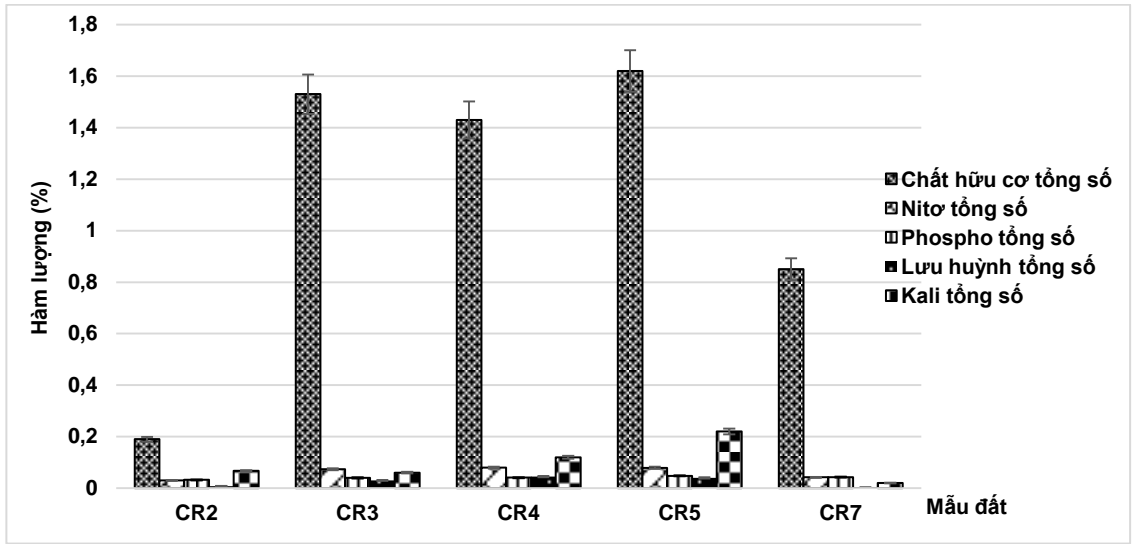
**Dung tích hấp thu (CEC):** Dao động từ 1,52 meq/100g đến 4,28 meq/100g, trung bình 2,346  $\pm$  1,105 meq/100g. Độ lệch chuẩn khá cao so với giá trị trung bình cho thấy có sự biến thiên lớn về CEC giữa các mẫu đất. Điều này có thể phản ánh sự khác biệt về thành phần khoáng chất, cấu trúc hạt đất và hàm lượng chất hữu cơ giữa các mẫu. Mẫu đất CR3 có dung tích hấp thu cao nhất (4,28 meq/100g), cho thấy khả năng phân phối và giữ lại dưỡng chất tốt hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho cây trồng và cải thiện chất lượng đất (TCVN 9236-2:2012).

Nhìn chung, khu vực đất ở Cam Ranh, Khánh Hòa có sự đa dạng về tính chất hóa học. Đất tại đây có pH từ axit nhẹ đến kiềm nhẹ, hàm lượng tổng muối tan ở mức thấp, độ dẫn điện và dung tích hấp thu cũng có sự biến động đáng kể giữa các mẫu đất. Đất tại khu vực ven biển chịu ảnh hưởng của xâm nhập mặn nên độ mặn cao hơn các khu vực khác trong đất liền. Đất khu vực khảo sát có TSMT dao động từ 0,129 - 0,297%, thuộc loại đất không mặn đến mặn nhẹ. Trong đó, mẫu CR5 thu thập ở khu vực đất sát bờ biển, độ cao so với mực nước biển cũng thấp nhất nên chịu ảnh hưởng mạnh của nước biển và có TSMT cao hơn. Theo nghiên cứu của Ngô Trung Dũng (2023) cũng chỉ ra, các vùng cửa sông, ven biển có độ nhạy cảm cao do ảnh hưởng trực tiếp từ môi trường nước, vì vậy đất tại các khu vực này dễ bị biến đổi lớn về tính chất vật lý và hoá học (Ngô Trung Dũng, 2023).

**Hàm lượng các chất tổng số**

Kết quả phân tích các chất tổng số và tỷ lệ C/N trong đất được trình bày ở Bảng 3.2. Nhìn chung, tầng đất ở độ sâu từ 0 – 120 cm ở khu vực ven biển Cam Ranh, Khánh Hòa có hàm lượng cacbon hữu cơ (OM) tổng số ở mức nghèo đến trung bình, dao động từ 0,19 - 1,62%. Trong đó, một số mẫu đất CR3, CR4 và CR5 có hàm lượng OM cao hơn các mẫu còn lại. Đây cũng là những mẫu được lấy dưới thảm thực vật là cây cỏ và cây bụi phát triển nên có khả năng cung cấp nhiều xác hữu cơ cho đất. Riêng mẫu CR2 hàm lượng cacbon tổng số ở mức thấp 0,19%, nguyên nhân có thể do điểm thu mẫu CR2 nằm trên khu vực cồn cát, thành phần cát hạt cát lên tới 92,86%, không có thảm thực vật phát triển nên khả năng tích lũy cacbon trong đất cát không cao và tương ứng hàm lượng cacbon hữu cơ tổng số cũng ở mức nghèo.

So sánh với tiêu chuẩn các tiêu chuẩn quốc gia theo TCVN 7373:2004, TCVN 7474:2004, TCVN 7375:2005 và Cẩm nang ngành Lâm nghiệp (2006) cho thấy đất khu vực này là loại đất cát ven biển, thành phần các chất dinh dưỡng nằm trong giới hạn từ nghèo tới trung bình và cần được cải tạo để tăng cường chất lượng đất. Theo đó, các mẫu đất cát ven biển tại khu vực này có thể chia thành 2 nhóm chính: Nhóm có hàm lượng hữu cơ trung bình (OC 1,0 - 2,0%) gồm đất cát pha thịt ở khu vực CR3, CR4 và CR5. Nhóm có hàm lượng hữu cơ thấp (OC 0,19 - 0,85%) gồm đất cát ở khu vực CR2 và CR7.



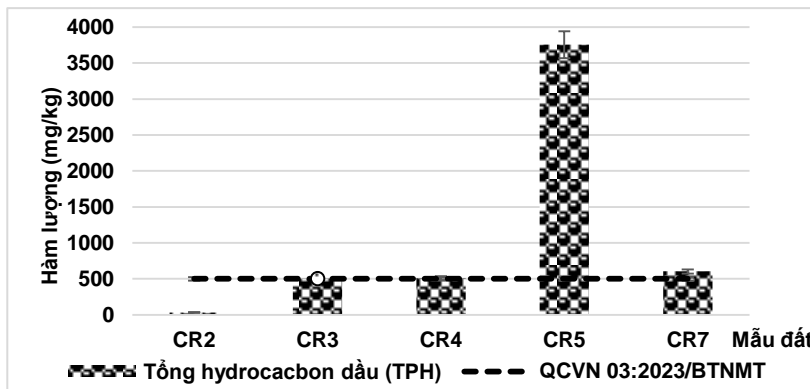
Hình 2. Đồ thị biểu diễn hàm lượng các chất tổng số trong 5 mẫu đất thu tại Cam Ranh, Khánh Hòa

**Hàm lượng các hợp chất hydrocacbon có nguồn gốc dầu mỏ trong đất**

Kết quả phân tích trên Bảng 4 và Hình 3 cho thấy, hàm lượng các hợp chất thơm đa vòng và chlorobenzene đều nằm trong ngưỡng cho phép. Thành phần PAHs có hàm lượng tương đối thấp, trung bình các mẫu đạt 0,052 mg/kg, dao động trong khoảng từ 0,016 - 0,076 mg/kg, thấp hơn so với giới hạn cho phép trong đất là 0,08 mg/kg. PAHs là hợp chất ưa béo, độ tan trong nước kém, nên nồng độ của PAHs trong môi trường thường thấp, có xu hướng kết hợp với các vật chất lơ lửng trong nước và lắng đọng xuống môi trường đất, trầm tích. Nguồn gốc phát sinh PAHs trong môi trường chủ yếu do xăng dầu (như tràn dầu, tháo lắp vật liệu...) và quá trình đốt cháy (như đốt cháy nhiên liệu, cháy rừng...). Phạm Thị Kha (2015) đã xác định hàm lượng 8 cấu tử PAHs trong trầm tích đầm Thị Nại dao động từ 0,003 mg/kg đến 0,113 mg/kg khô, thấp hơn giá trị giới hạn theo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng trầm tích (QCVN 43:2010/BTNMT). Đồng thời cũng xác định các PAHs đầm Thị Nại có nguồn gốc chủ yếu từ xăng dầu (Phạm Thị Kha, 2015).

**Bảng 4. Hợp chất thơm đa vòng, chlorobenzen và tổng hydrocacbon dầu trong 5 mẫu đất thu tại Cam Ranh, Khánh Hòa**

TT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả đánh giá ô nhiễm (mg/kg)					Trung bình (TB ± SD)	Giá trị giới hạn tối đa hàm lượng trong đất (mg/kg)
		CR2	CR3	CR4	CR5	CR7		
1	Hợp chất thơm đa vòng (PAHs)	0,016	0,076	0,065	0,048	0,053	0,052 ± 0,023	<b>0,08</b> (QCVN 43:2012/BTNMT)
2	Chlorobenzen	0,052	0,092	0,087	0,098	0,084	0,083 ± 0,018	<b>0,51</b> (QCVN 03:2023/BTNMT)
3	Tổng hydrocacbon dầu (TPH)	32,08	500,26	510,42	3.754,07	603,00	1079,965 ± 1511,358	<b>500</b> (QCVN 03:2023/BTNMT)



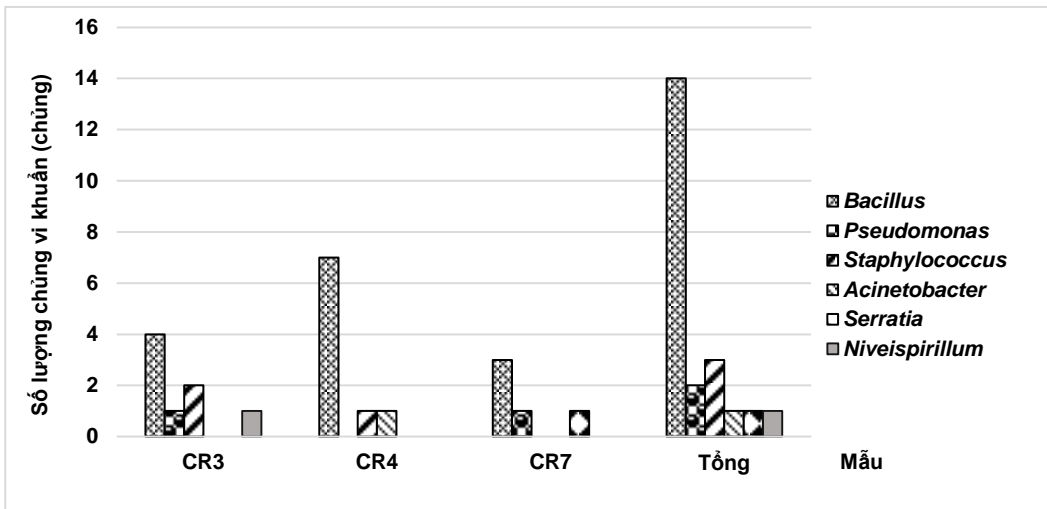
Hình 3. Đồ thị biểu diễn hàm lượng thành phần tổng hydrocacbon dầu (TPH) trong 5 mẫu đất thu tại Cam Ranh, Khánh Hòa

Đáng chú ý, thành phần dầu tổng số trong các mẫu đất thu thập có sự dao động lớn theo các vị trí phẫu diện khác nhau và theo sự phân tầng độ sâu của cùng một phẫu diện đất. Nếu tính giá trị trung bình theo khu vực, hàm lượng TPH trong các mẫu theo khu vực dao động trong khoảng 32,08 - 3854,07 mg/kg. Trong đó có 4 mẫu CR3, CR4, CR5, CR7 xác nhận có giá trị hàm lượng TPH > 500 mg/kg, vượt ngưỡng giá trị tối đa hàm lượng của thông số TPH trong đất theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng đất thuộc nhóm loại 1 (theo QCVN 03:2023/BTNMT). Đặc biệt, mẫu đất thu tại khu vực CR5 cho thấy mức độ ô nhiễm dầu cao nhất, thể hiện ở hàm lượng dầu đạt 3854,07 mg/kg, cao gấp hơn gần 8 lần giá trị giới hạn 500 mg/kg theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về giới hạn cho phép của một số chất ô nhiễm trong đất (QCVN 03:2023/BTNMT). Như vậy, các vị trí khác nhau của khu vực Cam Ranh có thành phần cấu trúc đất, tính chất vật lý và hoá học cũng như mức độ ô nhiễm các thành phần hydrocarbon dầu mỏ khác nhau.

Nhìn chung, đất tại khu vực nghiên cứu có thành phần cơ giới nhẹ, hàm lượng cát hạt cao, trung bình 89,360%, trong khi hàm lượng sét thấp, trung bình 4,90%. Đất có phản ứng ít chua; đất không mặn đến mặn nhẹ. Thành phần các chất tổng số trong đất ở mức nghèo đến trung bình, một số khu vực bị ô nhiễm dầu cao, cần có phương hướng nghiên cứu ứng dụng xử lý cũng như chú trọng áp dụng các biện pháp cải tạo đất thích hợp.

**Phân lập và xác định nhóm vi khuẩn phân hủy hydrocacbon dầu trong đất cát ven biển tại khu vực Vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa**

Các nghiên cứu về quần xã vi sinh vật ban đầu trong môi trường đất ô nhiễm dầu mang ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá mức độ ô nhiễm và tiềm năng ứng dụng xử lý bằng phân hủy sinh học. Theo nghiên cứu của Hamme và đồng tác giả (2003), vi khuẩn là nhóm đa dạng nhất trong quần xã vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu (Van Hamme *et al.*, 2003). Khả năng phân hủy hydrocacbon dầu của các chủng vi khuẩn ở điều kiện nhiễm mặn là yếu tố quan trọng định hình sự phát triển của hệ sinh thái khu vực đất cát ven biển bị ô nhiễm dầu. Hình 4 biểu diễn kết quả phân lập và định danh 22 chủng vi khuẩn từ các mẫu đất CR3, CR4 và CR7 thu tại 3 khu vực có kết quả đánh giá ô nhiễm dầu trong đất với hàm lượng TPH trong khoảng (500 – 600 mg/kg). Kết quả phân lập và định danh các chủng vi khuẩn ở các khu vực CR2, CR5 được trình bày trong một công bố khác của nhóm nghiên cứu.



**Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự có mặt của các chi vi khuẩn trong các mẫu đất thu tại 3 khu vực CR3, CR4 và CR7**

Để phân lập tuyển chọn các chủng vi khuẩn đơn có khả năng phân hủy hydrocacbon dầu mỏ trong điều kiện nhiễm mặn phù hợp cho ứng dụng xử lý dầu, các mẫu đất được nuôi cấy làm giàu theo phương pháp đã được mô tả. Sau các lần nuôi cấy làm giàu, màu sắc và độ đục của môi trường thay đổi rõ rệt so với mẫu ban đầu, không còn lớp dầu nổi trên bề mặt, trên thành bình có xuất hiện các vệt sinh khối tế bào. Từ 9 mẫu đất hỗn hợp thu tại 9 phẫu diện tương ứng thuộc 3 khu vực CR3, CR4 và CR7 đã phân lập tổng số 22 chủng vi khuẩn. Kết quả định danh dựa trên giải trình tự gen 16S rRNA thu được các chủng vi khuẩn thuộc về 5 chi vi khuẩn bao gồm: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, và *Niveispirillum*. Trong đó, *Bacillus* là chi vi khuẩn phổ biến nhất trong các mẫu đất nhiễm dầu, xuất hiện ở tất cả các mẫu và có tổng số lượng cao nhất (14 chủng). Hai chi *Pseudomonas* và *Staphylococcus* cũng xuất hiện trong các mẫu đất nhưng với số lượng ít hơn. Ba chi *Acinetobacter*, *Serratia* và *Niveispirillum* chỉ xuất hiện trong một mẫu đất duy nhất và với số lượng thấp (1 chủng). Đáng chú ý là các đại diện thuộc 4 chi vi khuẩn thu được trong nghiên cứu này đã được công bố khả năng phân hủy các thành phần hydrocacbon nguồn gốc dầu mỏ từ nhiều hệ sinh thái đa dạng bao gồm cả môi trường nước mặn và nước ngọt (Đỗ Thị Tuyền, 2023; Nguyễn Thị Kim Thanh, 2023; Van Hamme *et al.*, 2003). Điều này cho thấy sự đa dạng của các chi vi khuẩn trong các mẫu đất nhiễm dầu thu tại khu vực ven biển Cam Ranh, Khánh Hòa, với *Bacillus* là chi vi khuẩn chiếm ưu thế. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu cho thấy vi khuẩn hình

thành bào tử rất quan trọng trong quá trình phân hủy dầu. Đây là chi vi khuẩn đã được báo cáo có khả năng thích nghi tốt trong các môi trường nghèo dinh dưỡng, có khả năng sử dụng đa dạng rất nhiều nguồn cacbon cơ chất khác nhau, trong đó có hydrocarbon dầu mỏ. Tuy nhiên, để định hướng ứng dụng các chủng vi khuẩn này trong xử lý ô nhiễm dầu trong đất nhiễm mặn cần triển khai các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và ở quy mô pilot để làm cơ sở đánh giá hiệu quả phân hủy dầu trong điều kiện thực tế.

## KẾT LUẬN

Đặc điểm chung của đất khu vực Căn cứ quân sự Cam Ranh là có thành phần cơ giới nhẹ, hàm lượng cấp hạt cát cao (89,360%), hàm lượng sét thấp (4,90%). Đất có phản ứng ít chua; đất không mặn đến mặn nhẹ. Thành phần các chất tổng số trong đất ở mức nghèo đến trung bình nên cần chú trọng áp dụng các biện pháp cải tạo đất thích hợp. Các hợp chất thơm đa vòng và chlorobenzene trong ngưỡng cho phép. Tuy nhiên có 4/5 mẫu đất từ các khu vực tương ứng, CR3, CR4, CR5, CR7 có hàm lượng TPH > 500 mg/kg và được xác định là vượt ngưỡng chất ô nhiễm trong đất đối với nhóm đất loại 1 theo QCVN 03:2023/BTNMT. Từ các mẫu đất CR3, CR4 và CR7 thu tại 3 khu vực có hàm lượng TPH trong khoảng 500 – 600 mg/kg đã phân lập và định danh được 22 chủng vi khuẩn thuộc về 5 chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, và *Niveispirillum*. Trong đó *Bacillus* là chi vi khuẩn chiếm ưu thế và được xác định là có tiềm năng ứng dụng xử lý ô nhiễm dầu trong điều kiện thực tế.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cấp Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga, mã số: SH.Đ1.04/23: Xây dựng quy trình công nghệ xử lý đất nhiễm dầu tại căn cứ quân sự Cam Ranh bằng công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Tài nguyên và Môi trường (2015). Thông tư số 60/2015/TT-BTNMT Quy định về kỹ thuật điều tra, đánh giá đất đai.
- Corwin DL and Yemoto K (2020). Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. *Soil Sci Soc Am J* 84(5): 1442-1461.
- Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Thị Kim Thanh, Nguyễn Thị Hiếu Thu, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Ngô Cao Cường, Phí Quyết Tiến, (2023). Characterization of crude oil-degrading bacteria isolated from oil-contaminated saline soils in Cam Lam, Khanh Hoa. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2023*: 774-779.
- Gupta SK, Chaudhari S and Sharma P (2019). Handbook of saline and alkali soils diagnosis reclamation and management.
- Ngô Trung Dũng, Nguyễn Thị Kim Oanh, Nguyễn Quốc Khánh, Trần Thị Nhân, Đặng Thị Ngọc, Phạm Viết Thành, Trần Linh Lan (2023). Đánh giá hiện trạng môi trường đất khu vực đất ngập nước xã Đồng Rui, huyện Tiên Yên, tỉnh Quảng Ninh. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới* 31(6): 1-12.
- Nguyễn Ngọc Bảo Châu, Dương Minh Truyền, Trương Hoàng Đan và Lý Văn Lợi (2021). Đánh giá sự khác biệt về chỉ tiêu môi trường đất ở các sinh cảnh khác nhau tại vùng Cù Lao Dung. *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp* 10(3): 56-63.
- Nguyễn Thị Kim Thanh, Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Ngô Cao Cường, Phí Quyết Tiến, (2023). Characterization of indigenous oil-degrading bacteria from oil-polluted soil in Cam Ranh, Khanh Hoa. *TNU Journal of Science and Technology* 228(10): 420 – 427.
- Phạm Thị Kha (2015). Hàm lượng Hydrocacbon đa vòng thơm (PAHs) trong trầm tích đầm Thị Nại (tỉnh Bình Định). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển* 15(3): 288-293.
- Quy chuẩn Việt Nam (2023). QCVN 03:2023/BTNMT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng đất Tiêu chuẩn Quốc gia (2001). TCVN 6857 : 2001: Chất lượng đất - Phương pháp đơn giản để mô tả đất.
- Tiêu chuẩn Quốc gia (2004). TCVN 7373 : 2004: Chất lượng đất - Giá trị chỉ thị về hàm lượng nito tổng số trong đất Việt Nam
- Tiêu chuẩn Quốc gia (2004). TCVN 7374 : 2004: Chất lượng đất - Giá trị chỉ thị về hàm lượng photpho tổng số trong đất Việt Nam
- Tiêu chuẩn Quốc gia (2004). TCVN 7375:2004: Chất lượng đất - Giá trị chỉ thị về hàm lượng Kali tổng số trong đất Việt Nam
- Tiêu chuẩn Quốc gia (2012). TCVN 9236-2:2012: Chất lượng đất-Giá trị chỉ thị hàm lượng các chất vô cơ trong các nhóm đất chính Việt Nam.
- Van Hamme JD, Singh A and Ward OP (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol R* 67(4): 503-549.

## ASSESSMENT OF SOIL ENVIRONMENTAL STATUS AND CHARACTERISTICS OF INDIGENOUS BACTERIAL GROUPS CAPABLE OF OIL DEGRADATION IN OIL-CONTAMINATED SOILS ON THE COAST OF CAM RANH BAY, KHANH HOA

Do Thi Tuyen<sup>1,4\*</sup>, Nguyen Kim Thuy<sup>1</sup>, Tran Thị Thanh Thuy<sup>1</sup>, Nguyen Thi Kim Thanh<sup>1</sup>, Dinh Thi Thu Trang<sup>1</sup>, Trinh Ngoc Hoang<sup>2</sup>, Nguyen Thi Thanh Loi<sup>2,4</sup>, Phi Quyet Tien<sup>2,4</sup>, Ngo Cao Cuong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Joint Vietnamese - Russia Tropical Science and Technology Research Center

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup>Thai Nguyen University of Sciences

<sup>4</sup>Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

### SUMMARY

The current state of oil pollution in coastal areas has necessitated urgent research and remediation efforts for environmental pollution. The study analyzed soil samples from Cam Ranh Bay, Khanh Hoa, to assess the current soil environmental status and the characteristics of indigenous bacteria capable of degrading oil under slightly saline conditions. The analysis of 5 soil samples from 5 corresponding areas (CR2, CR3, CR4, CR5, CR7) showed that the common characteristics of the surveyed soils include a light mechanical composition with a high sand content (89.36%), while the clay content is low (4.9%). The soils exhibited slightly acidic reactions and ranged from non-saline to slightly saline. Organic matter, nitrogen, phosphorus, and potassium content in the soil samples were found to be from poor to moderate levels; polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorobenzene were within permissible limits. However, the Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) index varied significantly from 32.08 to 3854.07 mg/kg, with four areas identified as oil-polluted, particularly sample CR5, which had pollution levels nearly eight times the permissible limit (QCVN 03:2023/BTNMT). From the soil samples collected in 3 areas (CR3, CR4, and CR7) identified as oil-contaminated with TPH levels ranging from 500 to 600 mg/kg, enrichment culture and isolation identified 22 bacterial strains belonging to 5 genera: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, and *Niveispirillum*. These results indicate the diversity of bacteria in oil-contaminated soil samples from the coastal area of Cam Ranh, Khanh Hoa, opening up the potential use of these bacterial strains for future oil pollution remediation efforts.

**Keywords:** Oil degradation, soil analysis, indigenous bacteria, oil-degrading bacteria, Cam Ranh Bay.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0982010336; Email: ngoacaocuong2011@gmail.com; tuyendodhkh@gmail.com

# ẢNH HƯỞNG CỦA CÔNG ĐOẠN TIỀN XỬ LÝ VÀ THANH TRÙNG ĐẾN NƯỚC UỐNG LÊN MEN TỪ TRÁI GIÁC (*Cayratia trifolia* L.)

Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Nguyễn Như Quỳnh, Huỳnh Thanh Cần, Huỳnh Thị Ngọc Mi

Khoa Công nghệ Sinh hóa - Thực phẩm, Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ

## TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát điều kiện xử lý nguyên liệu trái giác ban đầu ảnh hưởng đến lượng dịch quả thu hồi, nhiệt độ và thời gian thanh trùng ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan sản phẩm nước uống lên men từ trái giác sau công đoạn lên men chính với sự ổn định theo thời gian bảo quản. Kết quả cho thấy trái giác được đông lạnh ở  $-18^{\circ}\text{C}$  trong 2 ngày được bảo quản tốt và cho hàm lượng dịch quả nhiều hơn so với trữ ở  $4^{\circ}\text{C}$ . Phương pháp ép thu hồi lượng dịch quả cao là 875 mL/kg. Sau lên men, sản phẩm thanh trùng ở nhiệt độ  $65^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 5 phút có độ trong và màu sắc, mùi và vị đạt điểm cảm quan tốt và ổn định trong 40 ngày bảo quản với hàm lượng ethanol là 6,17% v/v.

Từ khóa: Bảo quản, trái giác, thanh trùng, nước uống lên men.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây giác là loại thực vật dây leo, thân gỗ, mọc hoang, rất dồi dào và phổ biến trong tự nhiên ở miền Nam nước ta. Trái giác là loại quả mọng nước chứa nhiều hợp chất hoạt tính học, được tìm thấy nhiều ở các khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, và mùa trái chín thường vào tháng 7 đến tháng 12 hằng năm. Trái giác đã được sử dụng là nguyên liệu lên men rượu vang và nước uống có nồng độ cồn thấp đạt chất lượng cảm quan tốt và vẫn giữ được các hợp chất sinh học có trong nguyên liệu (Đoàn Thị Kiều Tiên *et al.*, 2021). Trong sản xuất nước trái cây lên men, vấn đề thu hồi được dịch quả, điều kiện bảo quản trái và phương pháp giữ ổn định sản phẩm sau lên men đều có tác động rõ rệt đến sản xuất và lưu hành sản phẩm. Các phương pháp xử lý trước khi đưa nguyên liệu vào quy trình chế biến như đông lạnh, có tác dụng làm tăng thể tích dịch nội bào, phá vỡ màng tế bào tạo điều kiện dễ dàng cho việc giải phóng dịch bào và hòa tan anthocyanin, polyphenol tổng số và các hợp chất khác (Moreno-Perez *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2013). Theo Zhang *et al.*, 2023, quá trình đông lạnh còn giúp cải thiện màu sắc và tăng hàm lượng hợp chất phenolic và dễ bay hơi đối với trái nho. Quá trình xử lý sau lên men cũng là một bước quan trọng và không thể thiếu trong quá trình sản xuất nước uống từ trái cây nhằm ức chế sự phát triển của các loại vi sinh vật không muốn, kéo dài thời gian bảo quản. Thanh trùng là một kỹ thuật xử lý nhiệt nhằm ức chế hoạt động của vi sinh vật và enzyme, đảm bảo tính an toàn của nước ép hay nước uống lên men có nồng độ cồn thấp (Wibowo *et al.*, 2015). Nhiệt độ được sử dụng trong quá trình thanh trùng có thể ảnh hưởng đến các đặc tính lý hóa, giá trị cảm quan và đến chất lượng sản phẩm (Minh *et al.*, 2019; Mandha *et al.*, 2023). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích khảo sát điều kiện xử lý, bảo quản phù hợp nhất đối với nguyên liệu trái giác trước khi đưa vào sản xuất. Đồng thời, chế độ thanh trùng sản phẩm nước uống lên men trái giác sau công đoạn lên men cũng được khảo sát để đánh giá sự thay đổi của sản phẩm trong thời gian tồn trữ.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Nguyên liệu: trái giác (*Cayratia trifolia* L.) được thu mua tại các tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng và Cà Mau. Nguyên liệu trái giác được lựa chọn là quả chín mọng, màu tím đen, có thể sử dụng những quả bị dập vừa, nhưng không được hư hỏng (Hình 1A).

Đường: Sử dụng đường saccharose, độ tinh khiết 99,7%, sản phẩm của công ty Biên Hòa, được dùng để điều chỉnh nồng độ chất khô hòa tan ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) của dịch trái giác trước khi lên men.

Hóa chất: Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), acid citric, sodium bisulfite ( $\text{NaHSO}_3$ ), yeast extract, D-glucose, peptone được sản xuất bởi công ty Xilong Scientific (Trung Quốc).

Dịch tăng sinh: chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 (*Sac* HG1.3) được phân lập từ trái giác, lưu trữ tại phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Công nghệ Sinh Hóa - Thực phẩm, Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ. *Sac* HG1.3 được nuôi tăng sinh trong môi trường YPD lỏng (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L D-glucose, khử trùng ở  $121^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút) và ủ trên máy lắc 90 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Môi trường YPD agar được chuẩn bị từ môi trường YPD lỏng và bổ sung 15 g/L agar.

## Phương pháp nghiên cứu

### Quy trình chung

Trái giắc chín được rửa sạch để ráo, sau đó ép và lọc lấy dịch quả bỏ phần cặn. Dịch trái giắc sau khi điều chỉnh về pH 4,0 và 22 °Brix được bổ sung NaHSO<sub>3</sub> (140 mg/L) để yên trong 2 giờ. Dịch tăng sinh nấm men (1% v/v) được bổ sung vào dịch trái giắc, sau đó lên men ở nhiệt độ phòng (30 ± 2°C) trong 3 ngày (Đoàn Thị Kiều Tiên *et al.*, 2021). Khi quá trình lên men chính kết thúc, dịch trái giắc sau lên men được lọc bỏ cặn và rót vào chai, sau đó được thanh trùng bằng nhiệt trong thời gian phù hợp trước khi đưa vào bảo quản.

### Phương pháp phân tích các chỉ tiêu hoá lý và vi sinh

Giá trị pH được đo bằng pH kế (Hanna, Mỹ), hàm lượng chất khô hòa tan được đo bằng Brix kế (Atago, 0-33 °Brix, Pháp). Hàm lượng ethanol được đo lường theo phương pháp chưng cất quy về nồng độ ethanol ở 20°C. Giá trị cảm quan của sản phẩm bao gồm độ trong và màu sắc, mùi, vị được đánh giá dựa trên thang điểm 0 đến 5 theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3215-79 bởi 10 thành viên. Chỉ tiêu vi sinh vật hiếu khí được xác định theo ISO 4833-1:2013.

### Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện bảo quản trái đến thể tích dịch trái thu hồi

Nguyên liệu trái giắc được loại bỏ cuống, lá, trái hư, dập nát; Lựa chọn trái chín có màu tím đen, rửa sạch qua nước nhiều lần để loại bỏ tạp chất, sau đó ép để thu lấy dịch quả từ trái tươi.

Đối với điều kiện xử lý bao gồm trữ mát (4°C) và trữ đông lạnh (-18°C), trước khi ép thu hồi dịch quả trái giắc đã được rửa sạch và bảo quản 2 ngày. Giá trị pH và độ Brix được đo lường theo phương pháp được mô tả ở mục phương pháp phân tích.

### Khảo sát nhiệt độ và thời gian thanh trùng thích hợp cho nước trái giắc lên men

Trái giắc được xử lý trước lên men theo các điều kiện được lựa chọn ở thí nghiệm trên và lên men theo quy trình được mô tả ở mục quy trình chung. Sau công đoạn lên men chính, sản phẩm được lọc bằng màng lọc và rót vào chai thủy tinh thể tích 250 mL, thanh trùng nhiệt bằng bể điều nhiệt (Memmert, Đức) ở nhiệt độ lần lượt là 60, 65 và 75°C trong thời gian lần lượt là 5, 10 và 15 phút. Sự khác biệt về giá trị pH, hàm lượng chất khô hoà tan, hàm lượng ethanol, giá trị cảm quan và hàm lượng vi sinh vật tổng số giữa các mẫu sản phẩm được theo dõi và đo lường theo phương pháp được mô tả ở mục phương pháp phân tích.

### Khảo sát sự ổn định chất lượng sản phẩm theo thời gian bảo quản

Mẫu sản phẩm lên men và thanh trùng đạt yêu cầu về hàm lượng vi sinh vật tổng số, chất lượng cảm quan về độ trong và màu sắc, mùi, vị và được lựa chọn đưa vào bảo quản. Sản phẩm được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng theo thời gian lần lượt là 10, 20, 30, 40 ngày. Sau thời gian bảo quản nhất định, các giá trị pH, hàm lượng chất khô hoà tan, hàm lượng ethanol, giá trị cảm quan và hàm lượng vi sinh vật tổng số của sản phẩm được đo lường theo phương pháp được mô tả ở mục phương pháp phân tích.

### Phương pháp xử lý số liệu

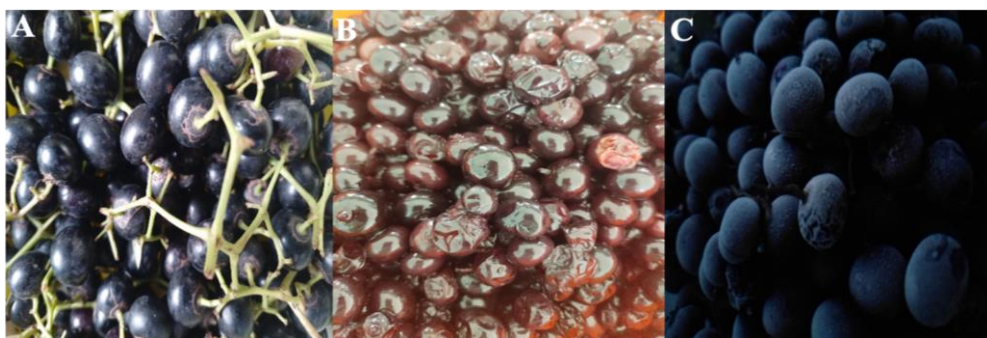
Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, số liệu thí nghiệm được phân tích bằng phần mềm Statgraphics XV.I và Microsoft office 365.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản trái đến thể tích dịch quả

Sau 2 ngày, trái giắc được bảo quản ở điều kiện 4°C có trình trạng hư, trái chuyển màu nâu sậm (Hình 1B) thay vì là màu tím đen như trái tươi (Hình 1A) và trái trữ ở nhiệt độ -18°C (Hình 1C). Thể tích thu hồi dịch quả từ trái ở điều kiện trữ 4°C cũng đạt thấp nhất với 681,67 mL/kg, so với trái trữ đông là 875 mL/kg và trái tươi là 758,3 mL/kg (Bảng 1). Kết quả cho thấy điều kiện đông lạnh trái ở nhiệt độ -18°C không những giúp tránh việc tổn thất do hư hỏng mà còn giúp thể tích thu hồi dịch quả đạt giá trị cao nhất. Giá trị pH và hàm lượng chất khô hoà tan không có sự khác biệt rõ rệt, cho thấy các điều kiện trữ trái không ảnh hưởng đáng kể đến giá trị pH của dịch trái giắc. Theo một số nghiên cứu về điều kiện bảo quản nho, chất lượng nho không hạt Thomson của Hy Lạp được cho là bảo quản tốt hơn trong thời 2 tuần ở nhiệt độ -1,5°C và trong 3 tuần ở nhiệt độ -0,5°C so với nhiệt độ 3,5°C (Mensink, Westra, 2017). Ngoài ra, thời gian bảo quản tăng và chất lượng được đảm bảo tốt hơn khi trữ nho ở nhiệt độ thấp, giảm hao hụt, không thấy sự tổng hợp lycopene và hàm lượng vitamin C được giữ lại (Cantwell *et al.*, 2009; Tamizheezham *et al.*, 2018).





Hình 1. Trái giắc được sử dụng trong nghiên cứu

A: Trái tươi; B: Trái giắc sau 2 ngày trữ ở điều kiện nhiệt độ 4°C; C: Trái giắc sau 2 ngày trữ ở điều kiện nhiệt độ -18°C.

Bảng 1. Ảnh hưởng phương pháp xử lý đến thể tích dịch trái thu hồi, pH và độ Brix của dịch trái giắc

	Thể tích (mL/kg)	pH	°Brix
Trái tươi	758,30 <sup>b</sup>	3,08	6,33
Trữ mát (4°C)	681,67 <sup>c</sup>	3,08	6,67
Trữ đông (-18°C)	875,00 <sup>a</sup>	3,08	7,00

\*Ghi chú: các chữ cái giống nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%.

Trái giắc bảo quản ở điều kiện -18°C thu được thể tích dịch quả tốt nhất. Lượng dịch quả thu hồi ở điều kiện trữ lạnh đông nhiều hơn so với việc bảo quản mát và trạng thái trái tươi. Giá trị pH của dịch trái không khác nhau ở các điều kiện bảo quản trái. Giá trị hàm lượng chất khô hòa tan của dịch trái cao nhất khi trái được trữ đông, cao hơn so với 02 điều kiện bảo quản còn lại. Ở điều kiện đông lạnh, dễ làm phá vỡ tế bào mang lại hiệu quả tốt cho quá trình thu hồi dịch quả và hàm lượng các hợp chất hoạt tính sinh học hiện diện cao hơn (Chan *et al.*, 2013; Đoàn Thị Kiều Tiên *et al.*, 2023). Với mục đích đạt được thể tích thu hồi dịch quả cao khi đưa vào quá trình sản xuất, bên cạnh đó cũng có thể đạt được hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học trong dịch quả tốt hơn, do đó phương pháp trữ đông lạnh trái giắc được chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

### Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thanh trùng đến nước trái giắc lên men

Nhiệt độ thanh trùng rất quan trọng trong việc đảm bảo chất lượng và bảo quản thực phẩm nếu nhiệt độ quá thấp một số vi sinh vật có hại không thể bị tiêu diệt. Ngược lại, nhiệt độ quá cao thì sẽ làm giảm hoặc mất đi các chất dinh dưỡng, giảm tính chất cảm quan, sản phẩm sẽ giảm giá trị. Bên cạnh nhiệt độ thanh trùng thì thời gian thanh trùng cũng góp phần rất quan trọng trong việc đảm bảo chất lượng và bảo quản sản phẩm. Nếu như nhiệt độ thanh trùng chưa thích hợp mà thời gian quá ngắn cũng không thể tiêu diệt vi sinh vật có hại. Tác động của nhiệt độ và thời gian thanh trùng đến sự tồn tại của vi sinh vật tổng số, giá trị cảm quan và chỉ tiêu hóa lý của sản phẩm được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật tổng số, cảm quan và hóa lý

Nghiệm thức	Nhiệt độ °C	Thời gian (phút)	VSV tổng số	Độ trong và màu sắc	Mùi	Vị	pH	°Brix	Ethanol ở 20°C (% v/v)
1		5	0	5,0 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	4,9 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	18 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>
2	65	10	0	5,0 <sup>a</sup>	4,7 <sup>c</sup>	4,8 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	19 <sup>ab</sup>	6 <sup>a</sup>
3		15	0	4,9 <sup>ab</sup>	4,9 <sup>ab</sup>	5,0 <sup>a</sup>	4,49 <sup>a</sup>	20 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>
4		5	0	5,0 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	4,5 <sup>bc</sup>	4,50 <sup>a</sup>	18 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>
5	70	10	0	5,0 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	4,5 <sup>bc</sup>	4,48 <sup>a</sup>	17 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>
6		15	0	4,8 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	4,5 <sup>bc</sup>	4,50 <sup>a</sup>	19 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>
7		5	0	5,0 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	4,5 <sup>bc</sup>	4,50 <sup>a</sup>	19 <sup>ab</sup>	6 <sup>a</sup>
8	75	10	0	5,0 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	4,3 <sup>c</sup>	4,49 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
9		15	0	4,9 <sup>ab</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	4,3 <sup>c</sup>	4,50 <sup>a</sup>	19 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>
				0,001	0,000	0,000	1,000	0,046	0,000

\*Ghi chú: các chữ cái giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy các mẫu ở nghiệm thức 1 (65°C - 5 phút), 4 (70°C - 5 phút), 5 (70°C - 10 phút), và 7 (75°C - 5 phút) đạt tối đa 5 điểm về độ trong màu sắc và mùi, tuy nhiên về vị thì mẫu ở nghiệm thức 1 (65°C - 5 phút) với 4,9 điểm là cao hơn so với các mẫu 4 (70°C - 5 phút), 5 (70°C - 10 phút), và 7 (75°C - 5 phút) với cùng số điểm được đánh giá là 4,5 điểm. Thanh trùng ở nhiệt độ và thời gian phù hợp làm giảm mật độ nấm men và nấm mốc dưới mức phát hiện được 1 log CFU/mL và được duy trì tốt trong suốt thời gian bảo quản nhưng vẫn giữ được màu sắc của nước ép xoài (Mandha *et al.*, 2023). Ở đây, không phát hiện hàm lượng vi sinh vật tổng số trong sản phẩm và duy trì ổn định trong suốt thời gian bảo quản. Thanh trùng bằng nhiệt nhằm làm tăng thời hạn sử dụng nhưng yêu cầu chất lượng sản phẩm ổn định và không thay đổi theo thời gian, do đó cần điều chỉnh và lựa chọn điều kiện nhiệt độ và thời gian phù hợp sao cho những thay đổi về chất lượng cảm quan ít nhất, đạt chỉ tiêu hoá lý và dinh dưỡng của sản phẩm (Wibowo *et al.*, 2015; Minh *et al.*, 2019; Mandha *et al.*, 2023). Nhiệt độ 65°C và thời gian 5 phút là giá trị thấp nhất được khảo sát trong nghiên cứu này đạt kết quả đánh giá cảm quan tốt, sự khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% so với các điều kiện khảo sát còn lại. Do đó, xem xét về hiệu quả kinh tế, tiết kiệm thời gian nhưng vẫn đảm bảo sự an toàn cho sản phẩm, điều kiện thanh trùng nhiệt độ 65°C trong thời gian 5 phút được lựa chọn để theo dõi tiếp sự thay đổi của sản phẩm trong thời gian bảo quản.

**Sự ổn định của nước trái giác lên men theo thời gian sau quá trình thanh trùng**

Trong 10 ngày bảo quản, chất lượng của sản phẩm thể hiện sự ổn định được đánh giá với 4,97 điểm độ trong và màu sắc, 4,93 điểm mùi và 4,73 điểm vị, sự khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% so với các kết quả khảo sát được ở ngày đầu tiên sau lên men. Đến ngày bảo quản thứ 40 các điểm cảm quan về độ trong và màu sắc, mùi và vị có xu hướng giảm dần với đánh giá lần lượt là 4,77, 4,53 và 4,42 điểm. Ở ngày thứ 30, hàm lượng ethanol tăng nhẹ từ 5,33% v/v lên 6,17% v/v nhưng duy trì giá trị này đến ngày thứ 40 trong quá trình bảo quản.

Bên cạnh đó, ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 5 phút trong suốt thời gian bảo quản không phát hiện vi sinh vật tổng số, chứng tỏ chế độ thanh trùng sản phẩm đảm bảo chỉ tiêu vi sinh vật tổng số trong thời gian 40 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng (28-30°C). Một nghiên cứu trước đó cho thấy nước trái giác lên men sau 5 tuần bảo quản bằng thanh trùng nhiệt và Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ở nhiệt độ phòng (28-30°C) vẫn giữ được mùi vị, độ trong và màu sắc ban đầu của sản phẩm (Đoàn Thị Kiều Tiên *et al.*, 2024).

**Bảng 3. Vi sinh vật tổng số, chỉ tiêu cảm quan và chỉ tiêu hóa lý trong thời gian theo dõi sản phẩm**

Thời gian (ngày)	VSV tổng số	Đánh giá cảm quan			Chỉ tiêu hóa lý		
		pH	°Brix	Ethanol ở 20°C (% v/v)	Độ trong và màu sắc	Mùi	Vị
0	0	4,50 <sup>a</sup>	19,00 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	4,87 <sup>ab</sup>	4,97 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>
10	0	4,50 <sup>a</sup>	19,00 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	4,97 <sup>a</sup>	4,97 <sup>a</sup>	4,73 <sup>ab</sup>
20	0	4,49 <sup>a</sup>	17,67 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	4,77 <sup>bc</sup>	4,77 <sup>b</sup>	4,67 <sup>bc</sup>
30	0	4,46 <sup>b</sup>	15,33 <sup>b</sup>	6,17 <sup>a</sup>	4,87 <sup>ab</sup>	4,63 <sup>c</sup>	4,53 <sup>cd</sup>
40	0	4,44 <sup>c</sup>	14,67 <sup>b</sup>	6,17 <sup>a</sup>	4,77 <sup>c</sup>	4,53 <sup>cd</sup>	4,42 <sup>d</sup>
<i>P-valule</i>		0,0000	0,0000	0,0122	0,0001	0,000	0,000
<i>F-Ratio</i>		54,69	34,68	4,80	14,46	31,80	18,23

\*Ghi chú: các chữ cái giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%.

Độ trong và màu sắc của sản phẩm dần thay đổi theo thời gian cho thấy có thể có một số yếu tố như quá trình oxy hóa hoặc tiếp xúc với ánh sáng, góp phần vào sự biến đổi của mẫu sản phẩm. Tuy nhiên, mùi của sản phẩm hầu như không bị ảnh hưởng, hay nói cách khác hương thơm tự nhiên và đặc trưng của nguyên liệu trái giác vẫn giữ được tốt. Độ ổn định của sản phẩm trong suốt thời gian bảo quản là vô cùng quan trọng vì nó đảm bảo cho người tiêu dùng có thể cảm nhận được mùi, vị của sản phẩm từ ngày bảo quản đầu tiên cho đến ngày thứ 40 (Hình 2). Ngoài ra, việc không có vi sinh vật bằng việc kiểm nghiệm trong thời gian bảo quản đóng vai trò đảm bảo các điều kiện vệ sinh và an toàn thực phẩm. Các biện pháp kiểm soát nghiêm ngặt về chất lượng đóng một vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa sự xâm nhiễm của vi sinh vật gây hại, làm nổi bật hơn nữa tính ổn định và độ tin cậy của sản phẩm.



**Hình 2. Sản phẩm nước trái giác lên men sau thời gian bảo quản**

**KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đạt được những kết quả đối với việc xác định phương pháp xử lý trái giắc trước khi đưa vào quy trình sản xuất nước uống lên men. Phương pháp đông lạnh ở nhiệt độ  $-18^{\circ}\text{C}$  trong hai ngày trước khi ép sẽ thu được lượng dịch quả nhiều hơn. Sản phẩm thanh trùng ở nhiệt độ  $65^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút được duy trì ổn định về chất lượng cảm quan và không phát hiện sự xuất hiện của vi sinh vật tổng số trong 40 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng. Kết quả này góp phần khẳng định thêm về vai trò của phương pháp tiền xử lý trái trong quy trình chế biến nước trái cây hoặc nước trái cây lên men, tác dụng của chế độ thanh trùng nhiệt đối với sản phẩm nước trái cây lên men. Bên cạnh đó, kết quả cũng mở ra định hướng có thể nghiên cứu nhiều phương pháp khác để bảo quản nước trái cây lên men, sao cho thích hợp và hiệu quả đối với dạng sản phẩm này.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Bộ Khoa học và Công nghệ (1979). Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 3215:1979. Sản phẩm thực phẩm - Phân tích cảm quan - Phương pháp cho điểm.
- Cantwell M, Nie X, Hong GH (2009). Impact of storage conditions on grape tomato quality. *The 6th ISHS Postharvest Symposium Antalya*, Turkey. April 8-12.
- Chan EWC, Lye PY, Tan YP (2013). Antioxidant properties of herbs with enhancement effect of drying treatments: A synopsis. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(1): 2-6.
- Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Ngọc Thanh, Bùi Hoàng Đăng Long, Hà Thanh Toàn, Ngô Thị Phương Dung (2021). Tổng quan: Phân lập, tuyển chọn và ứng dụng nấm men chịu nhiệt trong lên men rượu vang trái giắc. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, Tập 57, Số 6: 132-143.
- Đoàn Thị Kiều Tiên, Võ Yến Oanh, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong (2023). Sự thay đổi hàm lượng polyphenol tổng số trong trái giắc (*Cayratia trifolia* L.) theo thời gian thu hoạch và phương pháp xử lý dịch quả. *Tạp chí Đại học Thái Nguyên*, 228(13): 366 – 373.
- Đoàn Thị Kiều Tiên, Trịnh Ngọc Tiên, Trần Hoàng Hiệp, Lê Trí Ân, Trần Diễm Phương, Đoàn Hải Đăng, Huỳnh Thị Ngọc Mi (2024). Phương pháp làm trong và ổn định nước trái giắc lên men (*Cayratia trifolia* (L.)). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Kỹ thuật và Công nghệ Cần Thơ*, Số 1: 38-49.
- ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms.
- Mandha J, Shumoy H, Matemu AO, Raes K (2023). Characterization of fruit juices and effect of pasteurization and storage conditions on their microbial, physicochemical, and nutritional quality. *Food Bioscience*, 51.
- Mensink M, Westra E (2017). Effect of storage temperature and time on quality of Thompson seedless table grapes from Greece. *Wageningen Food & Biobased Research*.
- Minh NP, Phạm VT, Thang CV, Canh NM, Tiên VK, Trinh TV (2019). Technical parameters affecting the production of soursop (*Annona muricata*) juice. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3): 1068-1072.
- Moreno-Perez A, Vila-Lopez R, Fernandez-Fernandez JI, Martinez-Cutillas A, Gil-Munoz R (2013). Influence of cold pre-fermentation treatments on the major volatile compounds of three wine varieties. *Food Chem*, 139(1-4): 770-776.
- Tamizheezham U, Muthuvel I, Subbiah A (2018). Effect of temperature on shelf life of Muscat Hamburg grapes under storage. *Madras Agricultural Journal*, 105 (7-9)(2): 426-429.
- Wibowo S, Grauwet T, Gedefá GB, Hendrickx M, Van Loey A (2015). Quality changes of pasteurized mango juice during storage. Part I: Selecting shelf-life markers by integration of a targeted and untargeted multivariate approach. *Food Res Int*, 78: 396-409.
- Zhang WJ, Zheng XX, Tian XJ, Li YY, Wang J (2023). The influence of different pretreatment methods on the quality of wines made from table grapes. *Acta Aliment Hung* 52(2): 305-316.

## EFFECTS OF THE PRETREATMENT AND PASTEURIZATION PROCESS ON FERMENTED DRINK FROM *CAYRATIA TRIFOLIA* L.

Doan Thi Kieu Tien\*, Huynh Nguyen Nhu Quynh, Huynh Thanh Can, Huynh Thi Ngoc Mi

Faculty of Biological, Chemical and Food Technology, Can Tho University of Technology

**SUMMARY**

This study examined to survey the basic pre-fermentation treatment conditions affecting juice recovery, as well as the temperature and duration of pasteurization impacting the organoleptic quality and stability of post-fermented products during storage. The results showed that *Cayratia trifolia* berries stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  for 2 days were well preserved and had a higher juice content than those stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . The pressing method yielded a higher juice recovery at 875 mL/kg. The fermented product pasteurized at  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 min was stable for 40 days with good sensory points of clarity, color, smell, and taste and the ethanol content of 6.17% v/v.

**Keywords:** *Cayratia trifolia* L., low-alcohol drink, pasteurization, storage.

\* Author for correspondence: Tel: 0919005068; Email: dtktien@ctuet.edu.vn

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *ASPERGILLUS SYDOWII* TĐ5 PHÂN LẬP TỪ HÒM GỖ CỦA MỘT SỐ HOẠT CHẤT KHÁNG NẤM

Trần Khánh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Vũ Hùng<sup>4</sup>, Nguyễn Văn Đại<sup>4</sup>, Quách Ngọc Tùng<sup>2,3</sup>, Ngô Cao Cường<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Việt Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học, Việt Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Công ty TNHH MTV Cơ điện và Vật liệu nổ 31

### TÓM TẮT

Nấm sợi *Aspergillus sydowii* được biết tới là một trong những tác nhân chính gây ra hiện tượng mục rữa hay phá hủy gỗ và các sản phẩm làm từ gỗ. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng ức chế nấm *A. sydowii* của các hoạt chất preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA), đồng sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) và chế phẩm AM-QS (chứa 3 hoạt chất trên với tỷ lệ 1:2:2). Chủng nấm TĐ5 được phân lập từ hòm gỗ bị mục nát được định danh là *A. sydowii* bằng phương pháp quan sát hình thái và phân tích trình tự gen ITS. Đặc biệt, nấm *A. sydowii* TĐ5 sinh enzyme ngoại bào như cellulase, amylase và laccase với đường kính vòng phân giải lần lượt là  $15,6 \pm 0,3$  mm,  $17,3 \pm 0,2$  mm,  $20,8 \pm 0,5$  mm, tương ứng. Thử nghiệm khả năng ức chế nấm cho thấy các hoạt chất preventol,  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  và chế phẩm AM-QS đều có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *A. sydowii* TĐ5 với giá trị MIC lần lượt là 0,04 mg/L, 10 mg/L, 600 mg/L và 1%. Trong đó, chế phẩm AM-QS thể hiện khả năng ức chế nấm vượt trội so với các đơn chất thành phần. Nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học cho ứng dụng các hoạt chất trên trong việc bảo quản gỗ và các sản phẩm từ gỗ.

*Từ khóa:* *Aspergillus sydowii*, đồng sulfat, enzyme ngoại bào, kháng nấm, preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde.

### MỞ ĐẦU

Vật liệu gỗ được sử dụng trong đa lĩnh vực như xây dựng, nội thất, sản xuất giấy và nhiều sản phẩm khác. Đặc biệt là trong quân đội, gỗ được gia công thành các hòm gỗ chuyên bảo quản các trang thiết bị, vật tư, khí tài, các chi tiết cũng như ống giấy bảo quản. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới ở Việt Nam rất thuận lợi cho vi sinh vật nói chung và nấm sợi nói riêng phát triển. Một số chi nấm thường xuất hiện trên vật liệu gỗ là *Aspergillus*, *Penicillium* và *Trichoderma* (Trần Ngọc Trang *et al.*, 2021). Khi nấm sợi phát triển trên một số vật liệu như gỗ, bìa carton hay giấy, chúng sẽ sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào phân hủy thành phần của vật liệu gỗ là các polymer phức tạp như hemicellulose, cellulose và lignin thành dạng dinh dưỡng đơn giản và dễ hấp thụ như đường và acid amin để có thể sinh trưởng và phát triển (Trần Ngọc Trang *et al.*, 2021). Điều này gây ra hiện tượng mục rữa, thay đổi cấu trúc, đặc tính ban đầu của vật liệu.

Các hóa chất có chứa ion đồng như đồng sunfat, oxit đồng, đồng naphthenat,... là các chất ức chế nấm điển hình tác động vào quá trình hô hấp của tế bào nấm do có ái lực với các nhóm hóa học khác nhau trong tế bào của nấm, đặc biệt là với các nhóm thiol, dẫn đến sự phá hủy chức năng không đặc hiệu của protein và enzyme (Reinprecht *et al.*, 2008). Ngoài ra, cơ chế tương tự cũng được tìm thấy ở các hợp chất asen, 2- phenylphenol (preventol), pentachlorophenol và các hợp chất phenolic khác (Reinprecht *et al.*, 2008). Hiện nay, xu hướng tìm đến các hoạt chất diệt vi sinh vật như vi khuẩn, nấm đảm bảo an toàn, thân thiện với môi trường có nguồn gốc tự nhiên đang được quan tâm. Cinnamaldehyde, thành phần chính trong tinh dầu quế và các dẫn xuất của nó ( $\alpha$ -bromocinnamaldehyde,  $\alpha$ -chlorocinnamaldehyde, và  $\alpha$ -methylcinnamaldehyde) có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase mạnh, gây độc và gây đột biến tế bào nấm (Cui *et al.*, 2015). Tuy nhiên, chưa có nhiều thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế nấm gây hại trên các vật liệu hòm gỗ sử dụng trong quân đội.

Nghiên cứu này tập trung đến đánh giá đặc tính sinh học của chủng nấm TĐ5 phân lập từ hòm gỗ bị phân hủy. Đồng thời, các thử nghiệm hoạt tính ức chế *A. sydowii* TĐ5 bởi  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  và chế phẩm AM-QS cũng được thực hiện. Kết quả nghiên cứu này tạo tiền đề phát triển các nghiên cứu khác nhằm nâng cao độ bền của gỗ trong điều kiện nhiệt đới tại Việt Nam và cũng như khí tài sử dụng trong quân đội.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Chủng giống

Chủng nấm TĐ5 được phân lập từ mẫu hòm gỗ thu thập tại tỉnh Đồng Nai và được lưu giữ tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga, Bộ Quốc phòng. Chủng nấm được bảo quản và hoạt hóa trên môi trường Czapek–Dox (Ngo *et al.*, 2021).

Preventol,  $\alpha$ -BCA và  $\text{CuSO}_4$  dạng tinh thể được mua từ hãng Sigma-Aldrich. Chế phẩm dung dịch AM-QS được tạo thành bởi 3 đơn chất preventol,  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  theo tỷ lệ 1:2:2. Một số hóa chất dùng trong môi trường nuôi cấy có xuất xứ Trung Quốc, Việt Nam.

## Phương pháp

### Nghiên cứu đặc điểm phân loại của chủng nấm sợi

Tiến hành hoạt hóa lại chủng nấm lên môi trường thạch Czapek–Dox, sau 5 ngày nuôi ở  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  đem ra quan sát hình thái khuẩn lạc. Xác định hình dạng tế bào bằng cách làm tiêu bản soi dưới kính hiển vi quang học Zeiss Axiocam 503 Color Camera Unit với độ phóng đại 400 lần. Để phân loại đến loài, chủng nấm TD5 được khuếch đại gen vùng bảo thủ ITS bằng cặp mồi ITS1 và ITS4 thông qua phản ứng PCR (Ngo *et al.*, 2021). Sản phẩm PCR tinh sạch sau đó được giải trình tự tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11.

### Xác định khả năng sinh enzym ngoại bào

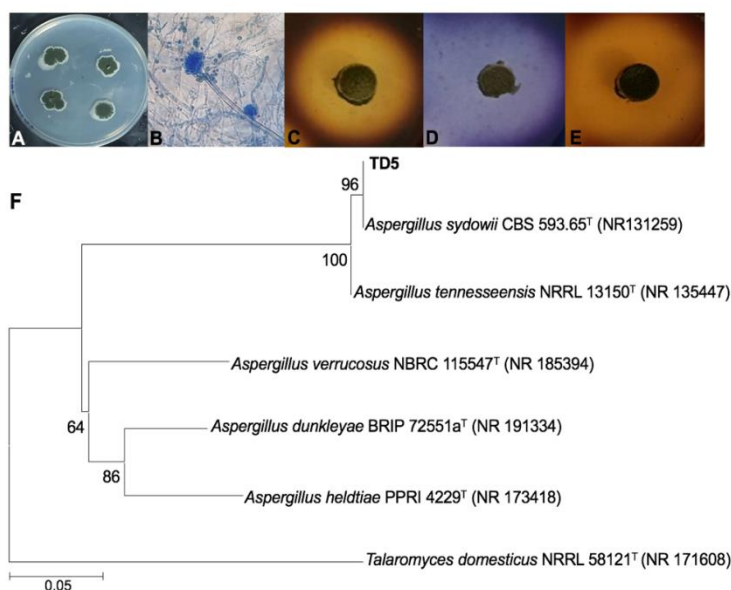
Phương pháp thối thạch được sử dụng để kiểm tra khả năng sinh các enzym ngoại bào như cellulase, amylase và laccase của chủng nấm thử nghiệm (Abdallah *et al.*, 2019; Adegoke *et al.*, 2019; Anita *et al.*, 2013). Chủng nấm TD5 được nuôi cấy trên đĩa Czapek–Dox và sau khoảng 4-5 ngày tiến hành đục thối thạch đường kính 4 mm, đặt thối lên các đĩa chứa các cơ chất tương ứng 1% carboxymethyl cellulose (CMC), 0,5% tinh bột và 0,05% guaiacol. Các đĩa đặt trong tủ lạnh 4-6 giờ và sau đó nuôi cấy trong tủ ẩm ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 24 giờ. Hoạt tính enzym được xác định bằng đường kính vòng phân giải cơ chất đặc hiệu.

### Đánh giá khả năng kháng nấm của các hoạt chất thử nghiệm

Khảo sát khả năng ức chế thông qua việc xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC của các hoạt chất lên bào tử nấm bằng kính hiển vi điện tử được tiến hành theo mô tả trước đây (Xu *et al.*, 2007). Mật độ bào tử nấm được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh nồng độ dịch về mật độ bào tử là  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Các phiến kính lồi vô trùng được chuẩn bị và bổ sung 30  $\mu\text{l}$  môi trường Czapek–Dox đã pha sẵn hoạt chất với các nồng độ khác nhau trộn đều với 2  $\mu\text{l}$  dịch bào tử ở nồng độ  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Các mẫu thử nghiệm được bổ sung với các nồng độ hoạt chất kháng nấm khác nhau như sau:  $\text{CuSO}_4$  (0 - 600mg/L), preventol (0 - 0,05 mg/L),  $\alpha$ -BCA (0 - 30mg/L) và chế phẩm AM-QS (0 - 2%). Phiến kính đã cấy đặt trên giấy lọc đặt trong 1 đĩa Petri và ủ ở  $30^\circ\text{C}$ . Theo dõi khả năng nảy mầm của bào tử sau 24h, và 48h bằng kính hiển vi điện tử. Các bào tử được xác định là nảy mầm nếu chiều dài ống mầm bằng hoặc lớn hơn chiều dài bào tử. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC được xác định là nồng độ hoạt chất tối thiểu ức chế trên 90% sự phát triển của bào tử nấm. Phần trăm ức chế nảy mầm của bào tử nấm (SGI) được tính theo công thức:  $(\text{GC-GT})/\text{GC} \times 100$ . Trong đó, với GC, GT lần lượt là số lượng bào tử nảy mầm của mẫu đối chứng và mẫu chứa hoạt chất.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân loại của chủng nấm thử nghiệm TD5



**Hình 1. Đặc điểm hình thái (A,B), khả năng sinh cellulase, amylase, laccase (C,D,E) và cây phát sinh loài dựa theo phân tích trình tự ITS của chủng nấm TD5 và một số chủng nấm dùng để tham chiếu**

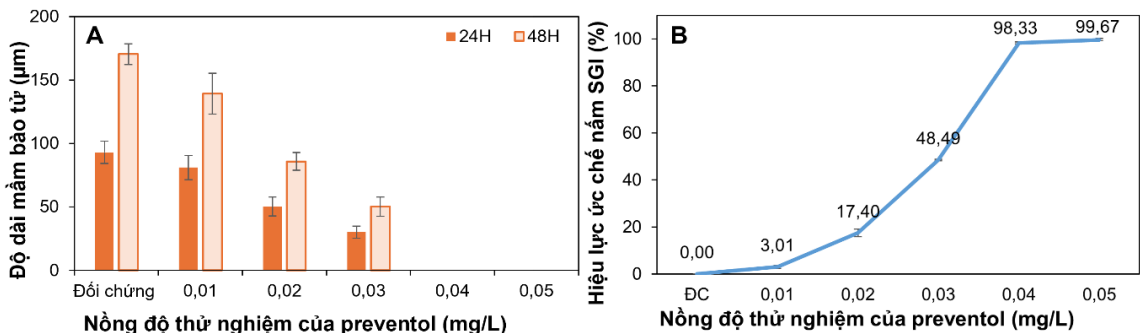
Khuẩn lạc chủng TĐ5 dạng tỏa tròn, bên trong màu xanh rêu, viền ngoài màu trắng trên môi trường Czapek–Dox. Bề mặt khuẩn lạc dạng nhung mịn hoặc xốp nhẹ, không sinh giọt tiết và có tạo sắc tố xanh ra môi trường (Hình 1A). Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy hệ sợi có vách ngăn (Hình 1B). Cuống nhẵn, đầu cuống có bông hình cầu hoặc chùy ngắn, khắp bề mặt đính nhiều thể bình 2 lớp: lớp 1 hình con quay và lớp 2 hình elip. Bào tử tròn, có gai, màu lục, đính từng chùm dây trên mỗi thể bình. Dựa vào đặc điểm hình thái, chủng TĐ5 được xác định thuộc chi *Aspergillus* (Lâm Thị Việt Hà *et al.*, 2009). Phân tích trình tự vùng ITS cho thấy chủng TĐ5 có độ tương đồng cao và tạo thành 1 nhóm riêng biệt với *Aspergillus sydowii* với giá trị bootstrap đạt 96% (Hình 1F). Trình tự ITS của chủng TĐ5 được đăng kí trên cơ sở dữ liệu Genbank với mã số truy cập OR135783.1.

**Đánh giá khả năng sinh enzym ngoại bào của chủng nấm TĐ5**

Nghiên cứu thử nghiệm trên 3 loại cơ chất khác nhau CMC, tinh bột và guaiacol nhằm đánh giá khả năng phân hủy gỗ của chủng TĐ5. Kết quả cho thấy chủng này có khả năng sinh cả cellulase, amylase và laccase với đường kính vòng phân giải lần lượt là  $15,6 \pm 0,3$  mm,  $17,3 \pm 0,2$  mm,  $20,8 \pm 0,5$  mm, tương ứng (Hình 1C,D,E). Anita đã chỉ ra rằng *Aspergillus* là một trong các chi nấm sinh tổng hợp cellulase mạnh (Anita *et al.*, 2013). Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu của Yomna K Abdallah xác định *Aspergillus sydowii* là nguồn sản xuất laccase (Abdallah *et al.*, 2019). Điều này phù hợp với nguồn phân lập *A. sydowii* TĐ5 là từ hòm gỗ bị mục.

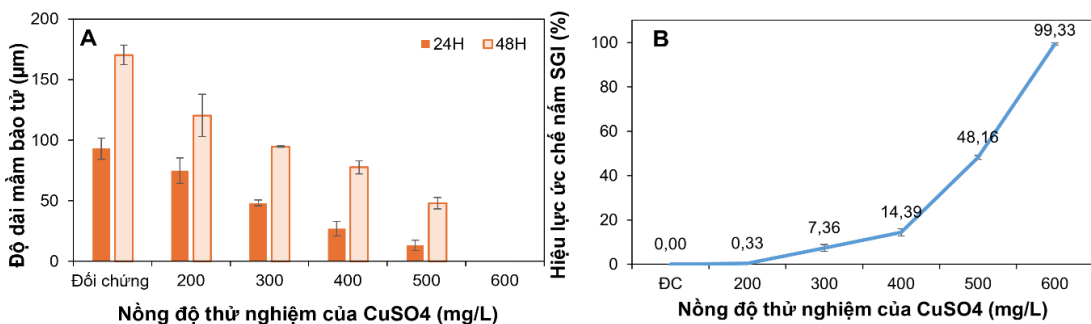
**Khả năng ức chế chủng TĐ5 của preventol, đồng sulfat và  $\alpha$ -bromocinamaldehyde**

Mẫu đối chứng không chứa chất ức chế cho thấy sự phát triển mạnh sau 24 h, theo dõi độ dài sợi nấm đạt  $93,00 \pm 8,77$   $\mu$ m và tăng gần gấp đôi sau 48 h, chứng tỏ bào tử nấm nảy mầm và phát triển bình thường trong điều kiện thí nghiệm (Hình 3) (Hình 2). Khi khảo sát khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử bằng preventol, đồ thị thể hiện rõ xu hướng giảm độ dài mầm bào tử và tăng hiệu lực ức chế nảy mầm khi nồng độ preventol tăng. Các hình ảnh trên kính hiển vi cho thấy sự giảm số lượng bào tử nảy mầm và độ dài mầm bào tử theo độ tăng nồng độ preventol. Ở nồng độ 0,05 mg/L, hầu như không có bào tử nào nảy mầm. MIC của preventol đối với nấm sau 48 giờ là 0,04 mg/L tương ứng với hiệu lực ức chế SGI là 98,33%. Kết quả này gần như là tương đồng khi so với dữ liệu của Sabatini ghi nhận với nồng độ ức chế tối thiểu đối với *Aspergillus niger* là 0,25 – 0,5 mg/L (Sabatini *et al.*, 2021).



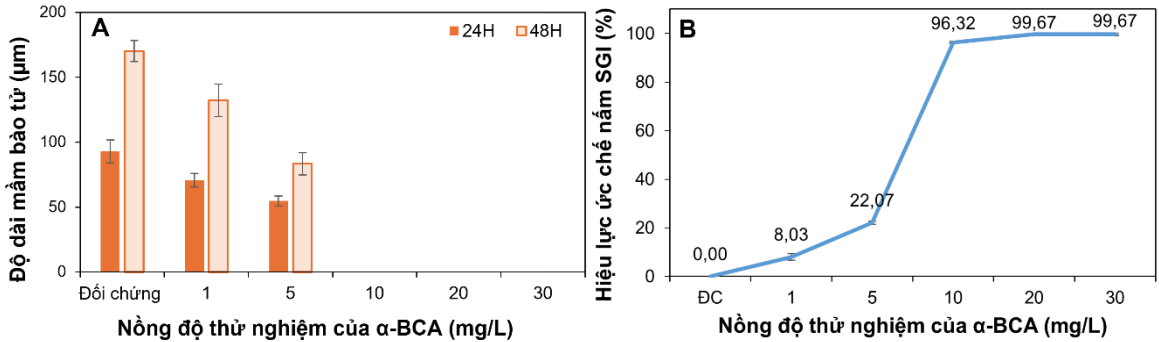
Hình 2. Tác động của preventol lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của preventol sau 48 giờ (B)

Với chất thử nghiệm là đồng sulfat, kết quả cho thấy MIC ở 600 mg/L, tại đây hiệu lực kháng nấm SGI đạt 99,33% (Hình 3). Kết quả này cho thấy nồng độ đồng sulfat trong thí nghiệm cao hơn nhiều lần so với thử nghiệm kháng nấm *Alternaria citri* sử dụng hạt nano CuO (80 mg/L) (Sardar *et al.*, 2022). Sự khác biệt này có thể đến từ kích thước của hạt và đối tượng thử nghiệm. Tuy vậy đồng sulfat vẫn cho khả năng ức chế nảy mầm bào tử với sự chênh lệch sự phát triển của sợi nấm qua thời gian và nồng độ CuSO<sub>4</sub>.



Hình 3. Tác động của CuSO<sub>4</sub> lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của CuSO<sub>4</sub> sau 48 giờ (B)

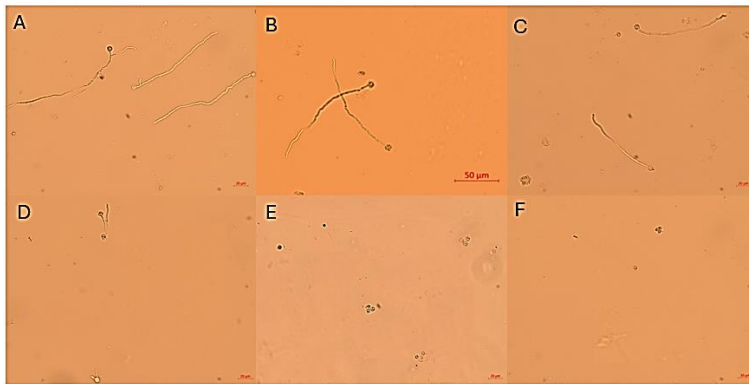
Đối với hoạt chất  $\alpha$ -BCA, với dải nồng độ 1, 5, 10, 20 và 30 mg/L, so với sự phát triển của sợi nấm ở mẫu đối chứng, độ dài của sợi nấm cũng đã có sự thay đổi rõ rệt khi có mặt chất ức chế. Ghi nhận sau 48 h kiểm tra thấy độ dài sợi nấm giảm từ  $132,40 \pm 12,47$   $\mu\text{m}$  xuống gần gần như không có sự nảy mầm của bào tử ở nồng độ 10 mg/L với hiệu lực ức chế đạt trên 90%, xác định được MIC của  $\alpha$ -BCA là 10 mg/L (Hình 4). Thử nghiệm 6 dẫn xuất của cinnamaldehyde trên nấm *Penicillium digitatum* cho thấy duy nhất 250 mg/L 4-methoxy cinnamaldehyde thể hiện hoạt tính ức chế nấm cao nhất với hiệu lực SGI đạt 92,87% (Gan *et al.*, 2020). Nhóm nghiên cứu cũng quan sát được hiện tượng phồng lên không đều và làm rỗng các tế bào sợi nấm, màng tế bào bị vỡ dần làm rò rỉ thể vùi tế bào chất dẫn đến chết tế bào khi có sự tác động của dẫn xuất này (Gan *et al.*, 2020).



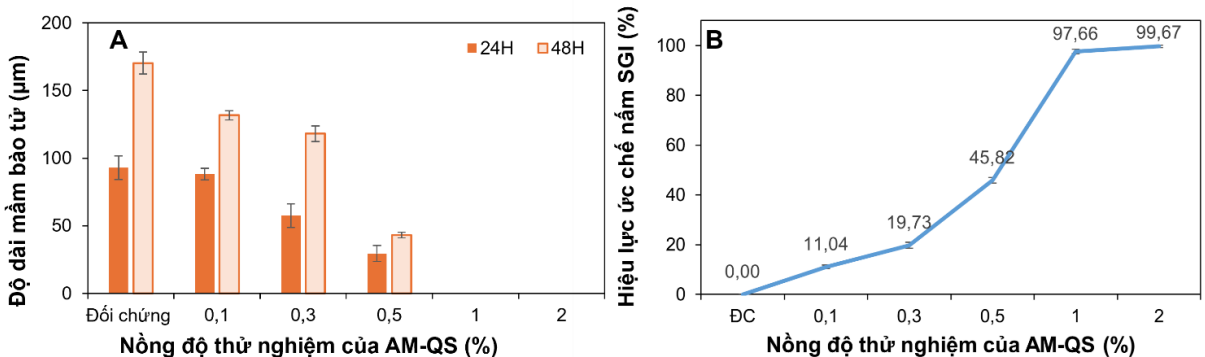
Hình 4. Tác động của  $\alpha$ -BCA lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của  $\alpha$ -BCA sau 48 giờ (B)

#### Khả năng ức chế nấm của chế phẩm AM-QS

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hoạt tính ức chế nấm TD5 gây hại của chế phẩm AM-QS chứa hỗn hợp 3 chất  $\text{CuSO}_4$ , preventol và  $\alpha$ -BCA. Kết quả Hình 5 cho thấy bào tử chủng nấm TD5 bị ức chế mạnh bởi chế phẩm AM-QS ở nồng độ từ 0,5 – 2% (Hình 5). Tại nồng độ AM-QS là 0,5%, hiệu lực ức chế đạt 90%. Tại nồng độ 1% AM-QS ức chế tới 97,66% sự nảy mầm của bào tử chủng nấm TD5, ở các nồng độ cao hơn 1% AM-QS ghi nhận khả năng ức chế hoàn toàn bào tử nấm thử nghiệm.



Hình 5. Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của chế phẩm AM-QS sau 48h. A-F lần lượt tương ứng với mẫu thử nghiệm tại AM-QS 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2 %



Hình 6. Tác động của  $\alpha$ -BCA lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của  $\alpha$ -BCA sau 48 giờ (B)

Có thể nói, chế phẩm AM-QS thể hiện khả năng ức chế nấm vượt trội so với các đơn chất thành phần. Điều này có thể là do sự hiệp đồng tác dụng giữa các hoạt chất, tạo ra hiệu quả ức chế mạnh mẽ hơn. Cụ thể là sự kết hợp của preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sulfat đã tạo ra một phổ tác động rộng hơn, ảnh hưởng đến nhiều quá trình sống của nấm, bao gồm cả sự nảy mầm của bào tử và sự phát triển của sợi nấm.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh nấm *Aspergillus sydowii* TĐ5 có khả năng sinh các enzym ngoại bào cellulase, amylase, laccase, và là nguyên nhân chính gây ra hiện tượng mục rữa gỗ. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã đánh giá khả năng kháng nấm của các hoạt chất preventol-0,04 mg/L,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde-10 mg/L, đồng sulfat-600 mg/L và chế phẩm AM-QS-1% đến sự nảy mầm của bào tử nấm *Aspergillus sydowii* TĐ5. Trong đó, chế phẩm AM-QS tăng khả năng ức chế nấm khoảng 100 lần so với các đơn chất thành phần. Kết quả này là cơ sở khoa học quan trọng cho việc ứng dụng các hoạt chất trên trong công tác bảo quản các sản phẩm gỗ nói chung và hòm gỗ bảo quản khí tài nói riêng.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện nhờ sự tài trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Quốc phòng "Nghiên cứu chế tạo chế phẩm đặc chủng AM-QS chống nấm mốc cho vật liệu gốc xenlulo ứng dụng trong công tác bảo quản vũ khí trang bị", mã số 2022.11.41.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdallah YK, Estevez AT, Tantawy DEDM, Ibraheem AM, Khalil NM (2019). Employing laccase-producing *Aspergillus sydowii* NYKA 510 as a cathodic biocatalyst in self-sufficient lighting microbial fuel cell. *J Microbiol Biotechnol*, 29 (12): 1861-1872.
- Adegoke S, Odibo FJP (2019). Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase of *Aspergillus sydowii* IMI 502692. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 20: 1050-1058.
- AnitaBB, Ramya D (2013). Biodegradation of Carboxymethyl Cellulose using *Aspergillus flavus*.
- Lâm Thị Việt Hà, Nguyễn Bảo Lộc, Nguyễn Thu Mai (2009). Phân lập và định danh sơ bộ một số loài *Aspergillus* trên hạt đậu phộng ở chợ Xuân Khánh- tp Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học* 2009, 11: 301-309.
- Sabatini L, Ciandrini E, Campana R (2021). Antifungal Activity of Vinegar on Different Types of Artistic Rear Canvases. *EC Microbiology*, 17: 03-10.
- Ngo CC, Nguyen QH, Nguyen TH, Quach NT, Dudhagara P, Vu THN, Le TTX, Le TTH, Do TTH, Nguyen VDJAS (2021). Identification of fungal community associated with deterioration of optical observation instruments of museums in Northern Vietnam. *Applied Sciences*, 11 (12): 5351.
- Reinprecht L (2008). Ochrana Dreva (Wood Protection). *Handbook, Technical University in Zvolen - Slovakia*.
- Sardar M, Ahmed W, Al Ayoubi S, Nisa S, Bibi Y, Sabir M, Khan MM, Ahmed W, Qayyum AJS (2022). Fungicidal synergistic effect of biogenically synthesized zinc oxide and copper oxide nanoparticles against *Alternaria citri* causing citrus black rot disease. *Saudi J Biol Sci*, 29 (1): 88-95.
- Trần Ngọc Trang, Lê Thị Song, Lê Cao Chiến (2021). Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng nấm mốc cho vật liệu xây dựng. *Tạp chí Vật liệu và Xây dựng*, 11 (6).
- Xu J, Zhao X, Han X, Du YJPB, Physiology (2007). Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pestic Biochem Phys*, 87 (3): 220-228.
- Cui Y, Liang G, Hu YH, Shi Y, Cai YX, Gao HJ, Chen QX, Wang Q (2015). Alpha-Substituted Derivatives of Cinnamaldehyde as Tyrosinase Inhibitors: Inhibitory Mechanism and Molecular Analysis. *J Agr Food Chem*.
- Gan Z, Huang J, Chen J, Nisar MF, Qi W (2020). Synthesis and Antifungal Activities of Cinnamaldehyde Derivatives against *Penicillium digitatum* Causing Citrus Green Mold. *J Food Quality*.



## EVALUATION ON ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *ASPERGILLUS SYDOWII* TD5 ISOLATED FROM ROTTING WOODEN CRATE OF BIOACTIVE COMPOUNDS

Tran Khanh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyen Vu Hung<sup>4</sup>, Nguyen Van Dai<sup>4</sup>, Quach Ngoc Tung<sup>2,3</sup>, Ngo Cao Cuong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Joint Vietnamese - Russia Tropical Science and Technology Research Center

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>4</sup>31 Electro mechanism and Explosive One Member Ltd., Co.

### SUMMARY

Filamentous fungus *Aspergillus sydowii* is known to be one of the main biological agents with the potential to decay or decompose wood and wood-based products. This study aims to evaluate antifungal potential against *A. sydowii* of the 4 compounds such as preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA), copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) and AM-QS product as a mixture of 3 mentioned compounds. The fungal strain TD5 isolated from rotting wooden crates was identified as *A. sydowii* by ITS gene sequence analysis. In particular, *A. sydowii* TD5 produced cellulase, amylase, and laccase with hydrolysis zones of  $15.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ,  $17.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $20.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ , respectively. The antifungal tests showed that preventol,  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  and AM-QS product were able to inhibit the spore germination of *A. sydowii* TD5 with MIC values of 0.04 mg/l, 10 mg/l, 600 mg/l, and 1%, respectively. In particular, the AM-QS product showed superior antifungal ability against *A. sydowii* TD5 compared to the other compounds. This study provides a scientific basis for the application of the antifungal compounds for the preservation of wood and wood-based products.

**Keywords:** Antifungal, *Aspergillus sydowii*, copper sulfate, extracellular enzyme, preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0982010336; Email: ngocaocuong2011@gmail.com

# HIỆU QUẢ CỦA VIỆC BỔ SUNG NITƠ ĐẾN KHẢ NĂNG PHÂN HỦY HYDROCACBON DẦU MỎ TRONG ĐẤT/CÁT Ô NHIỄM CỦA TẬP HỢP CHỦNG NẤM MEN

Nguyễn Thị Diễm Quỳnh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Yên<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Phương<sup>3</sup>,  
Trần Hương Ly<sup>1</sup>, Đinh Văn Tài<sup>1</sup>, Kiều Thị Quỳnh Hoa<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

<sup>2</sup>Học Viện khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

<sup>3</sup>Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

## TÓM TẮT

Phân hủy sinh học (Bioremediation) đất/cát ô nhiễm dầu bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như hàm lượng nitơ (N), photpho (P), kali (K), oxy, độ ẩm... Trong số các yếu tố này, N được xem là yếu tố chính ảnh hưởng đến hiệu quả và tốc độ phân hủy hydrocacbon dầu mỏ của vi sinh vật. N trong đất/cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ thường bị hạn chế do quá trình rửa trôi hoặc khử nitrat. Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến quá trình phân hủy sinh học đất ô nhiễm dầu thô của tập hợp gồm 3 chủng nấm men (DSNM1, VNNM1 và NTNM6) được phân lập từ nước biển ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ. Cả ba chủng này có hiệu quả phân hủy dầu thô và tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học tốt trên hai nguồn N là  $\text{NH}_4\text{Cl}$  và  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Kết quả đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến sinh trưởng và phân hủy dầu thô cho thấy, tập hợp chủng nấm men sinh trưởng và phân hủy dầu tốt trong cát với hàm lượng N là 500 - 1000 mg/kg, tốt nhất là 1000 mg/kg. Số lượng nấm men trong cát bổ sung 500 và 1000 mgN/kg ở thời điểm ban đầu (0) là  $1,1 \times 10^7$  MPN/g. Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, số lượng nấm men dao động từ  $7,5 \times 10^6$  -  $7,5 \times 10^7$  MPN/g trong cát bổ sung 500 mgN/kg và  $4,6 \times 10^7$  -  $4,6 \times 10^8$  (MPN/g) trong cát bổ sung 1000 mg N/kg. Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men là 48,3% khi không bổ sung N (0 mg N/kg); 74,5% khi bổ sung 500 mg N/kg; 89% khi bổ sung 1000 mg N/kg; 61% khi bổ sung 1500 mg N/kg. Kết quả nghiên cứu khẳng định tiềm năng phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men cũng như tác dụng của việc bổ sung N nhằm thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của chúng từ đó nâng cao hiệu quả phân hủy dầu.

*Từ khóa:* Bổ sung nitơ (N), đất/cát ô nhiễm dầu, dầu thô, nấm men, phân hủy sinh học.

## MỞ ĐẦU

Bên cạnh những lợi ích kinh tế, các hoạt động thăm dò, khai thác và vận chuyển hydrocacbon dầu mỏ chứa đựng nhiều nguy cơ gây ô nhiễm môi trường do các sự cố tràn dầu gây ra. Hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm không chỉ gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến con người, sinh vật và hệ sinh thái biển (vùng triều bãi cát ven biển, rừng ngập mặn, rạn san hô, đầm phá...) mà còn tác động tới kinh tế biển thông qua các ngành du lịch và nuôi trồng thủy hải sản (Lim *et al.*, 2016). Do đó, việc xử lý ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm từ các sự cố tràn dầu là cấp thiết.

Mặc dù phương pháp vật lý/cơ học (ngăn chặn, thu gom, làm đất, đốt tại chỗ, hấp phụ...) và hóa học (sử dụng chất phân tán, chất keo tụ, chất làm đông...) mang lại những hiệu quả nhất định nhưng các phương pháp này có chi phí xử lý cao do sử dụng hóa chất, vật liệu đắt tiền đồng thời gây ra ô nhiễm thứ cấp cho môi trường (Lại Thúy Hiền, 2011; Lim *et al.*, 2016). Với các ưu điểm như giá thành phù hợp, xử lý triệt để, không gây ô nhiễm thứ cấp, an toàn và thân thiện với môi trường, phương pháp phân hủy hydrocacbon dầu mỏ sinh học (Bioremediation) bằng vi sinh vật đang thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trong và ngoài nước (Edward *et al.*, 2007). Tuy nhiên, để thúc đẩy tốc độ, rút ngắn thời gian xử lý, cần nghiên cứu điều kiện phù hợp cho sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phân hủy dầu.

Trong quá trình sinh trưởng, phát triển hình thành tế bào mới, N và P được xem như yếu tố không thể thiếu cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật nói chung và VSV phân hủy dầu nói riêng vì đây là yếu tố tiên quyết, ảnh hưởng tới tốc độ và hiệu quả phân hủy dầu sinh học (Sawadogo *et al.*, 2016).

Sử dụng phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation) để xử lý đất, cát/trầm tích ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ có thể được ứng dụng ngay tại vùng ô nhiễm hoặc bên ngoài vùng ô nhiễm. So với các phương pháp khác,

phương pháp này an toàn và ít tốn kém hơn do đó, hiện được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu (Hamzah *et al.*, 2017).

Tuy nhiên, đất ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ thường bị hạn chế dinh dưỡng do nguồn cacbon chủ yếu là hydrocacbon dầu mỏ khó phân hủy và đặc biệt là nguồn chất dinh dưỡng cần thiết khác như N, P, K và các nguyên tố vi lượng khác bị hạn chế (Njoku *et al.*, 2012). Trong số các yếu tố kể trên, N được cho là chất dinh dưỡng quan trọng nhất ảnh hưởng tới tốc độ và hiệu quả phân hủy hydrocacbon dầu mỏ khi sử dụng phương pháp Bioremediation để xử lý đất, cát, trầm tích hay nước ô nhiễm dầu. Hàm lượng N bị hạn chế là do N trong đất có thể bị rửa trôi khi ở dạng nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) và bay hơi khi ở dạng  $\text{NH}_3$  hay N bị khử thành khí  $\text{N}_2\text{O}$  và  $\text{N}_2$  (Okolo *et al.*, 2005). Hơn nữa, ở những nơi ô nhiễm hydrocarbon, hàm lượng cacbon cao sẽ nhanh chóng làm cạn kiệt các chất dinh dưỡng vô cơ khác như N, P và K.

Hiện các nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng N đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm men phân hủy dầu trong đất, cát/trầm tích ô nhiễm dầu vẫn còn hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá: (1) Ảnh hưởng của các hàm lượng N ban đầu tới sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men; và (2) Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N tới hiệu quả phân hủy đất/cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men này bằng phương pháp phân hủy sinh học

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Tập hợp gồm 3 chủng nấm men biển (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) được phân lập lần lượt tại biển Hải Phòng (DSNM1), Vũng Tàu (VTNM1) và Nha Trang (NTNM16) có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất dầu thô và có khả năng sinh trưởng và tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học (CHĐBMSH) tốt trên nguồn N là  $\text{NH}_4\text{Cl}$  và  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Môi trường phân lập là Hansen (g/L): Glucose 30;  $\text{MgSO}_4$  2; pepton 10; NaCl 20; agar 18; pH6 và môi trường khoáng tối thiểu (mineral salt medium-MSM) (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5;  $\text{MgCl}_2$  1;  $\text{MgSO}_4$  0,5; NaCl 20 có nguồn cacbon (dầu thô) và N phù hợp, pH6. Các chủng nghiên cứu được nuôi lắc 180 vòng/phút ở  $30^\circ\text{C}$ . Dầu thô do xí nghiệp khai thác dầu khí, Liên doanh Việt Nga, Vietsovpetro cung cấp. Cát ở vùng triều cao, bãi biển (Khu 1) Đồ Sơn, Hải Phòng được sử dụng cho thí nghiệm. Các đặc tính vật lý và dinh dưỡng ban đầu của cát thí nghiệm được phân tích.

### Phương pháp

Xác định số lượng nấm men bằng phương pháp pha loãng tới hạn MPN (most probable number) (Man, 1983). Phân tích khả năng phân hủy dầu thô bằng phương pháp cân khối lượng (Latha và Kalaivani, 2012). Đánh giá khả năng tổng hợp CHĐBMSH của tập hợp chủng nấm men bằng chỉ số nhũ hóa với xylene ( $\text{E}_{24}$ ) (Cooper, 2003).

### **Thiết lập mô hình thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến sinh trưởng và khả năng phân hủy dầu của tập hợp chủng nấm men phân hủy hydrocacbon dầu mỏ**

#### ❖ Chuẩn bị cát thí nghiệm

Cát được sàng qua sàng 3 mm để loại bỏ các hạt lớn, sau đó khử trùng và làm khô trong tủ cấy vô trùng 7 ngày trước khi sử dụng. Cát đã làm khô sau đó được làm ô nhiễm dầu nhân tạo với hàm lượng dầu thô là 1% (w/w) tương đương với 10.000 mg/kg cát khô. Cát sau khi nhiễm dầu nhân tạo tiếp tục được làm khô sau 7 ngày để loại bỏ các hợp chất dễ bay hơi trong dầu thô. Sau đó, cát được chia đều (500 g cát/hộp) vào các hộp nhựa (khử trùng bằng cồn) có kích thước 10 x 15 x 8 cm cho các phương thức thí nghiệm sau:

(1) Đối chứng: Cát vô trùng nhiễm dầu thô nhân tạo được bổ sung nước khử ion vô trùng để duy trì hàm lượng nước 20% wt, các hộp đối chứng không bổ sung nấm men và chất dinh dưỡng N, P.

(2) Thí nghiệm theo phương thức thúc đẩy sinh học (Bioaugmentation): Cát vô trùng nhiễm dầu thô nhân tạo được bổ sung tập hợp 3 chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) với tỷ lệ (1:1:1) sao cho mật độ ban đầu (0)  $\approx 10^7$  MPN/g cát. Phương thức thúc đẩy sinh học chỉ bổ sung nấm men, không bổ sung chất dinh dưỡng N, P. Nước khử ion vô trùng cũng được bổ sung vào cát để hàm lượng nước đạt 20% wt.

(3) Thí nghiệm theo phương thức kết hợp thúc đẩy (Bioaugmentation-BA) và kích thích sinh học (Biostimulation-BS): Cát vô trùng nhiễm dầu thô nhân tạo được bổ sung tập hợp chủng nấm men phân hủy dầu (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) dưới dạng chế phẩm với tỷ lệ DSNM1, VTNM1, và NTNM16 là 1:1:1 sao cho mật độ tập hợp chủng nấm men ban đầu trong mẫu cát (0)  $\approx 10^7$  MPN/g cát. Phương thức kết hợp thúc đẩy và kích thích sinh học bổ sung tập hợp chủng nấm men và nguồn chất dinh dưỡng gồm N và P, trong đó N được bổ sung với các hàm lượng khác nhau (500, 1000 và 1500 mg/kg, P bổ sung với hàm lượng không đổi là 100 mg/kg cát khô, tương đương với các tỷ lệ cacbon (C): N: P (C:N:P) là 100:5:1; 100:10:1 và 100:15:1. Nước khử ion vô trùng được thêm vào cát để duy trì hàm lượng nước đạt 20% wt.

Nitơ được bổ sung dưới dạng  $\text{NH}_4\text{Cl}$  và  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , P được bổ sung dưới dạng  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Chất dinh dưỡng N và P được bổ sung một lần duy nhất khi bắt đầu thí nghiệm (hàm lượng N là 0 mg/kg cát khô chính là thí nghiệm theo phương thức thúc đẩy sinh học).

Đối với mỗi phương thức xử lý, các thí nghiệm được tiến hành trong các hộp nhựa. Các thí nghiệm đều được lặp lại 02 lần. Mỗi hộp nhựa chứa 500 g cát và 100 g nước khử ion vô trùng (để hàm lượng nước đạt 20% wt). Các hộp nhựa được nuôi cấy tĩnh trong 10 tuần ở nhiệt độ phòng. Độ ẩm của cát được theo dõi định kỳ bằng máy đo độ ẩm và nước trong các hộp được cung cấp định kỳ để giữ hàm lượng nước ổn định. Cát bên trong các hộp thí nghiệm được đảo trộn 2 lần/tuần để đảm bảo cung cấp đầy đủ không khí và O<sub>2</sub>. Các mẫu cát được lấy lần lượt ở các thời điểm 0, 2, 4, 6, và 8 tuần thí nghiệm. Mẫu cát được bảo quản ở 4°C để phân tích vi sinh và -20°C để phân tích hàm lượng dầu thô.

**Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men tiềm năng bằng phương pháp MPN (most probable number)**

Khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) được đánh giá qua số lượng nấm men thu được từ các mẫu cát ô nhiễm dầu sau 0, 2, 4, 6, và 8 tuần nuôi cấy (Man, 1983): 2 g cát được đồng nhất trong 18 mL dung dịch muối sinh lý (0,85%, w/v) vô trùng trên máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút, với thời gian 1 giờ. Dịch cát sau khi đồng nhất được pha loãng hệ số bậc 10 tùy theo mật độ của nấm men có trong mẫu phân tích. Sau đó, 0,5 mL dịch cát ở các nồng độ pha loãng sau khi đồng nhất được cấy chuyển vào các ống nuôi cấy đầy nắp kín (12 mL) chứa 4,5 mL môi trường khoáng. 45 µL dầu thô được bổ sung vào mỗi ống môi trường nuôi cấy như nguồn cacbon duy nhất. Các mẫu cấy phân hủy dầu thô được nuôi lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 2 tuần. Sau đó, sử dụng INT (iodonitrotozolium violet) để xác định các mẫu dương tính. Sau 2 tuần nuôi cấy, INT được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy. Nếu xuất hiện màu đỏ khi bổ sung INT thì ống nuôi cấy dương tính, không màu là âm tính. Xác định mật độ nấm men phân hủy dầu bằng phương pháp MPN thích hợp và được biểu thị bằng log<sub>10</sub> MPN/g cát khô.

**Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men thông qua xác định hàm lượng dầu thô tổng số**

Hiệu quả phân hủy dầu của tập hợp chủng nấm men nghiên cứu được đánh giá thông qua phương pháp xác định dầu thô tổng số từ các mẫu cát ô nhiễm dầu sau 0 và 8 tuần thí nghiệm.

❖ **Phương pháp xác định dầu thô tổng số (TPH)**

Hàm lượng dầu thô tổng số được xác định bằng phương pháp cân khối lượng bao gồm các bước sau: (1) Dầu trong cát ô nhiễm được chiết bằng dung môi dichloromethane cho đến khi dung môi chiết không màu; (2) Dầu chiết được lọc hết cát và làm bay hơi hết dung môi bằng máy cô quay chân không (Buchí, Thụy Sĩ) cho tới khi khối lượng không đổi; (3) Hàm lượng dầu tổng số còn lại được cân để xác định khối lượng.

❖ Hàm lượng C, N, P, K trong mẫu cát tự nhiên được phân tích theo TCVN 11069-1:2015 (≈ISO/TS 14256-1:2003).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Ảnh hưởng của các nguồn N khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của tập hợp chủng nấm men trên nguồn cơ chất dầu thô**

Kết quả phân tích hàm lượng C, N, P trong cát sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 2. Kết quả cho thấy hàm lượng N, P thấp vì vậy cần thiết bổ sung N và P vô cơ để nâng cao khả năng phân hủy của chủng nấm men nghiên cứu. Để tìm nguồn N thích hợp, từng chủng nấm men được nuôi lắc trên môi trường khoáng bổ sung các nguồn N khác nhau (0,3% (w/v): KNO<sub>3</sub>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; NaNO<sub>3</sub>; NH<sub>4</sub>Cl; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Các điều kiện nuôi cấy kèm theo: 2% (w/v) NaCl, 2% (v/v) giống, pH 6 và 30°C, hàm lượng dầu thô bổ sung vào môi trường khoáng nuôi cấy 3 chủng nấm men DSNM1, VTNM1 và NTNM6 lần lượt là 3%, 3% và 2% (w/v). Kết quả cho thấy, 3 chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) có khả năng tổng hợp CHĐBMSH cao và ổn định nhất trên nguồn N là NH<sub>4</sub>Cl và (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Bảng 1). Do đó, NH<sub>4</sub>Cl và (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> được lựa chọn là nguồn N cho nghiên cứu này.

**Bảng 1. CHĐBMSH được tổng hợp bởi 3 chủng nấm men được xác định bằng chỉ số nhũ hóa E<sub>24</sub> (%)**

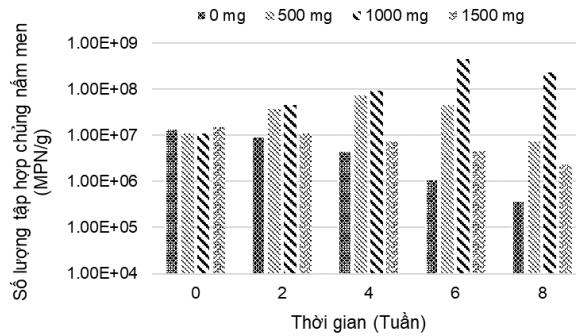
Chủng nấm men	Nguồn N					
	KNO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
DS-NM1	0,0	<b>64,0</b>	63,0	14,0	58,5	50,0
NTNM16	8,0	51,4	53,2	30,0	<b>61,2</b>	52,0
VTNM1	45,0	37,0	39,0	27,0	<b>63,4</b>	42,0

**Bảng 2. Hàm lượng chất dinh dưỡng (C, N, P, K) trong cát tự nhiên sử dụng cho thí nghiệm**

STT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả phân tích
1	TOC	%	0,058
2	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg/kg	79,9
3	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/kg	10,02
4	K <sub>2</sub> O	mg/kg	61,25
5	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	mg/kg	16,36

**Ảnh hưởng của hàm lượng N đến khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men nghiên cứu**

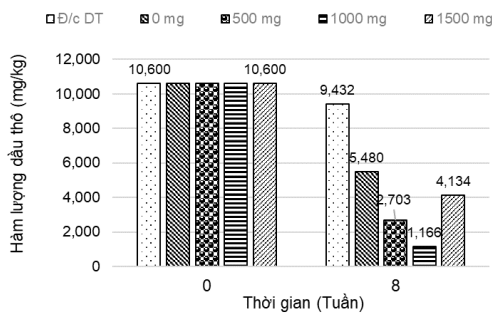
Số lượng chủng nấm men phân hủy dầu trong cát ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 0, 2, 4, 6, và 8 và tuần thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp MPN (Hình 1).



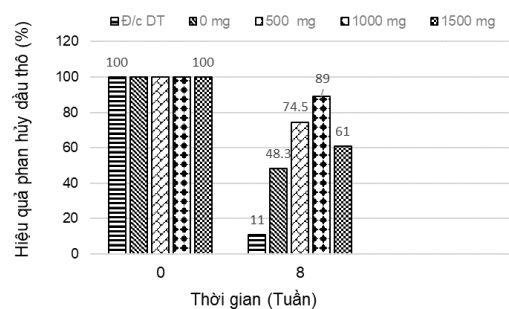
**Hình 1. Sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men trong mô hình xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) với hàm lượng N khác nhau**

Kết quả (Hình 1) cho thấy, tập hợp chủng nấm men sinh trưởng và phát triển tốt trong cát ô nhiễm dầu thô có bổ sung hàm lượng N là 500-1000 mg/kg. Số lượng nấm men trong cát bổ sung 500 và 1000 mg N/kg ở thời điểm ban đầu (0) là 1,1×10<sup>7</sup> MPN/g. Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, số lượng nấm men dao động từ 7,5 × 10<sup>6</sup> - 7,5 × 10<sup>7</sup> MPN/g trong cát bổ sung 500 mg N/kg và 4,6×10<sup>7</sup> - 4,6×10<sup>8</sup> (MPN/g) trong cát bổ sung 1000 mg N/kg. Tập hợp chủng nấm men đạt số lượng cao nhất từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 6 trong cát ô nhiễm dầu có bổ sung hàm lượng N là 1000 mg/kg. Số lượng nấm men ở hai nghiệm thức không bổ sung N và bổ sung N với hàm lượng là 1500 mg/kg đều giảm theo thời gian từ 1,1×10<sup>7</sup> MPN/g ở thời điểm ban đầu (0) xuống chỉ còn lần lượt là 3,8 × 10<sup>5</sup> MPN/g (0 mg/kg) và 2,3×10<sup>6</sup> MPN/g (1500 mg/kg) sau 8 tuần thử nghiệm. Kết quả này cho thấy vai trò của N trong quá trình phân hủy cát ô nhiễm dầu bằng phương pháp Bioremediation. Tuy nhiên, hàm lượng N phù hợp với tập hợp chủng nấm men trong nghiên cứu này từ 500 đến 1000 mg/kg. Nếu thấp dưới 500 mg N/kg số lượng nấm men sẽ suy giảm do thiếu chất dinh dưỡng. Còn lớn hơn 1000 mgN/kg, nấm men có thể bị ức chế do hàm lượng N dư thừa.

**Khả năng phân hủy hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) của tập hợp chủng nấm men trong cát bổ sung N với hàm lượng khác nhau**



**Hình 2. Hàm lượng dầu thô tổng số trong thí nghiệm với các hàm lượng N khác nhau sau 8 tuần**



**Hình 3. Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men sau 8 tuần**

Kết quả (Hình 2 và 3) cho thấy, sau 8 tuần thí nghiệm, hàm lượng dầu thô tổng số (TPH-total petroleum hydrocarbons) giảm từ 10.600 mg/kg cát xuống còn 9432, 5480, 2703, 1166 và 4134 mg/kg lần lượt với thí nghiệm đối chứng (không bổ sung N) và bổ sung N với hàm lượng lần lượt là 0, 500, 1000 và 1500 mg N/kg cát. Hiệu quả phân hủy dầu tương ứng là 11; 48,3; 74,5; 89; 61%. Cả hai phương thức thúc đẩy sinh học (BA) (chỉ bổ sung tập hợp chủng nấm men không bổ sung N) và kết hợp thúc đẩy và kích thích sinh học (BA + BS) (bổ sung tập hợp chủng nấm men và N với hàm lượng khác nhau) đều có khả năng phân hủy TPH sinh học so với nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên, kết hợp BA+BS cho hiệu quả cao hơn. Điều này một lần nữa khẳng định việc bổ sung chất dinh dưỡng (N, P) là phương pháp hiệu quả giúp tăng cường khả năng phân hủy dầu của vi sinh vật nói chung và nấm men nói riêng. Trong nghiên cứu này, hàm lượng N phù hợp cho quá trình phân hủy sinh học Bioremediation của tập hợp chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) là 500 - 1000 mg N/kg cát tương đương với tỷ lệ C:N:P là 100:5:1 và 100:10:1. Điều này phù hợp với các nghiên cứu của cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (US, EPA, 2002) thông báo rằng tỷ lệ C:N:P thích hợp để xử lý đất, cát/trầm tích ô nhiễm dầu là 100:10:1, tỷ lệ này giúp quần thể VSV phân hủy dầu hoạt động tối ưu. Cát nhiễm dầu được xử lý bằng phương pháp kết hợp BA+BS cho thấy, số lượng nấm men cao hơn so với cát không được xử lý (mẫu đối chứng) hoặc cát được xử lý bằng phương pháp BA (Hình 1). Điều này cũng được minh chứng bằng hiệu quả phân hủy dầu. Nguyên nhân là do khi tỷ lệ C: N: P được cung cấp phù hợp dẫn tới kích thích sự sinh trưởng và phát triển khả năng phân hủy dầu của các chủng vi sinh vật (Atlas and Bragg, 2009). Hiệu quả phân hủy TPH của chủng tập hợp chủng nấm men lần lượt đạt 48,3% (BA); 74,5% (BA+BS; 500 mg N/kg); 89% (BA+BS; 1000 mg N/kg) và 61% (BA+BS; 1500 mg N/kg). Phương thức phân hủy BA (chỉ bổ sung vi sinh vật) được cho là hữu ích cho việc thúc đẩy sự phân hủy ở giai đoạn đầu của quá trình xử lý đặc biệt là ở các khu vực mới ô nhiễm, khi VSV phân hủy dầu có mật độ thấp hoặc không có VSV phân hủy dầu do chưa thích nghi được với môi trường ô nhiễm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, sự kết hợp giữa hai phương thức BA và BS đem lại hiệu quả xử lý dầu tốt nhất (Suja *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, sau 8 tuần thí nghiệm, số lượng của tập hợp chủng nấm men giảm (Hình 1), nguyên nhân có thể là do cạn kiệt nguồn dinh dưỡng, do đặc tính của đất, cát/trầm tích ô nhiễm.

## KẾT LUẬN

Tập hợp 3 chủng nấm men DSNM1, VTNM1, NTNM16 sinh trưởng và phân hủy dầu tốt với hàm lượng N là 500 - 1000 mg/kg, tốt nhất là 1000 mg/kg. Số lượng nấm men trong cát bổ sung 500 và 1000 mg N/kg ở thời điểm ban đầu (0) là  $1,1 \times 10^7$  MPN/g. Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, số lượng nấm men dao động từ  $7,5 \times 10^6 - 7,5 \times 10^7$  MPN/g trong cát bổ sung 500 mg N/kg và  $4,6 \times 10^7 - 4,6 \times 10^8$  (MPN/g) trong cát bổ sung 1000 mg N/kg. Với các thí nghiệm không bổ sung N hoặc bổ sung 1500 mg N/kg, số lượng nấm men giảm dần theo thời gian là  $3,8 \times 10^5$  MPN/g (BA; 0 mgN/kg) và  $2,3 \times 10^6$  MPN/g (1500 mg N/kg) sau 8 tuần. Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men là 11; 48,3; 74,5; 89; 61% tương ứng lần lượt với mẫu cát đối chứng, cát bổ sung N với hàm lượng lần lượt là 0, 500, 1000 và 1500 mg N/kg.

**Lời cảm ơn:** Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được cung cấp bởi nhiệm vụ Thủ tướng giao cho Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số CP 1862.02/20-22.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Atlas R and Bragg J (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not-the Exxon Valdez experience. *Microb Biotechnol*, 2 (2): 213-221.
- Cooper DG, Cavalero DA (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC22214. *J Biotechnol*, 103: 31-41.
- Edward G, Pattanathu K, S, M, Rahman Mohamed H (2007) Microbial Biosurfactants: Review. *J Mar Atmos Res*, 3 (2): 1-17.
- Hamzah A, Manikan V, Abd Aziz N.A.F (2017). Biodegradation of Tapis Crude Oil Using Consortium of Bacteria and Fungi: Optimization of Crude Oil Concentration and Duration of Incubation by Response Surface Methodology. *Sains Malaysiana*, 46(1):43-50.
- Lại Thúy Hiền (2011) *Giáo trình vi sinh vật dầu mỏ*. Nhà xuất bản Tự nhiên và Công nghệ, tr 99-100.
- Latha R, Kalaivani R (2012). Bacterial Degradation of Crude Oil by Gravimetric Analysis. *Adv Appl SciRes*, 3 (5): 2789-2795.
- Lim MW, Lau EV, Poh PE (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil - Present works and future directions. *Mar pollut bull*, 109 (1):14-45.
- Man D.J.C (1983). MPN tables, corrected. *Eur J ApplMicrobiolBiotechnol*, 17: 301-305.
- Njoku K.L, Akinola M.O, Obob B.O (2012). Phytoremediation of crude oil polluted soil: effect of cow dung augmentation on the remediation of crude oil polluted soil by glycine max. *Res J of Appl Sci*, 8 (1): 277-282.
- Okolo JC, Amadi EN, Odu CTI (2005). Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil. *Appl Ecol and Environ Research*, 3 (1): 47-53.
- Sawadogo A, Otoiobiga HC, Nitiema LW (2016). Optimization of Hydrocarbons Biodegradation by Bacterial Strains Isolated from Wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso: Case Study of SAE 40/50 Used Oils and Diesel. *J AgricCheand Environ*, 5: 1-11.
- Suja F, Rahim, F, Taha MR, Hambani N (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations, *Int Biodeterior and Biodegradation*, 90: 115-122.

## EFFECT OF NITROGEN ADDITION ON BIOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBON CONTAMINATED SOIL/SAND BY A YEAST CONSORTIUM

Nguyen Thi Diem Quynh<sup>1</sup>, Nguyen Thi Yen<sup>1</sup>, Nguyen Minh Phuong<sup>3</sup>,  
Tran Hường Ly<sup>1</sup>, Dinh Van Tai<sup>1</sup>, Kieu Thi Quynh Hoa<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

<sup>3</sup>*Faculty of Environmental Sciences, University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

### SUMMARY

Bioremediation of oil-contaminated sand/soil is dependent upon several factors that commonly affect biodegradation processes, such as content of N, P, oxygen and moisture, temperature... A characteristic of oil-contaminated sand/soil is its high concentration in carbon compared to the concentration of N and P. Nitrogen is particularly expected to affect degradation rates and extents, since soils commonly lose nitrogen due to nitrogen leaching and/or due to denitrification processes. Therefore, N and P is usually, the limiting nutrient in soil/sand and the addition of these nutrients in soil/sand bioremediation are necessary to stimulate oil biodegradation. The effect of nitrogen concentrations on the bioremediation of crude oil-contaminated sand by a yeast consortium was investigated in this study. The yeast consortium of three strains (DSNM1, VTNM1, and NTN6) that were isolated from oil-contaminated marine sites. The high ability of crude oil degradation and biosurfactant production by these three strains was determined with suitable nitrogen sources ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). The effect of different nitrogen concentrations on growth and crude oil-degrading efficiency of the yeast consortium was evaluated in this study. Results showed bioaugmentation (0 mg N/kg) and biostimulation (500, 1000, and 1500 mg N/kg), respectively promoted 48.3; 74.5; 89 and 61%. However, the number of yeast consortium of all experiments decreased after 8 weeks. Therefore, in order to maintain a stable oil degradation efficiency, it is necessary to periodically add N with appropriate concentration during the bioremediation process. The results confirm the crude oil degradation potential of the yeast consortium as well as the effect of nitrogen additions in simulating the growth of three yeast strain, thereby improving the oil biodegradation efficiency.

*Keywords:* Bioremediation, crude oil, nitrogen addition (N), oil-contaminated soil/sand, yeast.

---

\* Author for correspondence: Tel: 02437562000; Email: kieuithiquynhhoa@gmail.com/ktquynhhoa@ibt.ac.vn

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PVA-GEL TỔNG HỢP TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN THỦY SẢN

Phan Thế Anh, Nguyễn Thị Đông Phương, Nguyễn Hoàng Trung Hiếu\*

Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

## TÓM TẮT

Nước thải chế biến thủy sản các là hệ nước thải đặc trưng với hàm lượng chất hữu cơ và chất dinh dưỡng cao có khả năng phân hủy sinh học. Hiện nay, công nghệ sinh hóa hiếu khí bùn hoạt tính (aerotank) đang được nhiều đơn vị chế biến thủy sản áp dụng rộng rãi tại Việt Nam. Để tăng hiệu quả xử lý cho bể aerotank, các giá thể thường được sử dụng bổ sung vào bể aerotank nhằm gia tăng hàm lượng sinh khối. Trong các loại giá thể thì PVA gel được đánh giá cao trong xử lý nước thải vì có khả năng tương thích sinh học cao, có diện tích bề mặt riêng lớn nên có khả năng mang vi sinh vật giúp tăng hiệu quả xử lý nước thải. Trong nghiên cứu này, hiệu quả xử lý nước thải của vật liệu PVA gel tổng hợp (S-PVA gel) đã được đánh giá qua quá trình sinh hóa hiếu khí bùn hoạt tính thực hiện theo nguyên tắc SBR (Sequencing Bath Reactor) với sự thay đổi tăng dần nồng độ chất hữu cơ đầu vào. Vật liệu PVA gel thương mại (C-PVA gel) của hãng Kuraray, Nhật Bản cũng được sử dụng để làm vật liệu đối chứng. Khi sử dụng 20% thể tích vật liệu chỉ làm tăng thể tích chiếm dụng trong bể phản ứng lên 7 – 9% nhưng có thể tăng hiệu suất xử lý COD lên 7 – 20%, tăng hiệu suất xử lý BOD<sub>5</sub> lên 3-11%, tăng hiệu suất xử lý chất dinh dưỡng (N-T và P-T) lên 5-23% và tăng tải nạp hữu cơ lên 1,65 ÷ 1,76 lần. Với cùng hiệu suất xử lý COD đạt khoảng 85-87%, tải trọng hữu cơ đầu vào có thể đạt 3,48 kgBOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>/ngày (tương ứng 5,48 kgCOD/m<sup>3</sup>/ngày) khi sử dụng vật liệu S-PVA gel, giá trị này xấp xỉ với giá trị 3,73 kgBO<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>/ngày (tương ứng 5,87 kgCOD/m<sup>3</sup>/ngày) khi sử dụng vật liệu C-PVA gel của Nhật. Kết quả nghiên cứu mở ra tiềm năng ứng dụng rộng rãi của loại vật liệu PVA gel tại Việt Nam.

*Từ khóa:* Aerotank, bùn hoạt tính, nước thải chế biến thủy sản, PVA gel, Sequencing Bath Reactor (SBR), xử lý nước thải.

## MỞ ĐẦU

Ngành thủy sản đã phát triển mạnh mẽ trong những thập kỷ gần đây nhằm đáp ứng nhu cầu tiêu thụ ngày càng tăng, đặc biệt là hải sản. Ở Việt Nam, lĩnh vực chế biến thủy sản (CBTS) là một lĩnh vực kinh tế quan trọng với nhiều mặt hàng đã được xuất khẩu sang nhiều quốc gia và vùng lãnh thổ khác nhau, trong đó có Hoa Kỳ, Hàn Quốc, Liên minh châu Âu...(Tseng *et al.*, 2022). Việc mở rộng sản xuất trong lĩnh vực CBTS góp phần phát triển nền kinh tế Việt Nam bằng cách tăng lực lượng lao động, tuy nhiên cũng gây áp lực lên hệ thống xử lý tại các công ty. Nước thải từ quá trình CBTS là một hệ nước thải đặc trưng với hàm lượng chất hữu cơ và chất dinh dưỡng cao có khả năng phân hủy sinh học. Những chất này nếu không được xử lý triệt để sẽ gây ra hiện tượng tảo nở hoa có hại và phá hủy hệ sinh thái thủy sinh tự nhiên (Ngoc *et al.*, 2022).

Tại Việt Nam công nghệ sinh hóa hiếu khí bùn hoạt tính (aerotank) đang được các công ty CBTS áp dụng rộng rãi. Trong công nghệ này hệ vi sinh vật tồn tại trong bùn hoạt tính là nhân tố đóng vai trò quyết định. Thông thường để xử lý nước thải đầu vào có nồng độ chất hữu cơ cao cần phải tăng kích thước của hệ thống xử lý. Ngoài ra, một số nhà máy chọn giải pháp là tăng hàm lượng bùn để có được mật độ vi sinh vật cao phục vụ cho quá trình phân giải chất hữu cơ. Tuy nhiên, việc làm này sẽ gây ảnh hưởng đến khả năng lắng bùn của bể lắng thứ cấp làm giảm chất lượng nước đầu ra, không đảm bảo quy chuẩn cho phép. Bên cạnh đó, việc tăng hàm lượng bùn có thể dẫn đến hiện tượng tắc nghẽn hệ thống phân phối khí, ảnh hưởng đến quá trình xử lý. Để tăng hiệu quả xử lý cho bể aerotank, hạn chế mở rộng khu vực xử lý khi quỹ đất không còn, người ta thường sử dụng các giá thể bổ sung vào bể aerotank nhằm gia tăng hàm lượng sinh khối. Trong số các vật liệu làm giá thể, PVA gel được đánh giá là có hiệu quả vượt trội bởi loại giá thể này có những tính năng ưu việt sau: (1) PVA là loại nhựa có khả năng tương thích sinh học cao nên thuận lợi cho quá trình phát triển bám dính của vi sinh vật, (2) giá thể PVA-gel có cấu trúc mao quản liên thông nên sở hữu một diện tích bề mặt riêng hiệu dụng lớn khoảng 2500 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> (Levstek & Rouse, 2010) làm tăng mật độ vi khuẩn cố định trên bề mặt đó. Cấu trúc liên thông còn tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình khuếch tán hay vận chuyển oxy cũng như các chất hữu cơ cần phân hủy đến vị trí tập trung vi sinh vật bên trong cấu trúc vật liệu, (3) nhựa PVA có khả năng phân hủy sinh học khi được chôn trong môi trường đất nên được đánh giá là loại nhựa thân thiện với môi trường, (4) giá thể PVA-gel có khối lượng riêng ( $d = 1,025 \text{ g/cm}^3$ ) gần bằng nước nên thuận lợi cho quá trình đối lưu, (5) đường kính của các lỗ xốp mao quản dao động trong khoảng 4-20  $\mu\text{m}$  nên cho phép các vi sinh vật (có kích thước 0,3 - 5  $\mu\text{m}$ ) chui vào bên trong cấu trúc để phát triển (Lương Đức Phẩm, 2002).

Trong nghiên cứu này, hiệu quả xử lý nước thải của vật liệu PVA gel tổng hợp (S-PVA gel) đã được đánh giá qua quá trình sinh hóa hiếu khí bùn hoạt tính thực hiện theo nguyên tắc SBR (Sequencing Bath Reactor) với sự thay



đổi tăng dần nồng độ chất hữu cơ đầu vào. Vật liệu PVA gel thương mại (C-PVA gel) của hãng Kuraray, Nhật Bản cũng được sử dụng để làm vật liệu đối chứng. Kết quả cho thấy vật liệu S-PVA gel có hiệu quả hỗ trợ cho quá trình sinh hóa hiếu khí bùn hoạt tính, đặc biệt là ở nồng độ chất hữu cơ đầu vào cao.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Hóa chất

Nguyên liệu PVA 217 dùng để tổng hợp vật liệu PVA gel được mua từ hãng Kuraray (Nhật Bản) có các thông số như sau: độ trùng hợp trung bình (DP) 1725, độ thủy phân 87-89%, hàm lượng tro khoảng 0,4%, hàm lượng sodium acetate khoảng 1,04%. NaOH và HNO<sub>3</sub> dùng để biến tính PVA được mua từ hãng Xilong (Trung Quốc).

### Tổng hợp vật liệu S-PVA gel

Vật liệu S-PVA gel được tổng hợp theo phương pháp lạnh đông – rã đông với các điều kiện đã được mô tả cụ thể trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Anh & Lâm, 2020).

### Đánh giá hiệu quả xử lý nước thải của vật liệu S-PVA gel

#### Vật liệu làm giá thể

Vật liệu S-PVA gel tổng hợp được cấu thành các hạt hình khối có kích thước 2x2x2 mm và được sử dụng như là giá thể cho mô hình xử lý nước thải theo mẻ (SBR). Vật liệu PVA gel thương mại (C-PVA gel) của hãng Kuraray (Nhật Bản) được sử dụng làm vật liệu đối chứng. Các thông số kỹ thuật của 2 loại vật liệu này được tổng hợp trong Bảng 1.

**Bảng 1. Thông số kỹ thuật của vật liệu làm giá thể**

Thông số	Đơn vị	S-PVA gel	C-PVA gel
Hàm lượng rắn	%	10	10
Kích thước hạt	mm	2	4
Đường kính lỗ xốp	µm	4-20	4-20
Khối lượng riêng	g/cm <sup>3</sup>	1.021	1.025
Số hạt trong 100 mL gel	hạt	1982	2000
Diện tích bề mặt riêng bao quanh	m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>	480	1000

### Nguồn nước thải chế biến thủy sản

Nước thải sử dụng cho quá trình nghiên cứu được lấy từ bể điều hòa của hệ thống xử lý nước thải Công ty TNHH Đồ hộp Hạ Long – Đà Nẵng. Nước thải lấy về được để lắng 2 giờ rồi gạn lấy phần nước trong, pha loãng để đạt được giá trị COD đầu vào mong muốn và sử dụng trực tiếp mà không cần bổ sung thêm bất kỳ thành phần nào.

### Mô hình xử lý nước thải

Quá trình thử nghiệm hiệu quả xử lý nước thải của vật liệu S-PVA gel được tiến hành trong phòng thí nghiệm với hệ thống mô phỏng lại quá trình sinh học hiếu khí bùn hoạt tính theo nguyên tắc SBR gián đoạn (Phụ lục S1). Thí nghiệm được thực hiện trên 3 bình phản ứng có dung tích chứa 8 lít: 1 bình không chứa vật liệu, 1 bình có chứa vật liệu S-PVA gel và 1 bình chứa C-PVA gel. Thời gian khảo sát liên tục trong 12 giờ ở các mốc 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 10 giờ và 12 giờ. Khí được cung cấp liên tục để duy trì nồng độ oxy hòa tan dao động 3 – 4 mg/L. Bùn hoạt tính được lấy từ bể aerotank của Công ty TNHH Đồ hộp Hạ Long. Nồng độ bùn duy trì trong 3 bình phản ứng ở mức 2500 mg/L (Thủy & Quang, 2020). Lượng vật liệu sử dụng bằng 20% thể tích nước xử lý.

### Các thí nghiệm đánh giá

Các thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý nước thải được thực hiện trong điều kiện không kiểm soát các yếu tố môi trường trên mô hình thực nghiệm đã trình bày. Vật liệu làm giá thể trước khi đem đánh giá hiệu quả xử lý nước thải cần trải qua giai đoạn thích nghi tạo màng sinh học. Cách tiến hành giai đoạn thích nghi như sau: dùng ống đong có dung tích 1 lít để đong 1 lít vật liệu đệm (S-PVA gel và C-PVA gel) rồi cho vào bình phản ứng. Thêm vào đó 5 lít nước thải có nồng độ COD khoảng 500 mg/L và bùn hoạt tính. Tiến hành sục khí và theo dõi giá trị COD đầu vào và COD đầu ra đo sau 12 giờ phản ứng. Thời gian của giai đoạn thích nghi tạo màng sinh học là 15 ngày.

Sau thời gian 15 ngày tạo màng sinh học, vật liệu giá thể được tiến hành đánh giá hiệu quả trong điều kiện thay đổi nồng độ COD đầu vào của nước thải theo hướng tăng dần ở các mức 656, 992, 1286 và 1660 mg/L tương ứng với mức tải hữu cơ tính toán là: 0,5, 0,75, 1 và 1,25 g BOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày (với tỷ lệ BOD/COD = 0,636, thời gian lưu nước (HRT) = 8 giờ và hàm lượng chất rắn lơ lửng (MLSS) = 2500 mg/L) (Ghangrekar & Behera, 2014). Mỗi mức tải được tiến hành 3 mẻ để có giá trị trung bình. Các thông số pH, COD và TSS được đánh giá ở các

thời điểm 1, 2, 4, 6, 8, 10 và 12 giờ. Các thông số BOD<sub>5</sub>, NH<sub>4</sub>, Nitơ tổng (N-T) và Phốt pho tổng (P-T) được đánh giá ở thời điểm đầu và sau 12 giờ phản ứng.

**Các phương pháp phân tích chỉ tiêu nước thải**

Các chỉ tiêu nước thải pH, DO được các định bằng các thiết bị đo nhanh; các giá trị TSS, BOD<sub>5</sub>, COD, N-NH<sub>4</sub>, nitơ tổng (N-T) và phốt pho tổng (P-T) được lấy mẫu theo giờ và đo theo các phương pháp tiêu chuẩn của Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN) như Phụ lục S2.

Chất rắn lơ lửng trộn lẫn chất lỏng (MLSS) hay là bùn được xác định theo phương pháp trọng lượng (lọc bằng giấy lọc có kích thước 0,45 µm rồi sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 105°C.

Đối với chỉ số thể tích bùn (SVI) xác định theo công thức:  $SVI = \frac{V \times 1000}{MLSS}$  (mL/g)

Trong đó: MLSS: là chất rắn lơ lửng trộn lẫn chất lỏng (g/L)

V: là thể tích bùn lắng trong 30 phút trong ống đong 1000mL (mL/L)

**Xử lý số liệu**

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, các phép đo được thể hiện bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn được tính toán từ ít nhất 3 mẫu lặp lại (n≥3). Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm định bằng Student's t-test với ngưỡng khác biệt có ý nghĩa được xác định khi p < 0,05 và thể hiện bằng dấu hoa thị (\*) trên các hình.

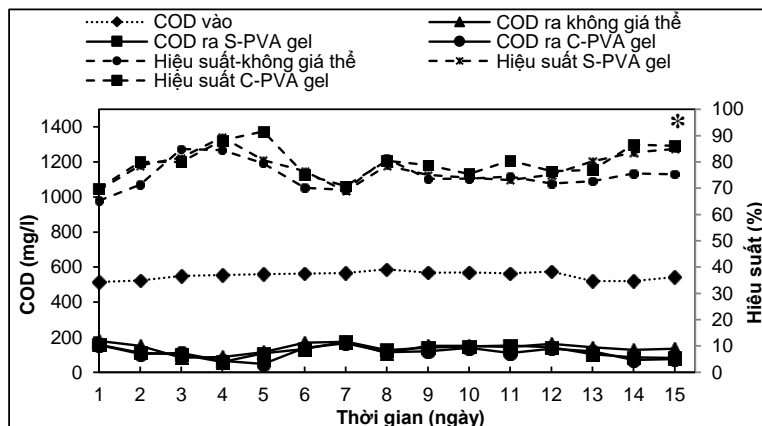
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Chất lượng của nước thải đầu vào**

Về cảm quan, nước thải lấy từ bể điều hòa của Công ty TNHH Đồ hộp Hạ Long có mùi tanh, màu đỏ của máu cá, hàm lượng cặn lơ lửng rất cao và có nồng độ dao động trong khoảng rộng. Nồng độ TSS của nước thải lấy về có giá trị 1125 ± 10,55 mg/L, cao hơn mức phù hợp để đưa vào hệ thống xử lý sinh học là < 125 mg/L theo đề xuất của Eckenfelder và đồng tác giả (2009). Do đó, cần được để lắng 2 giờ rồi gạn lấy phần nước trong trước khi đưa vào mô hình thí nghiệm. Phần nước thải sau khi gạn được đánh giá thường xuyên trong suốt giai đoạn thí nghiệm (Phụ lục S3). Nước thải chế biến cá đóng hộp của Công ty TNHH Đồ hộp Hạ Long có những đặc điểm sau: mức ô nhiễm cao và không ổn định trong từng ngày; pH dao động trong khoảng 7,16 đến 7,86 (n=10) thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật nên không cần phải điều chỉnh pH của nước thải đầu vào; tỷ lệ BOD<sub>5</sub>/COD khoảng 0,636 và tỷ lệ BOD<sub>5</sub> : N : P = 100 : 39,2 : 3,1 là thích hợp cho quá trình xử lý sinh học, không cần bổ sung thêm dưỡng chất (Việt & Ngân, 2014).

**Diễn biến nồng độ COD trong giai đoạn tạo màng sinh học**

Các nghiên cứu trước đây trên các giá thể khác nhau cho thấy thời gian để tạo màng sinh học trên vật liệu giá thể cần phải kéo dài ít nhất 7-30 ngày (Hoa et al. , 2017). Mục đích của giai đoạn này là để tạo một môi trường sống và phát triển ổn định của vi khuẩn trong mao quản của giá thể. Trong nghiên cứu này thời gian của giai đoạn thích nghi được kéo dài 15 ngày. Quá trình bám dính và tăng sinh của vi khuẩn trên vật liệu giá thể được đánh giá thông qua sự giảm nồng độ COD khi so sánh với mẫu đối chứng (bình không chứa vật liệu giá thể). Sự khác nhau về giá trị COD đầu vào, đầu ra và hiệu suất xử lý trong 3 bình phản ứng ở giai đoạn tạo màng sinh học được thể hiện trên Hình 1.



Hình 1. Diễn biến nồng độ COD trong giai đoạn tạo màng sinh học

Trong giai đoạn chạy thích nghi tạo màng sinh học, sự khác biệt giá trị COD đầu ra ở 3 bình phản ứng là không thực sự rõ ràng ở 8 ngày đầu tiên. Tuy nhiên, đến ngày thứ 9 trở đi đã có sự ổn định về chênh lệch giá trị COD ở bình không chứa vật liệu và 2 bình có chứa vật liệu PVA gel. 2 bình phản ứng chứa PVA gel luôn có giá trị COD đầu ra nhỏ hơn bình không chứa vật liệu. Hiệu suất xử lý của 2 bình chứa PVA gel (S-PVA và C-PVA) cao hơn bình không chứa PVA khoảng 6-10% trong những ngày cuối của giai đoạn thích nghi và số liệu so sánh thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) vào ngày thứ 15. Tuy nhiên, so sánh giữa 2 bình có chứa PVA thì không cho thấy sự khác biệt. Khoảng chênh lệch này là chưa thực sự lớn, nguyên nhân có thể là do lượng chất hữu cơ đưa vào đã được vi khuẩn tiêu thụ gần như hoàn toàn sau 12 giờ phản ứng trong cả 3 bình. Tuy nhiên, đây cũng là tín hiệu cho thấy vi khuẩn đã bắt đầu bám dính vào vật liệu. Điều này được củng cố khi quan sát thấy hạt PVA gel đã chuyển từ màu trắng ban đầu sang màu vàng sẫm sau 15 ngày chạy thích nghi (Phụ lục S4). Hạt PVA gel cũng trở nên trơn và nhơn hơn so với ban đầu khi cảm quan bằng tay.

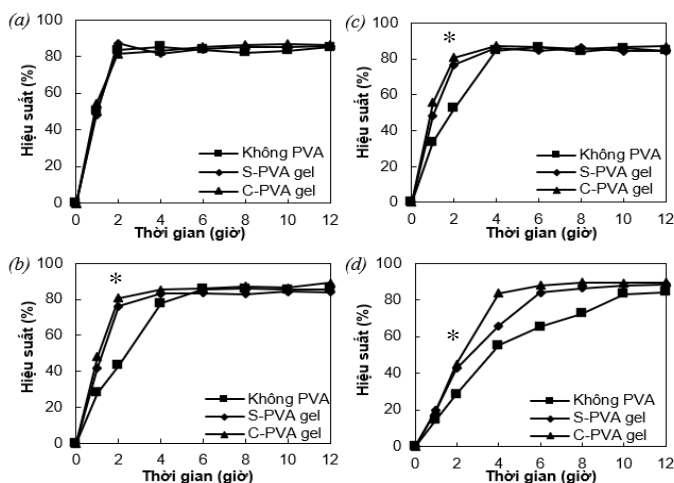
### Sự thay đổi chất lượng nước thải theo thời gian phản ứng

Trong nghiên cứu này chất lượng nước thải theo thời gian phản ứng chỉ được xác định thông qua 3 chỉ tiêu là pH, COD và TSS. Sự thay đổi chất lượng nước thải đầu ra theo thời gian phản ứng cho phép ta xác định được khoảng thời gian lưu nước thích hợp khi tải nạp hữu cơ thay đổi. pH của nước thải đầu vào dao động trong khoảng 7,16 - 7,86 và có xu hướng tăng dần trong 1 giờ đầu với mức tăng khoảng 0,5 đến 0,8 sau đó giảm dần ở cả 3 bể phản ứng. Sau 12 giờ, giá trị pH trong 3 bình phản ứng ở các mức tải hữu cơ khác nhau dao động từ 6,9 đến 8,1. Khoảng giá trị pH này là thích hợp cho hoạt động sống của vi sinh vật trong bể aerotank và phù hợp với QCVN 11-MT:2015/ BTNMT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước thải công nghiệp chế biến thủy sản (đáp ứng tiêu chuẩn cột B, pH = 5,5-9). Giá trị TSS sau 12 giờ phản ứng trong 3 bình: bình không chứa vật liệu, bình chứa S-PVA gel và bình chứa C-PVA gel dao động tương ứng trong các khoảng 31,9 – 38,1 mg/L, 23,1 – 31,2 mg/L và 22,8 – 29,3 mg/L. Mức thay đổi nồng độ COD theo thời gian ở các tải hữu cơ đầu vào khác nhau được biểu diễn qua hiệu suất xử lý và được thể hiện trong Hình 2.

Hiệu suất xử lý chất hữu cơ ở cả 3 bình có xu hướng chung là: tăng theo thời gian phản ứng, tăng nhanh trong 2 – 4 giờ đầu tiên và sau đó thay đổi rất ít đặc biệt khi ở mức tải đầu vào thấp. Sự tăng nhanh của hiệu suất xử lý trong 2 – 4 giờ đầu tương ứng với sự giảm nhanh của nồng độ COD, điều này được cho là có liên quan đến hiện tượng hấp phụ của bùn hoạt tính và vật liệu giá thể. Đáng lưu ý, tại mốc 2h, hiệu suất xử lý của 2 bình chứa PVA gel (S-PVA và C-PVA) cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với bình không chứa PVA ở các mức tải 0,75, 1 và 1,25 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày, trong khi mức 0,5 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày thì không cho thấy sự khác biệt.

Ở mức tải 0,5 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày, hiệu suất xử lý có thể đạt trên 80% chỉ sau 2 giờ phản ứng và không có sự chênh lệch đáng kể trong cả 3 bình (Hình 2a). Tuy nhiên khi ở mức tải đầu vào cao hơn, hiệu suất xử lý sau 2 giờ có sự chênh lệch đáng kể giữa bình có chứa vật liệu PVA gel và bình không chứa vật liệu, cụ thể: ở mức tải 0,75 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày, hiệu suất xử lý có thể đạt 77% với bình chứa vật liệu S-PVA gel và 81% với bình có chứa vật liệu C-PVA gel, trong khi đó bình không chứa vật liệu chỉ đạt hiệu suất 52%. Từ 4 – 12 giờ hiệu suất ở cả 3 bình là tương đương nhau (Hình 2b).

Ở mức tải lớn hơn 0,75 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày, sự chênh lệch hiệu suất giữa bình chứa vật liệu PVA gel và bình không chứa vật liệu vẫn dễ dàng nhận thấy trong toàn bộ thời gian khảo sát (Hình 2c-d). Sau 12 giờ phản ứng, bình chứa vật liệu có hiệu suất cao hơn bình không chứa vật liệu khoảng 4-6%, bình chứa vật liệu C-PVA gel cao hơn bình chứa vật liệu S-PVA gel khoảng 2%. Kết quả này không phản ánh được hiệu quả của vật liệu PVA gel bởi ở thời điểm 12 giờ lượng chất hữu cơ đưa vào ban đầu hầu như đã được tiêu thụ hết bởi các vi sinh vật trong cả 3 bình phản ứng.

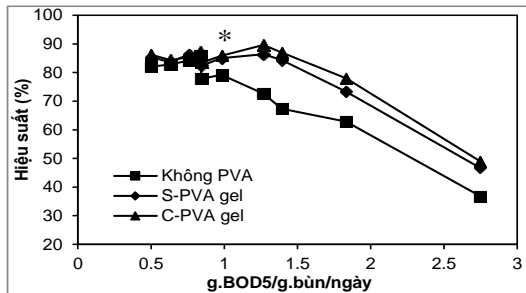


Hình 2. Sự thay đổi hiệu suất xử lý COD theo thời gian ở các mức tải đầu vào khác nhau: (a) 0,5 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày, (b) 0,75 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày, (c) 1 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày và (d) 1,25 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ngày.

Từ các kết quả trên có thể thấy, hiệu quả xử lý chất hữu cơ đạt giá trị ổn định trong khoảng thời gian 8-12 giờ. Như vậy thời gian lưu nước (HRT) thích hợp được lựa chọn là 8 giờ, thời điểm mà hầu hết chất hữu cơ nạp vào đã được xử lý. Mốc thời gian này cũng phù hợp trong thiết kế bể aerotank truyền thống (6 – 8 giờ khi dùng hệ thống sục khí, 9 – 12 giờ khi dùng thiết bị khuấy cơ học (Trịnh Xuân Lai, 2000)).

**Vai trò của vật liệu PVA khi xử lý nước thải có nồng độ chất hữu cơ cao**

Với nồng độ bùn được cố định là 2500 mg/L, HRT được lựa chọn là 8 giờ và tải nạp hữu cơ được tính toán theo nồng độ COD đầu vào, hiệu suất xử lý chất hữu cơ theo tải nạp đầu vào được biểu diễn trên Hình 3.



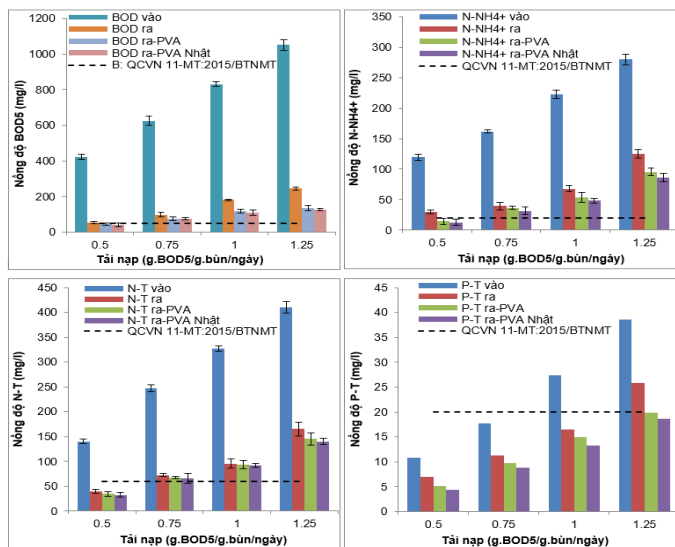
Hình 3. Hiệu suất xử lý COD theo tải nạp hữu cơ đầu vào

Có thể thấy ở tải nạp hữu cơ nhỏ hơn 0,85 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ ngày, sự chênh lệch hiệu suất xử lý ở 3 bình phản ứng là không đáng kể từ 2 – 5% nhưng khi tải nạp hữu cơ lớn hơn 0,85 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ ngày thì có sự khác biệt rõ rệt (với p<0,05). Bình chứa vật liệu PVA gel đạt hiệu suất xử lý COD cao hơn bình không chứa vật liệu khoảng 7 – 20%. Bình chứa vật liệu C-PVA gel có hiệu suất xử lý COD cao hơn bình chứa S-PVA gel khoảng 3%. Nếu so sánh ở cùng hiệu suất xử lý COD là khoảng 85-87%, với bình phản ứng không có vật liệu tải trọng hữu cơ cao nhất có thể vận hành là 0,85 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ ngày trong khi đó bình có chứa vật liệu S-PVA gel và C-PVA gel có thể vận hành ở tải trọng tương ứng là 1,4 và 1,5 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ ngày. Hay nói cách khác, việc bổ sung thêm 20% vật liệu PVA gel có thể tăng tải trọng xử lý lên gấp 1,65 ÷ 1,76 lần và vật liệu S-PVA gel đạt hiệu suất xử lý khoảng 94% so với C-PVA gel.

Trong các lần thí nghiệm chỉ số thể tích bùn (SVI<sub>30</sub>) của 3 bình phản ứng dao động 124 – 132 mL/g tương ứng thể tích bùn chiếm chỗ là 31 – 33%. Với 20% thể tích vật liệu PVA gel được sử dụng thì thể tích chiếm chỗ của bùn và vật liệu trộn chung là khoảng 40% tăng khoảng 7 – 9% so với bình chỉ chứa bùn hoạt tính. Như vậy ở tải hữu cơ lớn hơn 0,85 gBOD<sub>5</sub>/g.bùn/ ngày khi bổ sung 20% thể tích vật liệu PVA thể tích chiếm dụng trong bể phản ứng chỉ tăng 7 – 9% nhưng hiệu suất xử lý COD có thể tăng 7 – 20% và tải nạp hữu cơ có thể tăng 1,65 ÷ 1,76 lần.

**Đánh giá hiệu quả chuyển hóa chất hữu cơ và chất dinh dưỡng**

Sự thay đổi nồng độ các chỉ tiêu BOD<sub>5</sub>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-T và P-T ở đầu vào và đầu ra với các mức tải hữu cơ khác nhau trong 3 bình phản ứng được thể hiện trên Hình 4.



Hình 4. Sự thay đổi nồng độ BOD<sub>5</sub>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-T, P-T đầu vào và đầu ra ở các mức tải hữu cơ khác nhau trong 3 bình phản ứng (không có PVA, S-PVA gel và C-PVA gel)

Có thể thấy, ở các tải nạp đầu vào khác nhau hàm lượng chất hữu cơ ( $BOD_5$ ) và chất dinh dưỡng ( $N-NH_4^+$ , N-T và P-T) ở các bình phản ứng đều giảm sau 8 giờ xử lý. Bình có chứa vật liệu PVA gel luôn có nồng độ đầu ra chất hữu cơ ( $BOD_5$ ) và chất dinh dưỡng thấp hơn bình không chứa vật liệu. Kết quả này cho thấy vai trò của giá thể ứng dụng trong xử lý nước thải, nó làm tăng mật độ vi khuẩn trong bể phản ứng dẫn đến tăng hiệu quả xử lý. Đối chiếu với cột B của QCVN 11-MT:2015/BTNMT, các chỉ tiêu  $BOD_5$ ,  $N-NH_4^+$ , N-T và P-T của nước thải đầu ra trong khảo sát này chỉ đạt chuẩn khi tải nạp hữu cơ nhỏ hơn hoặc bằng  $0,5 \text{ gBOD}_5/\text{g.bùn/ngày}$ .

Với tải  $0,5 \text{ BOD}_5/\text{g.bùn/ngày}$ , (i) Hiệu suất xử lý  $BOD_5$  trung bình đạt: 87,1%, 89,3% và 90,7%; (ii) Hiệu suất xử lý  $N-NH_4^+$  trung bình đạt: 74,9%, 87,9% và 89,6%; (iii) Hiệu suất xử lý N-T trung bình đạt: 71,4%, 75,4% và 76,9%; (iv) Hiệu suất xử lý P-T trung bình đạt: 35,6%, 51,7% và 59,3% tương ứng cho các bể phản ứng lần lượt là: không bổ sung vật liệu, bổ sung S-PVA gel và bổ sung C-PVA gel.

Với tải  $0,75 \text{ BOD}_5/\text{g.bùn/ngày}$ , (i) Hiệu suất xử lý  $BOD_5$  trung bình đạt: 84,5%, 88% và 88,3%; (ii) Hiệu suất xử lý  $N-NH_4^+$  trung bình đạt: 75,7%, 77,4% và 80,5%; (iii) Hiệu suất xử lý N-T trung bình đạt: 70,6%, 72,8% và 73,5%; (iv) Hiệu suất xử lý P-T trung bình đạt: 36,7%, 45,2% và 50,5% tương ứng cho các bể phản ứng lần lượt là: không bổ sung vật liệu, bổ sung S-PVA gel và bổ sung C-PVA gel.

Với tải  $1 \text{ BOD}_5/\text{g.bùn/ngày}$ , (i) Hiệu suất xử lý  $BOD_5$  trung bình đạt: 78,3%, 85,9% và 86,7%; (ii) Hiệu suất xử lý  $N-NH_4^+$  trung bình đạt: 69,7%, 76,2% và 78,5%; (iii) Hiệu suất xử lý N-T trung bình đạt: 70,9%, 71,4% và 71,8%; (iv) Hiệu suất xử lý P-T trung bình đạt: 39,8%, 45,6% và 51,5% tương ứng cho các bể phản ứng lần lượt là: không bổ sung vật liệu, bổ sung S-PVA gel và bổ sung C-PVA gel.

Với tải  $1,25 \text{ BOD}_5/\text{g.bùn/ngày}$ , (i) Hiệu suất xử lý  $BOD_5$  trung bình đạt: 76,7%, 87,1% và 88,1%; (ii) Hiệu suất xử lý  $N-NH_4^+$  trung bình đạt: 55,4%, 65,9% và 69,4%; (iii) Hiệu suất xử lý N-T trung bình đạt: 59,8%, 64,6% và 65,9%; (iv) Hiệu suất xử lý P-T trung bình đạt: 33,1%, 48,7% và 51,8% tương ứng cho các bể phản ứng lần lượt là: không bổ sung vật liệu, bổ sung S-PVA gel và bổ sung C-PVA gel.

Như vậy, ở  $HRT = 8$  giờ việc bổ sung vật liệu giá thể PVA gel vào bể phản ứng đã làm tăng hiệu quả xử lý  $BOD_5$  lên khoảng 3-11%, tăng hiệu quả xử lý chất dinh dưỡng lên khoảng 5-23%. Kết quả này có thể so sánh với nghiên cứu của Suntud Sirianuntapiboon và Suriyakit Yommee khi sử dụng ruột xe đã qua sử dụng làm giá thể (2006) hay kết quả đạt được của nhóm Phan Thị Kim Thủy và Trần Văn Quang (Thủy & Quang, 2020) trên nước thải lấy tại trạm XLNT tập trung Sơn Trà. Khi tải nạp hữu cơ càng tăng thì hiệu suất xử lý trong mỗi bình càng giảm tuy nhiên sự chênh lệch hiệu suất giữa bình có chứa vật liệu PVA gel và bình không chứa vật liệu lại càng thể hiện rõ. Hiệu suất xử lý  $BOD_5$  của bình chứa vật liệu C-PVA gel chỉ cao hơn bình chứa vật liệu S-PVA gel khoảng 1-2%.

## KẾT LUẬN

Vật liệu PVA gel (S-PVA gel và C-PVA gel) có khả năng xử lý nước thải chứa hàm lượng chất hữu cơ cao, hiệu quả càng rõ ràng khi tải nạp đầu vào tăng lên. Khi sử dụng 20% thể tích vật liệu chỉ làm tăng thể tích chiếm dụng trong bể phản ứng lên 7 – 9% nhưng có thể tăng hiệu suất xử lý COD lên 7 – 20%, tăng hiệu suất xử lý  $BOD_5$  lên 3-11%, tăng hiệu suất xử lý chất dinh dưỡng (N-T và P-T) lên 5-23% và tăng tải nạp hữu cơ lên 1,65÷ 1,76 lần. Với cùng hiệu suất xử lý COD khoảng 85-87%, khi sử dụng vật liệu S-PVA gel tải trọng hữu cơ có thể đạt  $3,48 \text{ kgBOD}_5/\text{m}^3/\text{ngày}$  (tương ứng  $5,48 \text{ kgCOD}/\text{m}^3/\text{ngày}$ ) xấp xỉ với giá trị  $3,73 \text{ kgBOD}_5/\text{m}^3/\text{ngày}$  (tương ứng  $5,87 \text{ kgCOD}/\text{m}^3/\text{ngày}$ ) khi sử dụng vật liệu C-PVA gel của Nhật. Kết quả nghiên cứu mở ra tiềm năng ứng dụng rộng rãi của loại vật liệu PVA gel tổng hợp bằng phương pháp lạnh động-rã đông trong xử lý nước thải giàu hợp chất hữu cơ như là nước thải chế biến thủy sản.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ nghiên cứu châu Á Kurita (23Pvn090) và Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng với đề tài có mã số: T2024-02-20.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anh PT & Lâm ND (2020). Investigating effect of synthesis conditions on the formation of PVA hydrogel. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, 14-18.
- Eckenfelder WW, Ford DL, and Englande AJ (2009). Industrial water quality (4th Ed.), McGraw-Hill Education.
- Ghangrekar MM, and Behera M (2014), Suspended growth treatment processes. Ahuja, S. (ed). Comprehensive Water Quality and Purification. Elsevier. 74–89.
- Hoa TT, Thoan NV, & Minh NT (2017). Combination between moving bed reactor and activated sludge process to remove high organic loading of seafood wastewater. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(6), 734-742, doi: 10.15625/2525-2518/55/6/8316.
- Levstek M, Plazl I, & Rouse JD (2010). Estimation of the Specific Surface Area for a Porous Carrier. *Acta Chim Slov*, 57(1)
- Lê Hoàng Việt và Nguyễn Võ Châu Ngân (2014). *Giáo trình Xử lý nước thải*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
- Lương Đức Phẩm (2002). *Công nghệ xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học*. Nhà xuất bản Giáo dục.
- Ngoc NT, Binh NX, & Thu Ha NT (2022). Environmental issues at seafood processing villages in the north region, Vietnam: Perception and behaviour of business owners. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 19(2), 79-87.

- Sirianuntapiboon S, & Yommee S (2006). Application of a new type of moving bio-film in aerobic sequencing batch reactor (aerobic-SBR). *J Environ Manage*, 78(2), 149-156.
- Thủy PTK, & Quang TV (2020). Nghiên cứu đánh giá khả năng tăng tải trọng xử lý các chất hữu cơ của các loại vật liệu đệm cho bể Aeroten trong xử lý nước thải chế biến thủy sản. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, 18(1), 23-26.
- Trịnh Xuân Lai (2000). *Tính toán thiết kế các công trình xử lý nước thải*. Nhà Xuất bản Xây dựng Hà Nội.
- Tseng ML, Tran TPT, Ha HM, Bui TD, & Lim MK (2022). Causality of circular business strategy under uncertainty: A zero-waste practices approach in seafood processing industry in Vietnam. *Resources, Conservation and Recycling*, 181, 106263.

## APPLICATION OF SYNTHETIC PVA-GEL IN SEAFOOD PROCESSING WASTEWATER TREATMENT

Phan The Anh, Nguyen Thi Dong Phuong, Nguyen Hoang Trung Hieu\*

*Faculty of Chemical Engineering, University of Science and Technology, The University of Da Nang*

### SUMMARY

Seafood processing wastewater is a typical wastewater with high levels of organic matter and nutrients that are biodegradable. Currently, activated sludge aerobic technology (aerotank) is being widely applied by many seafood processing companies in Vietnam. To increase treatment efficiency for aerotanks, substrates are often added in aerotanks to increase the biomass content. Among all types of substrates, PVA gel is highly appreciated in wastewater treatment because of its high biocompatibility and large specific surface area, thereby increasing the ability to carry microorganisms to enhance wastewater treatment efficiency. In this study, the wastewater treatment efficiency of the synthetic PVA gel material (S-PVA gel) was evaluated through the activated sludge aerobic biochemical process following the SBR (Sequencing Bath Reactor) principle with gradual change in input organic matter concentration. Commercial PVA gel material (C-PVA gel) from Kuraray, Japan was also used as a control material. Research results show that adding 20% of the material volume only increases the occupied volume in the reaction tank by 7 - 9% but can increase COD treatment efficiency by 7 - 20%, BOD<sub>5</sub> treatment efficiency by 3-11%, nutrient processing efficiency (N-T and P-T) by 5-23% and organic loading by 1.65 - 1.76 times. At the same COD treatment efficiency of 85-87%, the input organic load can reach 3.48 kgBOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>/day (corresponding to 5.48 kgCOD/m<sup>3</sup>/day) when using S-PVA gel material, which was approximately equal to the value of 3.73 kgBOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>/day (corresponding to 5.87 kgCOD/m<sup>3</sup>/day) when using Japan C-PVA gel material at. The research results open up the potential for widespread application of PVA gel material in Vietnam.

*Keywords: Aerotank, activated sludge, seafood processing wastewater, PVA gel, Sequencing Bath Reactor (SBR), wastewater treatment.*

---

\* Author for correspondence: Tel: 0965253101; Email: nhtrunghieu@dut.udn.vn.

# ANTIBIOTIC RESIDUES, ANTIBIOTIC-RESISTANT GENES, AND MICROBIAL COMPOSITION IN THE MEKONG RIVER IN DRY SEASON

Nguyen Dang Quang<sup>1</sup>, Anne-Laure Banuls<sup>2</sup>, Nguyen Quang Huy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>MICH Research Group, University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>MMIVEGEC, IRD-UM-CNRS, Institute of Research for Development, 911 Avenue Agropolis, Montpellier, France

## SUMMARY

Antibiotic resistance (AMR) is among the top 10 threats to global health. Antibiotic-resistant pathogenic bacteria in rivers can affect human health via the food chain and daily activities. The present study aimed to investigate the AMR situation in the Mekong River in Cambodia and Vietnam. Antibiotic residues (20 types) were measured by ultra-performance liquid chromatography (UPLC), antibiotic-resistant genes (22 types) were investigated using targeted polymerase chain reaction (PCR), and microbial composition was analyzed by metagenomic sequencing. Sulfamethoxazole (SMX), tetracycline (TET), lincomycin (LCM), and oxytetracycline (OTC) were found in water samples in Vietnam and Cambodia with concentrations of *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Aerococcus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* and *Vibrio*. Sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, *sul3*), macrolides resistance gene (*erm(B)*), and tetracycline resistance genes (*tetQ*, *tetM*) were found in 16, 11, and 5 samples, respectively. Bacterial composition analysis revealed 61 bacterial genera in which various human pathogens were detected including. These findings could be used to assess the risks of transmission and infection with antibiotic-resistant bacteria for the population in the Mekong River Basin region.

**Keywords:** Antibiotic-resistant genes, antibiotic residues, Mekong River, metagenomics sequencing, pathogenic bacteria.

## INTRODUCTION

The emergence and dissemination of antimicrobial resistance (AMR) has turned into a major public health threat worldwide (ARC 2022). Antibiotic-resistant bacteria can be found in all known ecosystems. An in-depth understanding of the mechanisms of AMR emergence and dissemination is essential for the development of interventions and strategies to control this global threat (Kim and Cha, 2021). Globally, human activities have drastically modified environments by introducing contaminants and compounds that adversely affect ecosystems and microbial communities. The water environment is one of the most illustrative examples. Rivers and streams are central to human activities through their use for trade, transport, navigation, industries, irrigation, electricity production, as well as domestic and leisure activities (Liu *et al.*, 2018). They are a major source of drinking water both for humans and animals (domestic or wild). They also receive effluents from multiple human activities and can transport all kinds of pollutants (plastic, pesticides, metals, drug residues...) over huge distances. Among these pollutants, antibiotic residues are known to contribute to the selection and amplification of AMR in humans, livestock, and the environment. Their accumulation and dispersion in water environments are a result of human and animal (mis)-use, release from industrial, hospital, or community effluents, or bad wastewater treatment practices (Grenni, 2022; Singh *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2023). Some activities, such as the agricultural spread of manure and sewage disposal, are suspected to introduce antibiotic-resistance genes (ARGs) and resistant microorganisms into the aquatic environment, creating new interactions amongst bacterial populations. These places therefore turn into incubators gathering bacteria from different origins, antibiotics, disinfectants, and metal pollutants, favoring intra- and inter-specific horizontal gene transfers (HGT) between bacteria and the emergence and dissemination of antibiotic resistance. Aquatic environments therefore represent a unique setting for the acquisition and spread of ARGs, as well as for the proliferation of resistant bacteria.

The Mekong River flowing from its source in the Tibetan plateau through China, Myanmar, Thailand, Laos, Cambodia, and Vietnam, is an excellent illustration of the interactions that can take place between rivers and human communities. Antibiotic-resistant bacteria infections in Vietnam and Cambodia are increasing for a variety of reasons, including poor medication quality, insufficient AMR surveillance, low community awareness, insufficient regulation, excessive agricultural use, economic drivers, and overuse of antimicrobials, of which antibiotics is a subset (McKinn *et al.*, 2021). Nevertheless, the role and impact of the Mekong River on the emergence and dissemination of antibiotic-resistant bacteria were poorly investigated in Vietnam and Cambodia. The present study investigated the contamination of antibiotics and antibiotic-resistant genes in the Mekong River

in Vietnam and Cambodia. Our findings may be useful in supporting governments in developing different strategies for controlling AMR in the Mekong Delta Basin region.

## MATERIALS AND METHODS

### Water collection

A total of 27 water samples were collected along the Mekong River in Cambodia (9 stations) and in Vietnam (18 stations). For each location, 10 liters (L) of water were taken at 5 centimeters (cm) below the top of the surface water and then aliquoted into 500 ml sterilized bottles. These bottles were immediately stored in the ice box and transported to the laboratory for further analysis.

### Quantification of Antibiotic residues

Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled with a tandem mass spectrometer (Waters, Xevo-TQD, USA) was used to quantify 20 target compounds including ofloxacin, ofloxacin D3, ciprofloxacin, norfloxacin, trimethoprim, sulfamethoxazole, 13C6-sulfamethoxazole, carbamazepine, ampicillin, amoxicillin, amoxicillin 13C6, tetracycline, azithromycin, cefotaxime, lincomycin, roxithromycin, clarithromycin, erythromycin, oxytetracycline, doxycycline. Target analytes were separated on a C18 column (BEH, C18, 50 x 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m particle size). Standard solution concentrations (10-500 ppb) were prepared for the calibration curves. Each calibration curve was linear with a coefficient of determination ( $R^2$ ) >0.995. For this test, two samples with concentrations of 10  $\mu$ g/L and 500  $\mu$ g/L were prepared by spiking target compounds into river water. Relative recoveries were calculated using the following equation:

$$\% \text{ Relative recovery} = (CS - CM)/(C0) \times 100 \quad (1)$$

where CS and CM are the concentrations of the analyte determined for the spiked sample and the un-spiked matrix, respectively, and C0 is the predetermined concentration of the spiked sample. The MDL (Method detection limit) was determined to be 3.143 times (the Student t value for six degrees of freedom at a 99% confidence level) the standard deviation of three replicate samples within the dynamic range (US EPA, U.S. Code of Federal Regulations).

### Environmental DNA extraction and Detection of antibiotic-resistant genes

For each station, 1 liter of water sample was filtered by 0.2  $\mu$ m filter membrane to collect bacterial biomass. The membrane was then cut into small pieces and used for environmental DNA (eDNA) extraction using a DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's guidelines. The quantity and purity of eDNA were measured using Nanodrop 2000 (ThermoFisher, USA).

22 AMR genes associated with resistance to 13 antibiotic resistance groups were screened by targeted PCR using specific primers. 13 antibiotic resistance groups included: Sulfonamide (*sul1*, *sul2*, *sul3*), macrolides (*erm(B)*), tetracycline (*TetQ*, *TetM*), trimethoprim (*dfpA*), colistin (*mcr-1*), Quinolone (*QnrA*, *QnrS*, *QepA*), methicillin (*MecA*), Carbapenem (*OXA-48*, *KPC*, *NDM*), Integrons (*int*), vancomycin (*vanA*), beta-lactam (*CMY*). 1  $\mu$ L DNA template was added to the 19  $\mu$ L master mix consisting of 15  $\mu$ L sterile water, 2  $\mu$ L 10X buffer, 0.4  $\mu$ L dNTPs, 0.8  $\mu$ L Taq polymerase, 0.4  $\mu$ L of each primer. Cycling parameters were 95°C for 2 min followed by 35 cycles of 95°C for 30s, 52-60°C (Depending on annealing temperature) for 15 s, 72°C for 5 min, and finally 72°C for 10 min. The PCR products were run through a 1% agarose gel stained with Red Safe (Intron, Korea). Non-template controls (NTCs) were used for all experiments.

### Metagenomics sequencing analysis

To identify the composition and number of prokaryotic microorganisms, 16S rDNA amplicon sequencing involves building libraries using specific primers to amplify the variable region V3-V4 of bacterial 16S rDNA. The DNA extraction from the samples amplified the two variable regions of 16S rDNA (V3 and V4) and accurately identified various species including archaea. Data were analyzed using MG-RAST with default parameters to determine the microbial makeup of the individual sampling sites. The MG-RAST automated analysis process makes use of the M5nr (MD5-based non-redundant protein database) which integrates many sequence databases (EBI, GO, JGI, KEGG, NCBI) for annotation. The process separates after uploading samples with 16S ribosomal amplicons. The WGS workflow is divided into several stages, beginning with the removal of low-quality reads, and progressing to dereplication, gene calling, annotation, and the creation of functional abundance profiles. On rRNA samples, RNA detection, clustering, and identification are conducted, and taxonomic abundance profiles are generated as a result (Keegan et al., 2016).

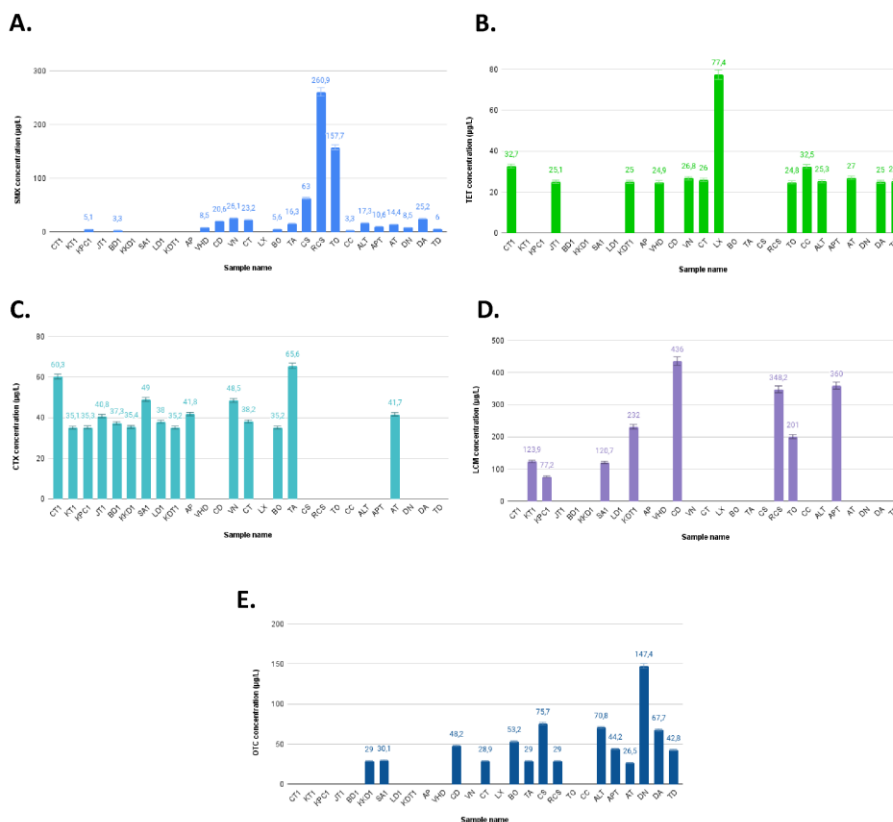
## RESULTS AND DISCUSSION

### Quantification of antibiotic residues in the Mekong River

Five antibiotic residues including SMX, TET, LCM, CTX, and OTC were detected in the Mekong River in Cambodia and Vietnam (Figure 1). Specifically, CTX was found in all 9 stations in Cambodia with high



concentration (from 35.1  $\mu\text{g/L}$  to 60.3  $\mu\text{g/L}$ ), while it was detected in only 6 stations in Vietnam (from 35.2  $\mu\text{g/L}$  to 48.5  $\mu\text{g/L}$ ). The TET was mainly found in Vietnam ( $n=10$ , 23 – 80  $\mu\text{g/L}$ ), while CTX was detected in all samples from Cambodia (38 – 60  $\mu\text{g/L}$ ). The LCM was found in both Vietnam ( $n=4$ ) and Cambodia ( $n=4$ ) with concentrations of greater than 120  $\mu\text{g/L}$ . The OTC was detected in 14 samples with the concentration ranging from 28.9  $\mu\text{g/L}$  to 147.4  $\mu\text{g/L}$ . The MDLs ranged from 0.2–11.5 ng/L for the range of antibiotics investigated. Spiked MDL samples were produced at concentrations 2–5 times that of the predicted detection limit of each drug. The MDLs determined in our investigation are similar to those determined by the US EPA Method. Overall, antibiotic residues were accumulated in the Mekong River Basin in Vietnam. The largest global study found antibiotics in 65% of 711 sites in rivers from 72 countries. Of note, the concentrations of antibiotics exceeded safe levels in 111 sites, particularly some sites more than 300 times over the safe limit. Our study underlines the high level of antibiotic contamination in the Mekong River. Thus, the impact of antibiotic contamination on the emergence and transmission of antibiotic-resistant bacteria in the River needs to be investigated.



**Figure 1. Antibiotic residues detected in the Mekong River. SMX (A), TET (B), CTX (C), LCM (D), and OTC (E)**

### Detection of antibiotic-resistant genes

Six ARGs were identified in the Mekong River, including *sul1*, *sul2*, *sul3*, *erm(B)*, *tetQ*, and *tetM*. Specifically, *Sul1* was detected in 10 samples of Vietnam but not in any samples of Cambodia. *Sul2* was detected in three samples of Cambodia, while *Sul3* was found in three samples of Vietnam. The *erm(B)* was found in 11 of the 27 samples. Finally, genes responsible for tetracycline resistance *TetM* and *tetQ* were detected in one sample of Cambodia and four samples of Vietnam, respectively. A previous study reported the presence of *sul1* and *sul2* along with the *blaCTX* in the Mekong River (Nakayama *et al.*, 2017). Our findings are in agreement with global studies where genes resistant to sulfonamide (*sul1*, *sul2*, and *sul3*), and tetracycline (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, *tetO*, *tetX*, *tetN*) were the most commonly detected in almost river systems (Cacace *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020; Raza *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2022).

### Distribution of potential pathogenic bacteria in the Mekong River

Analysis of bacterial composition revealed 61 bacterial genera in the studied samples, in which *Exiguobacterium*, *Streptomyces*, *Synechococcus*, *Acinetobacter*, and *Pseudomonas* were the most dominant (Figure 2). Notably, 24 bacterial genera were only found in Vietnam, while 16 bacteria genera were detected in Cambodia. Bacterial composition was different by sampling regions and by countries. Samples from the same country had more similar bacterial composition than samples belonging to different countries. Alpha diversity analysis demonstrated that bacterial richness and diversity were significantly higher in Vietnam than in Cambodia (Figure 3).

Furthermore, potential pathogenic bacteria associated with human and animal infections were found including *Aeromonas*, *Aerococcus*, *Mycobacterium*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, and *Enterococcus*. In agreement with previous studies, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, and *Vibrionaceae*, dominant in aquatic environments clinically significant pathogenic bacteria, and, are the major hosts of antibiotic-resistant genes (Kim and Cha, 2021; Shin *et al.*, 2023). Notably, antibiotic-resistant genes are highly exchanged and disseminated within bacterial strains and between species of these pathogens, and consequently enhance the bloom of antibiotic-resistant genes-carrying species. Multidrug-resistant *A. baumannii*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* strains belonging to the priority pathogen list of WHO are also detected in aquatic environments. Furthermore, antibiotic residues, metals, and various wastes foster the spread of antibiotic-resistant genes in environmental bacteria with the help of mobile genetic elements through horizontal gene transfer events (Kim and Cha, 2021; Shin *et al.*, 2023). Aquatic environments thus represent a unique setting for the acquisition and spread of antibiotic-resistant genes, as well as for the proliferation of antibiotic-resistant bacteria (Lee *et al.*, 2020). Therefore, the presence of antibiotics, pathogenic bacteria, and antibiotic-resistant genes in the Mekong River underlines that the river is an important reservoir for the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria in the population. These data could be used by the stakeholders as scientific evidence for actions and regulation implementation or modifications to better control the emergence of AMR in this region.

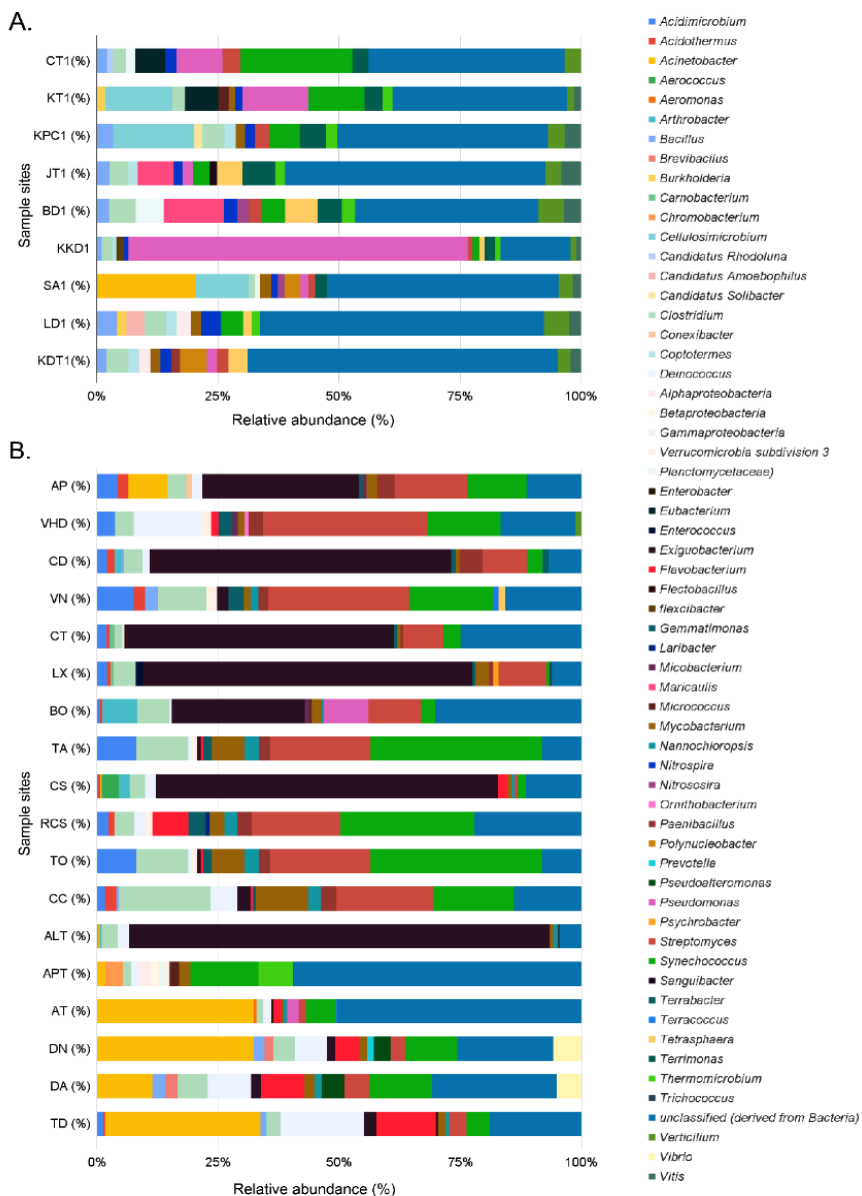


Figure 2. Composition and distribution of bacteria in the Mekong River in Cambodia (A) and Vietnam (B)

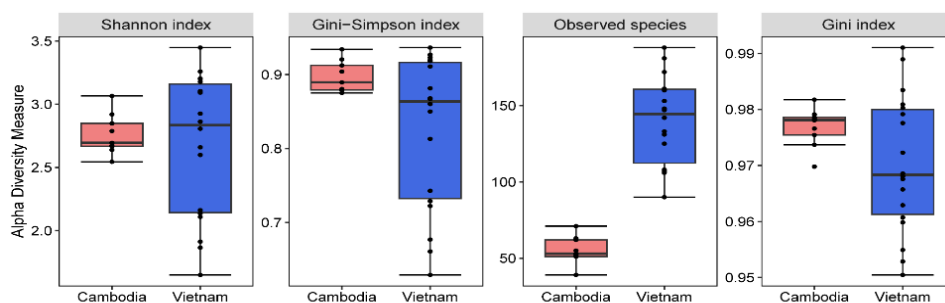


Figure 3. Bacterial diversity in surface water in the Mekong River

## CONCLUSION

The Mekong River is contaminated with antibiotic residues, antibiotic-resistant genes, and pathogenic bacteria. The river can be a potential reservoir for the emergence of antibiotic-resistant pathogenic bacteria which are risks to human and animal health and ecosystems.

**Acknowledgment:** This study was financially supported by ARCIMED project – OHSEA – IRD, LMI DRISA – IRD and University of Science and Technology of Hanoi (USTH) for research group MICH, under the scheme of Top-Tier and Emerging Research Groups of USTH 2024-2026.

## REFERENCES

- ARC - Antimicrobial Resistance Committee (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629-655.
- Grenn P (2022). Antimicrobial Resistance in Rivers: A Review of the Genes Detected and New Challenges. *Environ Toxicol Chem* 41, 687-714.
- Guevarra RB, Hwang J, Lee H, Kim HJ, Lee Y, Danko D, Ryon KA, Young BG, Mason CE, and Jang S (2022). Metagenomic characterization of bacterial community and antibiotic resistance genes found in the mass transit system in Seoul, South Korea. *Ecotoxicol Environ Saf* 246, 114176.
- Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, Roder T, Nieuwenhuijse D, Pedersen SK, Kjeldgaard J, et al. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* 10, 1124.
- Kim DW, and Cha CJ (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp Mol Med* 53, 301-309.
- Kraemer SA, Ramachandran A, and Perron GG (2019). Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms* 7.
- Lee K, Kim DW, Lee DH, Kim YS, Bu JH, Cha JH, Thawng CN, Hwang EM, Seong HJ, Sul WJ, et al. (2020). Mobile resistome of human gut and pathogen drives anthropogenic bloom of antibiotic resistance. *Microbiome* 8, 2.
- Manaia CM (2017). Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. *Trends Microbiol* 25, 173-181.
- Singh R, Singh AP, Kumar S, Giri BS, Kim KH (2019). Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *J Clean Prod* 234, 1484-1505.

## KHÁNG SINH, GENE KHÁNG THUỐC VÀ THÀNH PHẦN VI KHUẨN Ở SÔNG MEKONG TRONG MÙA KHÔ

Nguyễn Đăng Quang<sup>1</sup>, Anne-Laure Banuls<sup>2</sup>, Nguyễn Quang Huy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Nhóm nghiên cứu MICH, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>MIVEGEC, IRD-UM-CNRS, Viện nghiên cứu Vì phát triển (IRD), Montpellier, France

### TÓM TẮT

Kháng kháng sinh nằm trong 10 mối đe dọa nghiêm trọng nhất đối với sức khỏe toàn cầu. Vi khuẩn kháng kháng sinh trong sông có thể lây nhiễm tới người thông qua chuỗi thức ăn và các hoạt động hằng ngày. Nghiên cứu này đánh giá thực trạng kháng kháng sinh ở Sông Mekong lưu vực Campuchia và Việt Nam. Dư lượng kháng sinh (20 loại) được xác định bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (UPLC), gene kháng thuốc (22 loại) được xác định bằng PCR gene đích, thành phần vi khuẩn được phân tích từ dữ liệu giải trình tự metagenomics. Các kháng sinh gồm Sulfamethoxazole, tetracycline, lincomycin, và oxytetracycline có sự tồn dư trong nước khá cao với nồng độ từ 20 – 450 µg/L. Các gene kháng Sulfonamide (*sul1*, *sul2*, *sul3*), macrolides (*erm(B)*) và tetracycline (*tetQ*, *tetM*) được phát hiện lần lượt ở 16, 11 và 5 mẫu nghiên cứu. Phân tích thành phần vi khuẩn xác định được 61 chi vi khuẩn, trong đó vi khuẩn là mầm bệnh của người như *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Aerococcus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* và *Vibrio*. Những phát hiện này có thể được sử dụng để đánh giá nguy cơ lây truyền và nhiễm vi khuẩn kháng thuốc trong cộng đồng cư dân ở lưu vực sông Mekong.

*Từ khóa:* Dư lượng kháng sinh, giải trình tự metagenomics, gene kháng thuốc, sông Mekong, vi khuẩn gây bệnh.

---

\* Tác giả liên hệ: Tel: 02432121576. Email: Nguyen-quang.huy@usth.edu.vn

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨNG CHẾ NẤM MỐC *Aspergillus niger* CỦA TINH DẦU BẠC HÀ, HÚNG QUẾ, VÀ TRÂM TRONG CÁC CHẤT NHũ HÓA KHÁC NHAU

Liêu Mỹ Đông<sup>1,3,4\*</sup>, Nguyễn Thị Thanh Bình<sup>1</sup>, Phương Thảo Vy<sup>1</sup>, Nguyễn Hữu Hòa<sup>1</sup>, Huỳnh Ngọc Anh Thư<sup>1</sup>, Đặng Thị Kim Thúy<sup>2</sup>, Nguyễn Thúy Hương<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup> Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>4</sup> Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng kháng nấm mốc *Aspergillus niger* của tinh dầu bạc hà, tinh dầu húng quế, và tinh dầu trâm có nguồn gốc Việt Nam. Tinh dầu được pha loãng trong DMSO 1% (v/v) hoặc Tween 80 1% (v/v) ở các nồng độ khác nhau. Hoạt tính kháng nấm được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và ức chế sự phát triển hệ sợi nấm (MGI%). Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả kháng nấm phụ thuộc vào loại tinh dầu và chất nhũ hóa. Ở chất nhũ hóa DMSO, đường kính vòng kháng nấm đạt được từ 4,33 mm đến 18,66 mm với nồng độ ức chế tối thiểu đạt được ở cả ba tinh dầu là 50  $\mu$ L/mL, trong khi ở chất nhũ hóa là Tween 80 là 6,66 mm đến 27mm với nồng độ ức chế tối thiểu ở tinh dầu trâm là 50 và 25  $\mu$ L/mL ở hai tinh dầu còn lại. Khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi cho thấy chất nhũ hóa ảnh hưởng đáng kể tới hiệu quả ức chế của các loại tinh dầu trong khảo sát. Tween 80 cho thấy là chất nhũ hóa tốt đối với ba loại tinh dầu trong đó khả năng ức chế tinh dầu bạc hà và húng quế ở nồng độ 200 ppm đạt tương ứng 25% và 29,44%. Với khả năng tạo nhũ tương tốt, Tween 80 cho thấy tiềm năng ứng dụng trong bảo quản nông sản.

*Từ khóa:* *Aspergillus niger*, chất nhũ hóa, kháng nấm, sau thu hoạch, tinh dầu.

## MỞ ĐẦU

Tổn thất sau thu hoạch là một trong những nguyên nhân chính gây thất thoát nông sản trong đó nấm mốc được xem là một trong những nguyên nhân chính (Dharini *et al.*, 2014). Có nhiều loại nấm mốc khác nhau được xem là nguyên nhân gây hư hỏng nông sản sau quá trình thu hoạch, trong đó *Aspergillus niger*, nhận được nhiều sự quan tâm nghiên cứu (Lieu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019). Vì vậy, việc ức chế nấm mốc gây hư hỏng là cần thiết. Có nhiều hướng tiếp cận khác nhau được nghiên cứu nhằm ức chế các chủng nấm mốc gây hư hỏng trong đó tinh dầu được xem là trong những giải pháp bền vững trong bảo quản nông sản đang nhận được nhiều quan tâm là tinh dầu từ thực vật. Tinh dầu có nguồn gốc thực vật được chứng minh khả năng kháng vi sinh vật phổ rộng, an toàn và được ứng dụng trong bảo quản trái cây (Dharini *et al.*, 2014; Lieu *et al.*, 2021). Bên cạnh đó, hiệu quả kháng nấm còn phụ thuộc vào loại tinh dầu, nơi trồng và mùa thu hoạch,... Tuy nhiên, sự kỵ nước và mùi mạnh của tinh dầu có ảnh hưởng đáng kể đến việc sử dụng tinh dầu trong thực phẩm (Morten *et al.*, 2012). Trong bảo quản trái cây, tinh dầu ở nồng độ cao khiến cho quá trình hư hỏng quả diễn ra nhanh do tác động của tinh dầu lên vỏ quả (Lieu *et al.*, 2021). Vì vậy, trong ứng dụng bảo quản thực phẩm, tinh dầu thường được pha loãng đến nồng độ phù hợp nhằm đảm bảo hiệu quả kháng nấm cũng như hạn chế tác động của tinh dầu tới thực phẩm. Để đạt được điều này, các chất nhũ hóa trong đó Dimethylsulfoxide (DMSO) và Tween 80 thường được sử dụng (Verica *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Các chất nhũ hóa giúp phân tán tinh dầu trong môi trường, giúp tinh dầu dễ dàng tiếp xúc và tác động lên tế bào vi sinh vật, từ đó gia tăng hiệu quả kháng nấm. Tuy nhiên, ảnh hưởng của các chất tạo nhũ tương lên hiệu quả kháng nấm của các tinh dầu chưa được công bố đầy đủ. Trong nghiên cứu này, hiệu quả kháng nấm *A. niger* của ba loại tinh dầu bao gồm tinh dầu bạc hà, húng quế và trâm có nguồn gốc Việt Nam trong hai loại nhũ tương là DMSO và Tween 80 được khảo sát thông qua đánh giá hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, ức chế sự phát triển hệ sợi nấm mốc và ức chế sự sinh trưởng của nấm *A. niger*.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng *Aspergillus niger* được phân lập tại Đà Lạt, Lâm Đồng từ các nguồn bơ bị hư hỏng tự nhiên ở vườn. *A. niger* được nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) ở 30°C trong 9 ngày. Bào tử sau đó được thu nhận bằng môi trường ở mật độ 5 Log CFU/mL.

Tinh dầu bạc hà, tinh dầu húng quế, và tinh dầu trầm được chiết xuất theo phương pháp lôi cuốn hơi nước và được bảo quản trong lọ kín. Các tinh dầu được pha loãng trong Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Duchefa) 1% (v/v) hoặc Tween 80 (Xilong) 1% (v/v) ở các nồng độ khác nhau và được sử dụng cho các thử nghiệm kháng nấm.

**Phương pháp nghiên cứu**

**Khảo sát hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên thạch**

Khảo sát đánh giá hoạt tính kháng nấm được tiến hành theo mô tả của Lieu và đồng tác giả (2021) với vài thay đổi được tóm tắt như sau. Sinh khối *A. niger* sau quá trình nuôi cấy được kiểm tra mật độ trên buồng đếm hồng cầu và hiệu chỉnh đến nồng độ 5 log bào tử/mL. Huyền phù thu được sẽ được trải lên môi trường thạch (PDA). Sau đó nhỏ 10 µL hệ nhũ tương có chứa tinh dầu ở các nồng độ khác nhau lên bề mặt thạch, các dung môi không chứa tinh dầu được dùng làm đối chứng. Các đĩa petri sau đó được ủ ở 35 °C. Sau 24 giờ ủ, các đĩa petri được lấy ra kiểm tra đường kính vòng kháng nấm.

**Khảo sát ảnh hưởng của tinh dầu lên sự sinh trưởng của hệ sợi *A. niger***

Ảnh hưởng của các loại tinh dầu lên sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm mốc được tiến hành theo mô tả của Boubaker và đồng tác giả (2016). Tinh dầu pha loãng trong Tween 80 (1% v/v) hoặc trong DMSO (1% v/v) được bổ sung vào môi trường PDA để đạt nồng độ tinh dầu 100 ppm và 200 ppm. Bào tử *A. niger* được cấy vào giữa mỗi đĩa và được ủ ở 35 °C. Đường kính của khuẩn lạc được đo sau mỗi 24 giờ. Các thí nghiệm được đánh giá khi khuẩn lạc mẫu đối chứng phát triển đến mép của đĩa. Chỉ số kháng nấm (MGI) được tính dựa trên công thức:  $MGI (\%) = (C-T)/T \times 100\%$ . Trong đó T là kích thước của khuẩn lạc trong đĩa thí nghiệm, C là kích thước của khuẩn lạc trong đĩa đối chứng.

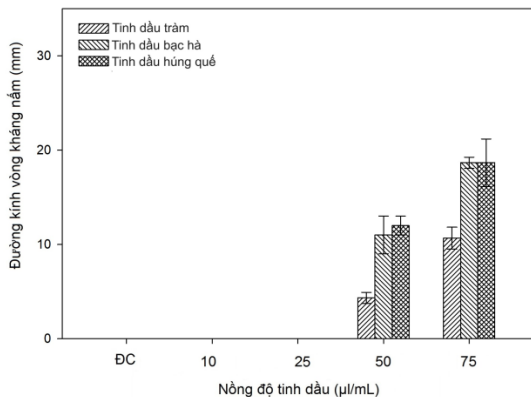
**Xử lý thống kê**

Các nghiệm thức của thí nghiệm được lặp lại ba lần nhằm xác định giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và kiểm định Student–Newman–Keuls, Tukey HSD dùng để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm. Số liệu được xử lý thông qua phần mềm Statgraphics centurion phiên bản 15.1.

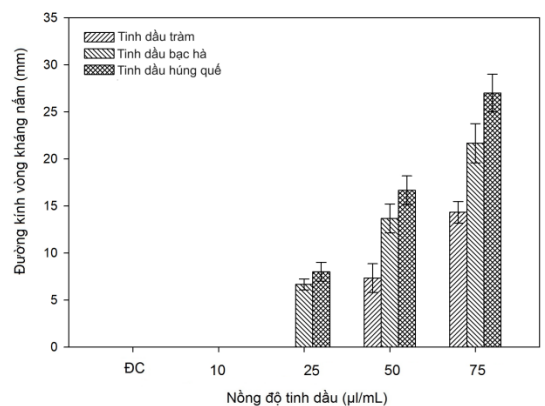
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Ảnh hưởng của DMSO và Tween 80 tới hiệu quả kháng nấm *A. niger* của các loại tinh dầu**

Ảnh hưởng của ba loại tinh dầu quế trong hệ nhũ DMSO và Tween 80 được trình bày ở Hình 1 và 2. Kết quả thu được cho thấy có sự khác biệt đáng kể ( $p < 0,05$ ) về khả năng kháng nấm của các loại tinh dầu trong đó tinh dầu trầm cho hiệu quả kháng nấm thấp nhất. Kết quả khảo sát cũng cho thấy, DMSO và Tween 80 có ảnh hưởng đáng kể tới hiệu quả kháng nấm của tinh dầu trong đó Tween 80 giúp cải thiện đáng kể hiệu quả kháng nấm của cả ba loại tinh dầu (Hình 1 và 2). Nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu húng quế và bạc hà trong DMSO và Tween 80 đều đạt lần lượt 50 µL/mL và 25 µL/mL, trong khi ở tinh dầu trầm cho nồng độ ức chế tối thiểu ở cả hai chất nhũ hóa là 50 µL/mL.



Hình 1. Ảnh hưởng của DMSO tới hiệu quả kháng nấm của các loại tinh dầu



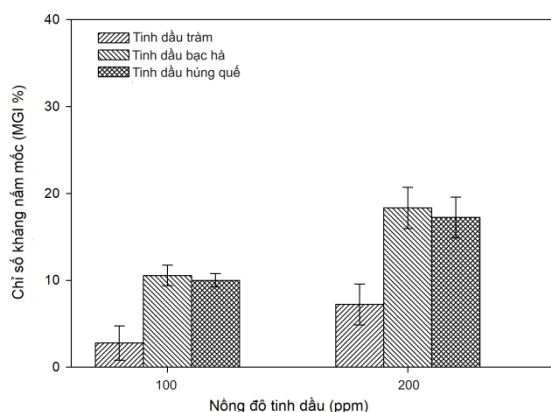
Hình 2. Ảnh hưởng của Tween 80 tới hiệu quả kháng nấm của các loại tinh dầu

Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, tinh dầu có chứa các thành phần kháng nấm có thể chống lại các loại nấm gây hư hỏng trái cây (Combrinck *et al.*, 2011). Theo báo cáo của Sukatta và đồng tác giả (2008) tinh dầu quế ở nồng độ 10 µl cho kết quả kháng nấm là 100% đối với *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* và *Lasiodiplodia theobromae*. Một trong những cơ chế kháng nấm của tinh dầu là tác động bằng cách phân cắt lớp màng lipid của tế bào nấm mốc, dẫn đến thay đổi tính thấm đối của ion H<sup>+</sup> và K<sup>+</sup> (Dharini *et al.*, 2014).

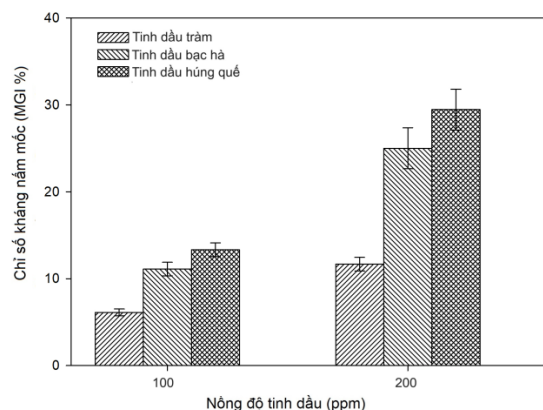
Khả năng kháng nấm của tinh dầu đạt được khi tinh dầu có thể tiếp xúc với vi sinh vật. Vì vậy chất tạo nhũ ảnh hưởng đến chất lượng kháng nấm của tinh dầu. Chất nhũ hóa ảnh hưởng đáng kể đến tính chất nghiên cứu và độ ổn định của tinh dầu (Gorjian *et al.*, 2022). Do đặc tính kỵ nước của tinh dầu khiến cho khi pha loãng tinh dầu gặp khó khăn vì vậy sử dụng hệ nhũ giúp pha loãng tinh dầu tốt hơn. Theo báo cáo trước đây khi sử dụng chất nhũ giúp tinh dầu có độ ổn định tính chất vật lý tốt, sự phân tán ổn định (El-Baroty *et al.*, 2010). Sự phân bố kích thước của tinh dầu cũng có ảnh hưởng đến tính chất kháng nấm của tinh dầu. Nhũ tương có chứa tinh dầu có khả năng phá vỡ và thâm nhập vào cấu trúc lipid của thành tế bào vi khuẩn, dẫn đến sự biến tính protein và phá hủy màng tế bào sau đó làm thay đổi hình dạng và chết tế bào (Muhammad *et al.*, 2017). Kết quả thu được từ khảo sát cho thấy, Tween 80 giúp tinh dầu phân tán tốt hơn, từ đó gia tăng hiệu quả kháng nấm so với chất nhũ hóa DMSO (Hình 1 và 2).

### Ảnh hưởng của DMSO và Tween 80 tới khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *A. niger* của các loại tinh dầu

Khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi của *A. niger* của các loại tinh dầu được trình bày ở Hình 3 và 4. Kết quả thu được cho thấy, sau 6 ngày ủ trên môi trường PDA, kích thước khuẩn lạc nấm mốc trên đĩa đối chứng đạt 90 mm, trong khi ở mẫu có chứa tinh dầu cho thấy kích thước của đường kính khuẩn lạc nấm mốc giảm đáng kể thông qua chỉ số MGI%. Ở nồng độ 100 ppm, giá trị MGI% của tinh dầu bạc hà, húng quế và trà trong DMSO lần lượt đạt 10,55%; 10%; và 2,77%, trong khi ở mẫu Tween 80 đạt lần lượt là 11,11%; 13,33%; và 6,11% (Hình 3 và 4). Ở nồng độ 200 ppm cho thấy hiệu quả ức chế hệ sợi tăng đáng kể. Giá trị MGI% của tinh dầu bạc hà, húng quế và trà trong DMSO lần lượt đạt 18,33%; 17,22%; và 7,22%, trong khi ở mẫu Tween 80 đạt lần lượt là 25%; 29,44%; và 11,67% (Hình 3 và 4).



Hình 3. Ảnh hưởng của DMSO tới khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *A. niger* của các loại tinh dầu



Hình 4. Ảnh hưởng của Tween 80 tới khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *A. niger* của các loại tinh dầu

Tinh dầu và các thành phần của chúng có tác động đáng kể tới sự phát triển hệ sợi nấm mốc. Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, tinh dầu húng quế hòa tan trong aceton có thể ức chế được hoàn toàn hệ sợi nấm *A. flavus* ở nồng độ 1000 ppm (Ashok *et al.*, 2011). Ngoài ra, nồng độ tinh dầu cần thiết để ức chế sự sản sinh độc tố thấp hơn 50% so với nồng độ cần thiết để hoàn toàn ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm (Ashok *et al.*, 2011). Kết thu được từ khảo sát cho thấy vai trò của các chất nhũ hóa lên hiệu quả kháng nấm của tinh dầu (Hình 1, 2, 3 và 4).

## KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát thu được cho thấy, các tinh dầu bạc hà, húng quế và trà đều cho thấy khả năng ức chế *A. niger* hiệu quả với đường kính vòng kháng nấm đạt được từ 4,33 mm đến 27 mm và khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm đạt từ 7,22% đến 29,44% ở nồng độ tinh dầu 200 ppm. Tinh dầu trà cho thấy hiệu quả ức chế thấp nhất so với hai loại tinh dầu còn lại. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, các chất nhũ hóa có vai trò quan trọng, giúp nâng cao hiệu quả kháng nấm của tinh dầu. Điều này cho thấy hiệu quả kháng nấm mốc phụ thuộc vào loại tinh dầu và chất nhũ hóa. Tween 80 cho thấy là chất nhũ hóa hiệu quả đối với ba loại tinh dầu trong khảo sát. Việc lựa chọn loại tinh dầu và chất nhũ hóa giúp tạo ra thành phần kháng nấm hiệu quả cho việc ứng dụng trong bảo quản nông sản theo hướng bền vững và an toàn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashok K, Ravindra S, Priyanka S, Bhanu P, Nawal KD (2011). Chemical composition of *Ocimum basilicum* L. essential oil and its efficacy as a preservative against fungal and aflatoxin contamination of dry fruits. *Int J Food Sci Technol* 46: 1840–1846
- Boubaker H, Karim H, El Hamdaoui. A, Msanda F, Leach D, Bombarda I, Vanloot P, Abbad A, Boudyach E H, Ait Ben Aoumar (2016). Chemical characterization and antifungal activities of four Thymus species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Ind Crop Prod* 86: 95–101.

- Combrinck S, Regnier T, and Kamatou GT (2011). In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*. 33(2): p. 344-349.
- Dharini S, Silvia BB (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Prot* 64: 27-37.
- El-Baroty GS, Abd El-Baky HH, Farag RS, & Saleh MA (2010). Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African journal of biochemistry research*, 4(6), 167-174.
- Gorjian H, Mihankhah P and Khaligh NG (2022). Influence of tween nature and type on physicochemical properties and stability of spearmint essential oil (*Mentha spicata* L.) stabilized with basil seed mucilage nanoemulsion. *J Mol Liq* 359: p. 119379.
- Lieu MD, & Dang TKT (2021). Improvement of shelf-life of mangoes by chitosan coating enriched with cinnamon oil dissolved in Tween 80 combined with ethanol. *Food Bioscience*, 44, 101341.
- Morten Hyltdgaard, Tina Mygind and Rikke Louise Meyer., (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interaction with food matrix components. *Frontiers in microbiology* 3, 11-24.
- Muhammad I, Tahira R, Javed A, Jamal A, Raja MU, Munir A, & Ur-Rehman A (2017). Lemongrass essential oil as an alternate approach to manage seed associated fungi of wheat and rice. *Int J Agric Biol*, 19, 1301-1306.
- Sukatta U, Haruthaithanasan V, Chantarapanont W, Dilokkunanant U, & Suppakul P (2008). Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape in vitro. *Agriculture and Natural Resources*, 42(5), 169-174.
- Verica Aleksic, Petar Knezevic., (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169 240– 254.
- Zhang W, Mou Z, Wang Y, Chen Y, Yang E, Guo F, ... & Wang W (2019). Molybdenum disulfide nanosheets loaded with chitosan and silver nanoparticles effective antifungal activities: in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 486-497.

## EVALUATION OF THE *Aspergillus niger* INHIBITION ABILITY OF PEPPERMINT, BASIL, AND CAJUPUT ESSENTIAL OILS IN DIFFERENT EMULSIFIERS

Lieu My Dong<sup>1,3,4\*</sup>, Nguyen Thi Thanh Binh<sup>1</sup>, Phuong Thao Vy<sup>1</sup>, Nguyen Huu Hoa<sup>1</sup>, Huynh Ngoc Anh Thu<sup>1</sup>, Dang Thi Kim Thuy<sup>2</sup>, Nguyen Thuy Huong<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Technology, Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Plant Cell Technology, Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT), Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>4</sup>Vietnam National University Ho Chi Minh City (VNU-HCM), Ho Chi Minh City, Vietnam

### SUMMARY

This study aims to evaluate the effectiveness of peppermint, basil, and cajuput essential oils from Vietnam in inhibiting *Aspergillus niger*. The essential oil was diluted in Dimethylsulfoxide DMSO 1% (v/v) or Tween 80 1% (v/v) at different concentrations. Antifungal activity was evaluated using the agar plate diffusion method and mycelial growth inhibition (MGI%) value. The results show that the antifungal effect depends on the type of essential oil and emulsifier. In the emulsifier DMSO, the antifungal diameter was achieved from 4.33 to 18.66 mm, with the minimum inhibitory concentration achieved in all three essential oils being 50 µL/mL, while in the emulsifier Tween 80 is 6.66 to 27mm with the minimum inhibitory concentration in cajuput essential oil being 50 and 25 µL/mL in the other two essential oils. The ability to inhibit mycelial growth shows that emulsifiers significantly affect the inhibitory effect of the essential oils in the survey. Tween 80 was a good emulsifier for three essential oils, in which the inhibition of peppermint and basil essential oils at a concentration of 200 ppm reached 25% and 29.44%, respectively. With good emulsifying ability, Tween 80 shows potential for application in preserving agricultural products.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, emulsifier, antifungal, post-harvest, essential oil.

\* Author for correspondence: Tel: 0989961848; Email: donglm@huit.edu.vn or lmdong.sdh232@hcmut.edu.vn



## ẢNH HƯỞNG CỦA MALTODEXTRIN VÀ DỊCH LA HÁN QUẢ (*Siraitia grosvenorii*) TỚI KHẢ NĂNG SỐNG CỦA *Lactiplantibacillus plantarum* BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẤY PHUN

Hà Phạm Kim Tuyền<sup>1</sup>, Lưu Hoàng Diệu<sup>1</sup>, Ngô Đình Thị Kim Quyên<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Tường Vi<sup>1</sup>, Đặng Thị Kim Thúy<sup>2</sup>, Liêu Mỹ Đông<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun, nồng độ maltodextrin và dịch chiết la hán quả, đến khả năng sống của *Lactiplantibacillus plantarum*. Kết quả cho thấy, nhiệt độ sấy phun ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sống sót của tế bào *L. plantarum*. Cụ thể, sấy phun ở nhiệt độ 110°C giữ cho khả năng sống của các tế bào vi khuẩn cao hơn so với nhiệt độ 120°C và 130°C. Khi sấy ở nhiệt độ 110°C, nồng độ maltodextrin 15% và 20% cho hiệu quả vi bao tốt hơn so với nồng độ 10%. Ở khảo sát điều kiện dạ dày nhân tạo (SGF) và muối mật (SIF), các tế bào *L. plantarum* vi bao đã cho thấy hiệu quả sống sót vượt trội so với các tế bào tự do sau 2 giờ ủ ở SGF và 4 giờ ủ ở SIF. Đặc biệt, trong điều kiện SGF, phương pháp vi bao bằng sấy phun mang lại khả năng bảo vệ tế bào đáng kể so với các tế bào tự do. Việc thử nghiệm bổ sung dịch la hán quả cho thấy tiềm năng cao khi nâng cao hiệu quả bảo vệ khả năng sống của *L. plantarum* trong điều kiện sống khắc nghiệt của dịch tiêu hóa nhân tạo.

**Từ khóa:** Dạ dày nhân tạo (SGF), la hán quả, maltodextrin, muối mật (SIF), probiotic, sấy phun, vi bao.

### MỞ ĐẦU

Theo định nghĩa của Tổ chức y tế thế giới (FAO/WHO), probiotics là “những vi sinh vật còn sống khi bổ sung vào cơ thể một liều lượng thích hợp hệ vi khuẩn đường ruột sẽ mang lại lợi ích cho sức khỏe của vật chủ” (FAO/WHO, 2001). Để phát huy tác dụng về sức khỏe, các chủng vi khuẩn phải có khả năng tồn tại trong các điều kiện tiêu hóa khắc nghiệt như enzyme tiêu hóa (pepsin và trypsin), muối mật, và độ axit thấp (Arslan-Tontul & Esbar, 2017). Vi bao là một trong những phương pháp được sử dụng để tăng khả năng sống sót và phân phối probiotic (Mai *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2020). Trong quá trình sấy phun, dung dịch được phun ở tốc độ cao và tạo ra bột dạng hạt khô bằng cách phun khí nóng ở nhiệt độ cao (Arepally & Goswami, 2019). Trong kỹ thuật vi bao, vật liệu vi bao đóng vai trò quan trọng trong việc bao bọc và bảo vệ các tế bào vi khuẩn. Maltodextrin là thành phần thủy phân tinh bột được sản xuất thông qua quá trình thủy phân một phần tinh bột bằng phương pháp acid và enzyme, maltodextrin thường phổ biến trong chế biến thực phẩm vì tính kinh tế, bổ dưỡng, khả năng hòa tan cao trong nước và có tác dụng bảo vệ hương vị chống lại quá trình oxy hóa (Mohammed *et al.*, 2020). Về khả năng bảo vệ vi khuẩn, maltodextrin cũng được nhiều nghiên cứu đánh giá cao (Arslan *et al.*, 2015; Bhagwat *et al.*, 2020). La hán quả (*Siraitia grosvenorii*) được sử dụng thuốc trong hai thế kỷ qua để chữa ho khan, đau họng, bên cạnh đó, chúng còn được sử dụng như một chất tạo ngọt tự nhiên có lượng calo thấp và độ ngọt cao hơn gấp 200-350 lần so với sucrose và có thể đóng vai trò như một prebiotic (Abdel-Hamid *et al.*, 2020). Trong nghiên cứu này, chúng vi khuẩn *L. plantarum* được vi bao bởi vật liệu vi bao maltodextrin bằng phương pháp sấy phun kết hợp cùng dịch chiết la hán quả. Kết quả nghiên cứu được ghi nhận dựa trên khảo sát về nhiệt độ sấy và nồng độ vật liệu vi bao phù hợp nhằm đánh giá hiệu quả vi bao và khả năng chống chọi của vi khuẩn trong các điều kiện bất lợi ở đường tiêu hóa như dịch dạ dày nhân tạo (SGF) và dịch mật nhân tạo (SIF). Mục đích của nghiên cứu nhằm tổng kết quy trình sấy phun hiệu quả tạo ra các chế phẩm sinh học khô với hoạt tính và duy trì khả năng sống sót cao.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Nguyên liệu

#### Chủng vi sinh vật

*Lactiplantibacillus plantarum* được cung cấp từ bộ sưu tập giống của Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công Thương Tp.HCM. *L. plantarum* được hoạt hóa trên môi trường MRS agar và được nhân giống trên môi trường MRS lỏng trong 24 giờ ở 37°C. Sinh khối được thu nhận bằng cách ly tâm 5000 rpm trong 20 phút, loại bỏ

phần dịch môi trường phía trên và rửa 2 lần bằng nước muối sinh lý vô trùng, sau đó được sử dụng trong quá trình vi bao cho các bước tiếp theo.

#### **Vật liệu vi bao**

Dung dịch Maltodextrin (Roquette, Pháp) được chuẩn bị theo mô tả của Arslan và đồng tác giả (2015) với vài thay đổi (Arslan *et al.*, 2015) như sau: dung dịch Maltodextrin 10% được chuẩn bị với nước cất và được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch Maltodextrin sau đó được hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút để tiêu diệt vi sinh vật. Hỗn hợp sau đó được để nguội ở nhiệt độ phòng để bổ sung probiotic.

Dịch chiết la hán quả được chuẩn bị theo mô tả của Liu và đồng tác giả (2011) với vài thay đổi (Liu *et al.*, 2011) như sau: La hán quả dạng bột sử dụng 1g ngâm trong 35ml nước cất sau đó trích ly ở 60°C trong 3 giờ. Dịch chiết được bổ sung vào dung dịch maltodextrin hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, sau đó để nguội và bổ sung probiotic.

#### **Phương pháp**

##### **Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

Quá trình vi bao *L. plantarum* bằng kỹ thuật sấy phun được thực hiện theo mô tả của Arslan và đồng tác giả (2015) với vài thay đổi được tóm tắt như sau (Arslan *et al.*, 2015): Hỗn hợp bao gồm sinh khối *L. plantarum* và Maltodextrin 10% (w/v) (Roquette, Pháp) được tiến hành sấy phun (SD06AG, Labplant, UK) với các nhiệt độ đầu vào khác nhau là 110°C, 120°C và 130°C, nhằm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đầu vào đến hiệu suất vi bao.

##### **Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ vật liệu vi bao đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

Quá trình vi bao *L. plantarum* bằng kỹ thuật sấy phun được thực hiện theo mô tả của Arslan và đồng tác giả (2015) với vài thay đổi được tóm tắt như sau (Arslan *et al.*, 2015): Hỗn hợp bao gồm sinh khối *L. plantarum* và Maltodextrin (Roquette, Pháp) ở các nồng độ 10%, 15% và 20% (w/v) được tiến hành sấy phun (SD06AG, Labplant, UK) với áp suất là 2ATM, tốc độ dòng là 9mL/min và nhiệt độ đầu vào là nhiệt độ thích hợp từ kết quả khảo sát trước đó.

##### **Đánh giá ảnh hưởng của dịch la hán quả đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

Quá trình vi bao *L. plantarum* bằng kỹ thuật sấy phun được thực hiện theo mô tả của Arslan và đồng tác giả (2015) với vài thay đổi được tóm tắt như sau (Arslan *et al.*, 2015): Hỗn hợp bao gồm sinh khối *L. plantarum* và Maltodextrin (Roquette, Pháp) ở nồng độ thích hợp được của kết quả khảo sát trước, cùng với dịch la hán quả 10% (v/v) được tiến hành sấy phun (SD06AG, Labplant, UK) với áp suất là 2ATM, tốc độ dòng là 9mL/min và nhiệt độ đầu vào là nhiệt độ thích hợp từ kết quả khảo sát trước.

##### **Đánh giá hiệu suất vi bao *L. plantarum***

Hiệu suất vi bao được thực hiện theo mô tả của Bhagwat và đồng tác giả (2020) với vài thay đổi được tóm tắt như sau (Bhagwat *et al.*, 2020): Hiệu suất vi bao được đánh giá bằng phương pháp đếm đĩa. Trong đó, 1 g bột sấy phun được hòa tan trong 9 mL nước muối sinh lý vô trùng và lắc đều bằng máy lắc vortex để thu được huyền phù đồng nhất. Hiệu suất vi bao được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất vi bao (\%)} = \frac{N}{N_0} \times 100$$

Xác định mật độ probiotic (N, N<sub>0</sub>) gián tiếp thông qua phương pháp trải đĩa. Trong đó, N<sub>0</sub> là số lượng vi khuẩn sống (Log CFU/mL) trước khi sấy và N là số lượng vi khuẩn sống (Log CFU/mL) sau khi sấy.

##### **Đánh giá khả năng sống sót của vi bao *L. plantarum* trong điều kiện muối mật và dạ dày nhân tạo**

Khả năng tồn tại của *L. plantarum* tự do, vi bao sử dụng chất mang maltodextrin và vi bao sử dụng chất mang maltodextrin kết hợp dịch chiết la hán quả (*Siraitia grosvenorii*) trong điều kiện đường tiêu hóa mô phỏng được mô tả theo phương pháp của Arslan-Tontul & Esbar (2017) với vài thay đổi được tóm tắt như sau (Arslan-Tontul & Esbar, 2017): 1 g mẫu được ủ trong 9 mL dịch dạ dày nhân tạo (SGF) (bao gồm 9 g/L NaCl + 3 g/l pepsin điều chỉnh đến pH 2,5 bằng HCl 5M) hoặc 9 mL môi trường muối mật nhân tạo (SIF) (bao gồm 9 g/L NaCl + 3 mL/L muối mật điều chỉnh đến pH 7 bằng NaOH 5M). Tỷ lệ sống sót của chế phẩm vi bao *L. plantarum* được đánh giá sau 2 giờ ủ trong SGF hoặc 4 giờ ủ trong SIF. Các mẫu chứa *L. plantarum* tự do được dùng để làm đối chứng. Lượng tế bào *L. plantarum* sống sót trong chế phẩm vi bao được xác định bằng phương pháp trải đĩa trên môi trường thạch MRS ủ ở 37 °C trong 72 giờ, tiến hành lặp lại 3 lần.

Kết quả được biểu diễn dưới dạng Log CFU.

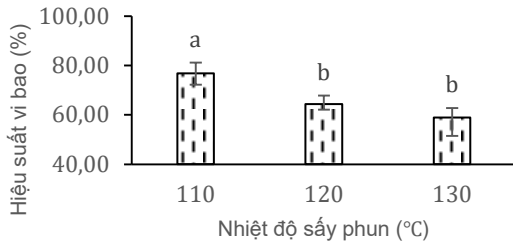
#### **Phân tích thống kê**

Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn. Tất cả các tính toán thống kê được thực hiện bằng phần mềm thống kê IMB SSPS Statistics 22. Phân tích phương sai và thử nghiệm HSD của Tukey được sử dụng để kiểm tra sự khác biệt giữa các nhóm.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

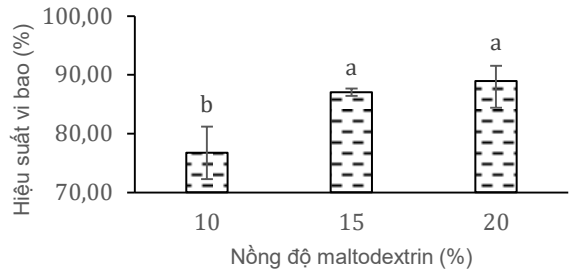
**Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun đến hiệu suất vi bao *L. plantarum* được thể hiện ở Hình 1. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở nhiệt độ 110°C cho hiệu suất vi bao 76,75%, ở nhiệt độ đầu vào 120°C cho hiệu suất vi bao 64,39% và ở nhiệt độ đầu vào 130°C ghi nhận hiệu suất vi bao 58,83%. Hiệu suất vi bao bị ảnh hưởng và thay đổi khác nhau theo nhiệt độ đầu vào, cụ thể ở nhiệt độ 110°C cho hiệu suất cao hơn ở nhiệt độ 120°C và 130°C là 12,36% và 17,92% có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa ( $p < 0,05$ ).



**Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

<sup>ab</sup> là các kí tự thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) giữa các mẫu.



**Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ vật liệu vi bao đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

<sup>ab</sup> là các kí tự thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) giữa các mẫu.

Nhiệt độ đầu vào của quá trình sấy phun có ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào (Arslan *et al.*, 2015). Nghiên cứu của Kartheek Anekella & Orsat(2013) đã thực hiện nghiên cứu sấy phun ở các mức nhiệt độ là 100°C, 115°C và 130°C cũng đưa ra nhận định rằng nhiệt độ đầu vào có ảnh hưởng sâu sắc đến % tỷ lệ sống sót trong quá trình sấy phun (Anekella & Orsat, 2013). Kết quả Anekella & Orsat (2013) cho thấy tỷ lệ sống sót giảm xuống gần 55% (từ 9,5 đến 5 log CFU/mL) khi nhiệt độ đầu vào tăng lên 130°C. Tiếp đó, Suryabhan và đồng tác giả (2019) đã thực hiện khảo sát nhiệt độ đầu vào của quá trình sấy phun gồm ba mức nhiệt độ là 100°C, 110°C và 120°C, tại 100°C khả năng sống của tế bào là cao nhất, tuy nhiên hiệu suất thu hồi bột lại thấp, do đó, mức nhiệt độ đầu vào 110°C tác giả đã lựa chọn để thực hiện các bước tiếp theo của quá trình vi bao (Suryabhan *et al.*, 2019). Kết quả nghiên cứu cho thấy ở cùng nồng độ vật liệu vi bao nhiệt độ đầu vào càng cao mật độ tế bào sống càng giảm làm giảm hiệu suất vi bao và ngược lại. Kết quả này phù hợp với phần lớn các nghiên cứu được thực hiện với vi sinh vật và chứng minh rằng sự gia tăng nhiệt độ sẽ làm giảm khả năng sống sót của vi khuẩn do sự tác động của nhiệt.

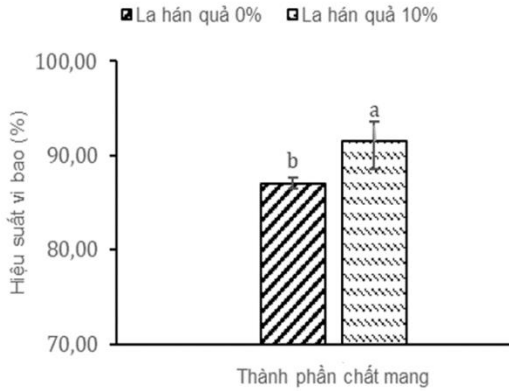
**Ảnh hưởng của nồng độ vật liệu vi bao đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin được khảo sát ở nồng độ 10%, 15% và 20% đến hiệu suất vi bao *L. plantarum* được thể hiện ở Hình 2. Kết quả nghiên cứu ghi nhận được ở nồng độ chất mang maltodextrin 10% hiệu suất vi bao đạt 76,75%, đối với nồng độ chất mang maltodextrin 15% hiệu suất vi bao đạt 87,02% và đối với nồng độ chất mang maltodextrin 20% hiệu suất vi bao là 88,93%. Dựa vào kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất vi bao tỉ lệ với nồng độ chất mang, hiệu suất vi bao *L. plantarum* tăng khi nồng độ chất mang maltodextrin tăng.

Khi có mặt vật liệu sự phá vỡ màng tế bào có thể được ngăn chặn trong quá trình sấy khô dẫn đến tăng hiệu quả đóng gói (Arepally & Goswami, 2019). Nghiên cứu của Suryabhan và đồng tác giả (2019) cho kết quả mật độ của tế bào khi được vi bao bằng maltodextrin 15% dao động từ 8,98-9,60 log CFU/g (Suryabhan *et al.*, 2019). Maltodextrin 20% được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun, mật độ tế bào khi được vi bao bằng maltodextrin 20% dao động từ 7,30-7,74 log CFU/g (Arepally & Goswami, 2019). Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ chất mang maltodextrin 15% và 20% cho hiệu suất vi bao không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê, xét đến khía cạnh kinh tế, maltodextrin 15% được lựa chọn sử dụng để thực hiện trong quy trình bao gói nhằm đánh giá khả năng bảo vệ đến *L. plantarum* trong các điều kiện khắc nghiệt.

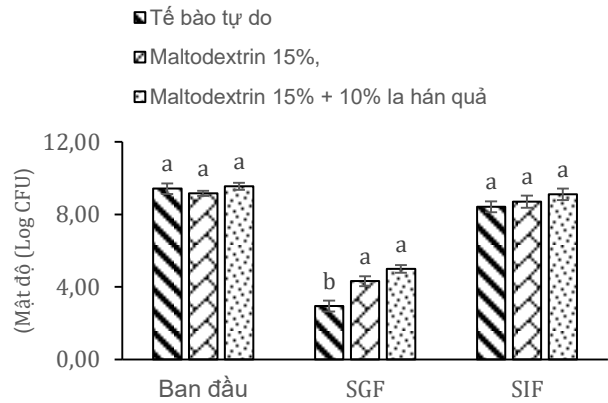
**Ảnh hưởng của dịch la hán quả đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

Ảnh hưởng của dịch la hán quả đến hiệu suất vi bao *L. plantarum* được thể hiện ở Hình 3. Kết quả nghiên cứu ghi nhận khi bổ sung dịch la hán quả đã làm tăng hiệu suất vi bao *L. plantarum* đáng kể ( $p < 0,05$ ). Dựa vào kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất vi bao vi bao *L. plantarum* khi không bổ sung dịch la hán quả là 87,02% và tăng lên 91,52% khi bổ sung 10% dịch la hán quả.



**Hình 3. Ảnh hưởng của dịch la hán quả đến hiệu suất vi bao *L. plantarum***

<sup>ab</sup> là các kí tự thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) giữa các mẫu.



**Hình 4. Khả năng sống sót của vi bao *L. plantarum* trong điều kiện dạ dày nhân tạo (SGF) và muối mật (SIF)**

<sup>ab</sup> là các kí tự thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) giữa các mẫu ở cùng điều kiện.

Dịch la hán quả giúp tăng cường khả năng sống của các tế bào lợi khuẩn nhờ vào thành phần saccharide thay thế các phân tử nước trong quá trình sấy phun như nhận định trong bài báo của tác giả Abdel-Hamid và đồng tác giả (2020) (Abdel-Hamid *et al.*, 2020). Trong quá trình sấy khô, các saccharide có thể thay thế các phân tử nước và tạo thành liên kết hydro với protein, đồng thời ngăn ngừa sự biến tính của protein trong hệ thống tế bào. Việc bổ sung dịch la hán quả đã cung cấp khả năng bảo vệ các tế bào trong điều kiện sấy phun đáng kể.

**Đánh giá khả năng sống sót của vi bao *L. plantarum* trong điều kiện dạ dày nhân tạo (SGF) và muối mật (SIF)**

Khả năng sống sót của *L. plantarum* trong môi trường dạ dày nhân tạo (SGF) và môi trường muối mật nhân tạo (SIF) được thể hiện ở Hình 4. Kết quả cho thấy, các tế bào tự do của *L. plantarum* bị ảnh hưởng đáng kể trong điều kiện SGF sau 2 giờ ủ, với số lượng tế bào giảm từ 9,42 log CFU xuống còn 2,96 log CFU. Tương tự, trong điều kiện SIF, sau 4 giờ ủ, số lượng tế bào giảm còn 8,43 log CFU. Ngoài ra, kết quả còn cho thấy mật độ tế bào của *L. plantarum* được bao gói cải thiện đáng kể so với tế bào tự do, đạt trên 4 log CFU sau 2 giờ ủ trong SGF và trên 8 log CFU sau 4 giờ ủ trong SIF. Đặc biệt, khi bổ sung dịch la hán quả, mật độ tế bào sau 2 giờ ủ trong SGF và 4 giờ ủ trong SIF lần lượt đạt 4,99 log CFU và 9,11 log CFU.

Đánh giá khả năng sống sót trong môi trường dạ dày (SGF) và môi trường muối mật (SIF) là một yếu tố quan trọng để đánh giá được hiệu quả của probiotic trong cơ thể. Theo kết quả nghiên cứu khác của Hoh Sin Jin và đồng tác giả (2020), sau khi ủ SGF trong 1,5 và 3 giờ, số lượng tế bào sống sót của các tế bào tự do giảm đáng kể ( $p < 0,05$ ) từ 9,34 Log CFU/g xuống còn 4,84 và 3,57 Log CFU/g, số lượng các tế bào được bao gói đạt trên 6 Log CFU/g (Jin *et al.*, 2020). Nghiên cứu của Muhammad và đồng tác giả (2021) đã chỉ ra rằng các hạt vi bao đã mang lại sự bảo vệ cho các tế bào vi khuẩn, cụ thể, sau 120 phút tiếp xúc với điều kiện tiêu hóa, các tế bào tự do giảm đi khoảng 3,5 log CFU/g, trong khi đó các tế bào được vi bao chỉ giảm từ 2,8 đến 2,1 log CFU/g tùy theo vật liệu vi bao (Muhammad *et al.*, 2021). Trong nghiên cứu của Abdel-Hamid và đồng tác giả (2020), dịch la hán quả được bổ sung vào sữa chua (Abdel-Hamid *et al.*, 2020). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, việc bổ sung dịch la hán quả đã làm tăng lên đáng kể về số lượng *Lactobacillus casei* và *Lactobacillus bulgaricus* có trong sữa chua. Tương tự, nghiên cứu của Ban và đồng tác giả (2020) cho thấy tính khả thi của việc sử dụng dịch chiết la hán quả như chất tạo ngọt để phát triển sữa chua có đường mà không cần thêm calo từ đường (Ban *et al.*, 2020). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng các tế bào được bao gói và bổ sung dịch chiết la hán quả có khả năng sống sót cao hơn khi chúng đối mặt với điều kiện dịch tiêu hóa mô phỏng. Cụ thể, các hạt vi bao bằng phương pháp sấy phun mang lại một mức độ bảo vệ cao hơn cho các tế bào probiotic, giúp tăng khả năng sống sót của chúng.

**KẾT LUẬN**

Kết quả của nghiên cứu cho thấy với các thông số tối ưu để đảm bảo hiệu suất vi bao *L. plantarum* và tỷ lệ sống tối đa trong điều kiện khắc nghiệt của hệ tiêu hóa là nhiệt độ không khí đầu vào 110°C và nồng độ maltodextrin 15%. Trong điều kiện khắc nghiệt của dịch tiêu hóa nhân tạo, nghiên cứu chỉ ra rằng các tế bào được vi bao có khả năng sống sót cao hơn so với các tế bào tự do. Việc kết hợp dịch la hán quả cùng chất mang maltodextrin đã chứng tỏ hiệu quả khi tăng khả năng sống sót của *L. plantarum*. Điều này mang lại tiềm năng ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm, nhằm tăng cường khả năng sống sót của probiotic trong điều kiện chế biến nhiệt và quá trình tiêu hóa.

**Lời cảm ơn:** Kết quả nghiên cứu này là một phần thuộc đề tài nghiên cứu khoa học được tài trợ bởi Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh (mã đề tài: 184/HĐ-DCT 2023).

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Abdel-Hamid M, Romeih E, Huang Z, Enomoto T, Huang L, & Li L (2020). Bioactive properties of probiotic set-yogurt supplemented with *Siraitia grosvenorii* fruit extract. *Food chemistry*, 303, 125400..
- Anekella K, & Orsat V (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT*, 50(1), 17-24.
- Arepally D, & Goswami TK (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT*, 99, 583-593..
- Arslan-Tontul S, & Erbas M (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *LWT*. 81, 160-169.
- Arslan S, Erbas M, Tontul I, & Topuz A (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldarii with different wall materials by spray drying. *LWT*. 63(1), 685-690.
- Ban Q, Liu Z, Yu C, Sun X, Jiang Y, Cheng J, & Guo M (2020). Physicochemical, rheological, microstructural, and antioxidant properties of yogurt using monk fruit extract as a sweetener. *Journal of dairy science*, 103(11), 10006-10014.
- Bhagwat A, Bhushette P, & Annature US (2020). Spray drying studies of probiotic *Enterococcus* strains encapsulated with whey protein and maltodextrin. *Beni-Suef university journal of basic and applied sciences*, 9, 1-8.
- FAO/WHO Experts' Report (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- Jin HS, Fei YS, Yan CK, Kuan CH, & Wei SWY (2020). Effect of gums coating materials on the survival of microencapsulated probiotics under simulated gastrointestinal conditions. *Materials Today: Proceedings*, 29, 16-19.
- Liu J, Rong L, Liu C, & Rong YH (2011). Optimization of extraction conditions of active constituents from *Siraitia grosvenorii*. *Advanced Materials Research*, 291, 2523-2528.
- Mai NTQ, My DTD, Vy LHY, Đông LM, & Linh ĐTM (2019). Nghiên cứu tạo bột lên men lactic từ thanh long ruột trắng (*Hylocereus undatus*). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 55(CĐ Công nghệ Sinh học), 218-225.
- Mohammed NK, Tan CP, Manap YA, Muhialdin BJ, & Hussin ASM (2020). Spray drying for the encapsulation of oils—A review. *Molecules*, 25(17), 3873.
- Muhammad Z, Ramzan R, Zhang R, & Zhang M (2021). Resistant starch-based edible coating composites for spray-dried microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*, comparative assessment of thermal protection, in vitro digestion and physicochemical characteristics. *Coatings*, 11(5), 587.
- Suryabhan P, Lohith K, & Anu-Appaiah KA (2019). Sucrose and sorbitol supplementation on maltodextrin encapsulation enhance the potential probiotic yeast survival by spray drying. *LWT*, 107, 243-248.

## EFFECT OF MALTODEXTRIN AND *Siraitia grosvenorii* EXTRACT ON THE VIABILITY OF *Lactiplantibacillus plantarum* BY SPRAY DRYING METHOD

Ha Pham Kim Tuyen<sup>1</sup>, Luu Hoang Dieu<sup>1</sup>, Ngo Dinh Thi Kim Quyen<sup>1</sup>,  
 Nguyen Thi Tuong Vi<sup>1</sup>, Dang Thi Kim Thuy<sup>2</sup>, Lieu My Dong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Technology, Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Plant Cell Technology, Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

**SUMMARY**

This study investigated the effects of spray drying temperature, maltodextrin concentration, and *Siraitia grosvenorii* extract on the viability of *Lactiplantibacillus plantarum*. The results showed that spray drying temperature significantly affected the viability of *L. plantarum* cells. Specifically, spray drying at 110°C maintained higher viability of probiotic cells than at 120°C and 130°C. Spray drying at 110°C, 15%, and 20% maltodextrin concentrations gave better microencapsulation efficiency than 10% concentration. In the simulated gastric (SGF) and intestinal juices (SIF) test, the microencapsulated *L. plantarum* viability was higher than free cells after 2 hours of incubation in SGF and 4 hours of incubation in SIF. In particular, under SGF conditions, the microencapsulation method of spray drying provides significant cell protection compared to free cells. The addition of *Siraitia grosvenorii* extract showed high potential in enhancing the *L. plantarum* viability under harsh living conditions of artificial digestive juice.

**Keywords:** Simulated gastric (SGF), maltodextrin, microencapsulation, intestinal juices (SIF), probiotic, *Siraitia grosvenorii*, spray drying.

\* Author for correspondence: Tel: 0989961848; Email: donglm@huit.edu.vn or lieudong289@gmail.com

# NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA XẠ KHUẨN ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ MẪU Bùn HỒ KHUÊ TRUNG, ĐÀ NẴNG

Đình Quốc Long<sup>1</sup>, Lê Văn Hân<sup>2</sup>, Huỳnh Ngọc Thành<sup>2</sup>,  
Đặng Thị Mỹ Hà<sup>2</sup>, Lê Hoàng<sup>3</sup>, Nguyễn Ngọc Hiếu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

<sup>3</sup>Trường Đại học Nam Cần Thơ

## TÓM TẮT

Xạ khuẩn là vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra nhiều loại kháng sinh được sử dụng trong y học và nông nghiệp hiện nay. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân lập các chủng xạ khuẩn từ mẫu bùn thu ở hồ Khuê Trung, Đà Nẵng. Sau đó, tiến hành thử hoạt tính kháng khuẩn, khảo sát môi trường tạo kháng sinh và định danh bằng phương pháp giải trình tự gen. Kết quả thu được 5 chủng xạ khuẩn (ĐN01, ĐN02, ĐN03, ĐN04 và ĐN05) từ mẫu bùn, hầu hết các chủng đều có khả năng kháng khuẩn tốt. Trong đó chủng ĐN01 có khả năng kháng tốt nhất 9 vi sinh vật kiểm nghiệm *Pseudomonas aeruginosa* kháng tetracycline (12,03 ± 2,11 mm), *Klebsiella pneumoniae* (15,83 ± 1,2 mm), *Candida albicans* (18,19 ± 0,99mm), *Escherichia coli* (15,73 ± 2,30 mm), *Enterococcus faecalis* (14,76 ± 1,33mm), *Staphylococcus aureus* (15,22 ± 1,16mm), *Shigella sonnei* (28,45 ± 3,31 mm), *Acinetobacter baumannii* (16,16 ± 0,76mm), *Salmonella typhimurium* (16,77 ± 1,57mm). Ở môi trường nuôi cấy CaCO<sub>3</sub> + NaCl + Peptone + bột đậu nành + tinh bột + cao nấm men, chủng ĐN01 sinh tổng hợp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp tốt nhất và có vòng kháng khuẩn lớn nhất với chủng *P. aeruginosa*. Chủng ĐN01 có sự tương đồng cao với chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* đến 98%. Kết luận, ĐN01 là chủng xạ khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong ngành công nghiệp dược, môi trường và nông nghiệp tương lai.

**Từ khóa:** Đà Nẵng, kháng khuẩn, kháng sinh, phân lập, xạ khuẩn.

## MỞ ĐẦU

Hiện nay do sự gia tăng các bệnh mới, số nhóm vi sinh vật kháng thuốc và độc tính của một số thuốc kháng sinh bán tổng hợp đang được sử dụng ngày càng tăng, các nhà khoa học đang hướng tới nghiên cứu và tìm kiếm các hợp chất có giá trị dược học từ các vi sinh vật của dược liệu, đất, biển... Trong những năm qua, số lượng lớn các hợp chất có hoạt tính sinh học được phát hiện từ các nguồn vi sinh vật. Đặc biệt, xạ khuẩn đang trở thành mục tiêu lớn đối với ngành công nghiệp sinh học để sản xuất các loại thuốc mới, các hoạt chất kháng khuẩn và chống ung thư (Dharmaraj *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2009).

Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã đưa ra cảnh báo tình trạng kháng thuốc kháng sinh trên thế giới ngày càng gia tăng và nguy hiểm như đại dịch COVID-19, thậm chí có nguy cơ đảo ngược những tiến bộ y học trong một thế kỷ qua. Mỗi năm, trên toàn cầu có khoảng 700.000 người tử vong vì kháng thuốc kháng sinh. Dự báo, đến năm 2050 con số này có thể tăng lên đến 10 triệu người nếu thế giới chưa có biện pháp phòng ngừa cụ thể. Ở Việt Nam, tỷ lệ kháng kháng sinh chiếm 40%, đứng thứ 4 về tỷ lệ kháng thuốc ở các nước tại châu Á - Thái Bình Dương (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>).

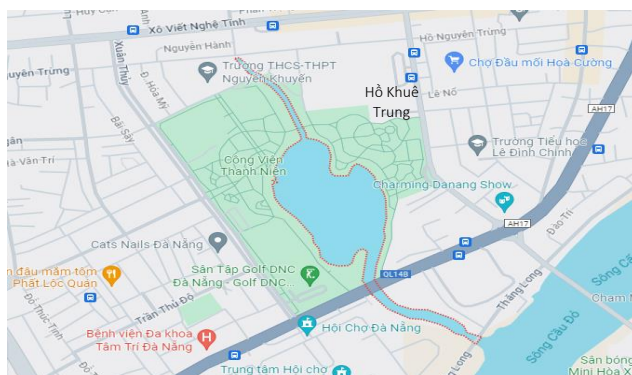
Xạ khuẩn là một trong những đối tượng được các nhà khoa học quan tâm hiện nay trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học (Abidin *et al.*, 2016). Trong 23.000 hợp chất có hoạt tính sinh học được phân lập từ vi sinh vật, hợp chất phân lập từ xạ khuẩn chiếm hơn 10.000 (Watve *et al.*, 2001). Trên thế giới hiện nay có hơn 8.000 kháng sinh được biết thì có hơn 80% trong số này có nguồn gốc từ xạ khuẩn (Watve *et al.*, 2001). Trong quá trình phát triển xạ khuẩn tiết ra nhiều chất có hoạt tính sinh học cao có khả năng kháng lại các loài vi sinh vật gây bệnh.

Việc nghiên cứu các kháng sinh mới đưa vào trong điều trị là rất cần thiết. Chính vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi đã tìm ra một chủng xạ khuẩn mới có khả năng kháng tốt các vi sinh vật gây bệnh làm cơ sở cho các nghiên cứu thu nhận hợp chất sinh học để hướng tới sản xuất dược phẩm trong tương lai.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Đối tượng nghiên cứu

Mẫu bùn được thu từ 5 khu vực khác nhau ở hồ Khuê Trung, Đà Nẵng.



Hình 1. Bản đồ hồ Khuê Trung, Đà Nẵng (Nguồn: google.com/maps)

### Phân lập xạ khuẩn

Lấy 0,1g mẫu bùn sau khi đồng nhất cho vào 100mL nước vô trùng, khuấy đều thu được dịch khuẩn. Dùng pipet hút 0.1 mL dịch khuẩn cho vào đĩa nuôi cấy chứa môi trường Gause 1 sau đó dùng que cấy trải đều dịch cấy trên môi trường và ủ ở nhiệt độ 28°C trong 7 ngày.

### Thử hoạt tính kháng khuẩn

Cấy các chủng xạ khuẩn lên môi trường sinh kháng sinh ( $\text{CaCO}_3 + \text{NaCl} + \text{Peptone} + \text{bột đậu nành} + \text{tinh bột} + \text{cao nấm men}$ ), đặt vào tủ ẩm 28°C chờ 7 ngày cho xạ khuẩn phát triển hoàn toàn trên mặt môi trường.

Chuẩn bị dịch huyền phù vi các sinh vật kiểm định (*Pseudomonas aeruginosa* kháng tetracycline, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium*) có nồng độ khoảng  $10^6$  CFU/mL, sau đó lấy 100  $\mu\text{L}$  dịch khuẩn trải lên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA) và để dịch khuẩn khô. Các chủng vi sinh vật được cung cấp bởi Bệnh viện Trung Ương Huế.

Dùng ống sắt vô trùng có đường kính trong 8 mm đục thành khối các xạ khuẩn ở môi trường sinh kháng sinh và đặt các khối thạch chứa xạ khuẩn lên bề mặt thạch đĩa nuôi vi sinh vật kiểm định. Sau đó cho vào tủ lạnh ở 4°C trong 24h, tiến hành ủ tủ ẩm 37°C trong 24h và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn.

### Định danh xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn được định danh ở mức phân tử bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA bằng cặp mồi 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGCTC -3' và 1495R: 5'-CTACACCTTGTACGCGACT -3' với chương trình PCR 96°C trong 1 phút, 30 chu kỳ tiếp theo (96°C trong 30 giây, 65°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây) và 72°C trong 10 phút (Jiang *et al.*, 2022). Sau đó tiến hành giải trình tự bằng máy Genetic analyzer 3500 của Hitachi được chạy bằng chương trình Rapid\_SEQ-POP 7. Kết quả giải trình tự được so sánh với ngân hàng gen 16S-rRNA của xạ khuẩn trên National Center for Biotechnology Information bằng công cụ BLASTN.

### Khảo sát các môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh chất kháng khuẩn

Chủng xạ khuẩn ĐN01 được nuôi cấy trên 10 loại môi trường khác nhau (các hóa chất pha môi trường của hãng Merck, Đức) ở điều kiện 28°C trong 4 ngày để xạ khuẩn sinh trưởng và sản xuất các hoạt chất. Sau đó tiến hành đánh giá khả năng kháng khuẩn của xạ khuẩn lên chủng *P. aeruginosa*.

- + M1: Bột đậu nành +  $\text{CaCO}_3 + \text{NaCl}$
- + M2:  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl} + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{cao nấm men}$
- + M3:  $\text{CaCO}_3 + \text{NaCl} + \text{Peptone} + \text{bột đậu nành} + \text{tinh bột} + \text{cao nấm men}$
- + M4: Glucose +  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KCl} + \text{KNO}_3 + \text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$
- + M5:  $\text{FeSO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KNO}_3 + \text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl} + \text{tinh bột}$
- + M6:  $\text{CaCO}_3 + \text{Glucose} + \text{NaCl} + \text{bột đậu nành}$
- + M7:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{CaCO}_3 + \text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O} + \text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{NaCl} + \text{Starch} + \text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$
- + M8: D-Mannitol + bột đậu nành
- + M9:  $\text{CaCO}_3 + \text{Glucose} + \text{tinh bột} + \text{Trace elements} + \text{cao nấm men}$
- + M10: Glucose +  $\text{CaCO}_3 + \text{NaCl} + \text{đậu nành}$

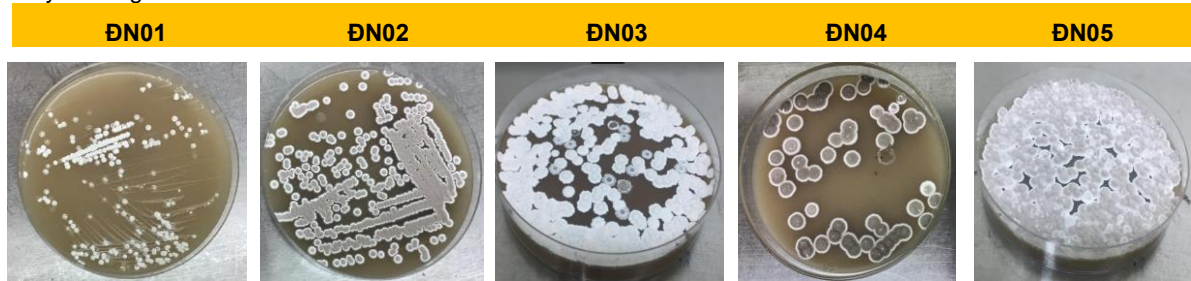
**Xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu thô được nhập vào phần mềm Excel và kết quả được xử lý bằng phần mềm SPSS 18.0 với mức ý nghĩa  $p < 0,05$ . Giá trị trung bình trong ba lần thí nghiệm được tính giá trị trung bình  $\pm$  SD.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phân lập và thuần khiết các chủng xạ khuẩn**

Từ mẫu bùn chúng tôi đã phân lập, làm thuần được 5 chủng xạ khuẩn khác nhau và đặt tên là ĐN01 cho đến ĐN05 (Hình 2). Các chủng đều có bề mặt nhung phần mịn viền răng cưa, đều hình thành và phát triển bào tử tối thiểu là sau 2 ngày. Màu sắc bào tử có những điểm khác nhau giữa 05 chủng và thời gian phát triển. Chúng tôi dựa trên bản màu của “the color harmony manual” để xác định màu sắc của bào tử. Chủng ĐN01 có bào tử màu trắng và không có sự thay đổi màu sắc trong quá trình phát triển. Đối với chủng ĐN02 trong khoảng hai ngày đầu có bào tử màu trắng sau đó chuyển sang màu xám 4. Trong khi đó, chủng ĐN03 có bào tử màu trắng qua ngày thứ ba có xuất hiện chuyển sang màu xám 8. Còn hai chủng ĐN 04 và ĐN05 có bào tử màu trắng sau 3 ngày chuyển sang màu xám 6.



Hình 2. Khảo sát hình thái của 5 chủng xạ khuẩn ĐN01-ĐN05

**Kết quả khảo sát phổ kháng khuẩn của xạ khuẩn**

Nhằm khảo sát sự đa dạng về hoạt tính kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành khảo sát phổ kháng khuẩn của 5 chủng xạ khuẩn với 09 chủng vi sinh vật kiểm định kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Từ kết quả của Bảng 1 các chủng xạ khuẩn phân lập từ mẫu bùn của hồ Khuê Trung, Đà Nẵng có khả năng kháng tốt các vi sinh vật kiểm định. Chủng xạ khuẩn ĐN01 có khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định với đường kính kháng từ 12,03 - 28,45mm. Trong khi đó, ở các chủng ĐN02, ĐN03, ĐN04 và ĐN05 có đường kính kháng lần lượt là 8,01 - 18,33mm, 6,16 - 20,45mm, 5,13 - 18,22mm và 7,03 - 19,21mm. Tất cả 4 chủng này đều có vòng kháng khuẩn nhỏ hơn so với chủng ĐN01, chủng ĐN 04 không có khả năng kháng hai vi sinh vật kiểm định là *P. aeruginosa* kháng tetracycline và *E. faecalis*, còn ở chủng ĐN 05 không có khả năng kháng chủng *C. albicans*.

Bảng 1. Kết quả khảo sát phổ kháng khuẩn của xạ khuẩn

Vi sinh vật kiểm định	Kích thước vòng kháng khuẩn (mm)				
	ĐN01	ĐN02	ĐN03	ĐN04	ĐN05
<i>P. aeruginosa</i> kháng tetracycline	12,03 <sup>c</sup> ± 2,11	8,01 <sup>b</sup> ± 2,01	12,03 <sup>c</sup> ± 1,21	-	7,03 <sup>a</sup> ± 1,39
<i>K. pneumoniae</i>	15,83 <sup>c</sup> ± 1,27	15,33 <sup>c</sup> ± 2,11	18,44 <sup>d</sup> ± 1,33	5,13 <sup>a</sup> ± 0,22	9,01 <sup>b</sup> ± 1,27
<i>C. albicans</i>	18,19 <sup>c</sup> ± 0,99	8,12 <sup>a</sup> ± 0,13	19,19 <sup>c</sup> ± 2,22	10,19 <sup>b</sup> ± 1,19	-
<i>E. coli</i>	15,73 <sup>d</sup> ± 2,30	17,73 <sup>e</sup> ± 1,40	10,01 <sup>c</sup> ± 2,70	6,73 <sup>a</sup> ± 1,20	8,78 <sup>b</sup> ± 1,31
<i>E. faecalis</i>	14,76 <sup>c</sup> ± 1,33	10,60 <sup>b</sup> ± 1,04	8,88 <sup>a</sup> ± 1,92	-	10,24 <sup>b</sup> ± 1,24
<i>S. aureus</i>	15,22 <sup>c</sup> ± 1,16	9,23 <sup>a</sup> ± 2,06	10,22 <sup>b</sup> ± 1,11	18,22 <sup>d</sup> ± 1,10	19,21 <sup>e</sup> ± 1,22
<i>S. sonnei</i>	28,45 <sup>d</sup> ± 3,31	18,83 <sup>bc</sup> ± 3,31	20,45 <sup>c</sup> ± 2,21	17,46 <sup>b</sup> ± 2,99	16,11 <sup>a</sup> ± 1,11
<i>A. baumannii</i>	16,16 <sup>b</sup> ± 0,76	16,10 <sup>b</sup> ± 1,72	6,16 <sup>a</sup> ± 1,43	17,77 <sup>c</sup> ± 2,77	18,22 <sup>c</sup> ± 0,76
<i>S. typhimurium</i>	16,77 <sup>c</sup> ± 1,57	11,03 <sup>b</sup> ± 1,53	7,77 <sup>a</sup> ± 1,77	16,03 <sup>c</sup> ± 2,66	7,66 <sup>a</sup> ± 1,45

Chủng ĐN01 tạo vòng kháng khuẩn với nhóm vi sinh vật kiểm định gram âm từ 15,83 - 28,45mm, ở nhóm vi khuẩn gram dương là 14,76 - 15,22mm. Bên cạnh đó, ĐN01 còn tạo vòng kháng khuẩn 18,19mm đối với vi nấm *C. albicans* và 12,03mm đối với *P. aeruginosa* kháng tetracycline. Từ các kết quả trên, cho thấy được ĐN01

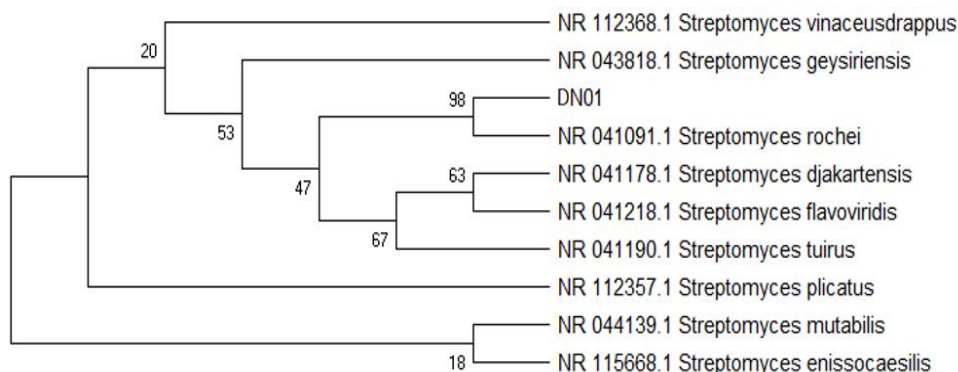


có phổ kháng khuẩn rộng với các vi khuẩn Gram (-), Gram(+), vi nấm *C. albicans* và *P. aeruginosa* kháng tetracycline.

Nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng cho thấy xạ khuẩn có khả năng kháng đối với nhiều vi sinh vật. Manikkam và đồng tác giả (2021) đã cho thấy chủng xạ khuẩn SACC-E6 có khả năng tạo vòng kháng lên đến 20 mm đối với *K. pneumoniae* kháng carbapenem (Manikkam *et al.*, 2021). Nhóm nghiên cứu của Kadaikunnan (2021) đã tìm thấy hợp chất thô được tách chiết từ xạ khuẩn làm ức chế *K. pneumoniae* với vòng kháng là 13mm (Kadaikunnan *et al.*, 2021). Nghiên cứu của Chu Thanh Bình (2024) cho thấy xạ khuẩn *Streptomyces Streptomyces* MIP\_GN36 kháng *C. albican* với đường kính 10,5mm (Chu Thanh Bình, 2024). Singh và đồng tác giả (2024) thực hiện chiết xuất kháng sinh gốc puromycin từ *S. albobacillans* (MS38) và thử hoạt tính với *C. albicans* và *S. aureus* với đường kính kháng lần lượt là 28 mm là 30 mm (Singh *et al.*, 2024). Mohamed và đồng tác giả (2019) đã phân lập được 58 chủng xạ khuẩn từ một nhà máy xử lý nước thải ở Tỉnh Al-Fayoum, Ai Cập và chủng xạ khuẩn WD5 có hoạt tính kháng phổ rộng đối với cả vi khuẩn gram âm và gram dương (Salah El-Din Mohamed, Zaki, 2019). Chaudhary và đồng tác giả (2013) đã tìm ra được xạ khuẩn AS16 có khả năng ức chế tốt *E. faecalis* với đường kính kháng 21mm (Chaudhary *et al.*, 2013), Kpoda và đồng tác giả (2024) cũng tìm ra chủng xạ khuẩn BW14 ức chế tốt *E. faecalis* (Kpoda *et al.*, 2024). Keshamo và đồng tác giả (2024) thực hiện phân lập đất ở Hawassa, miền Nam Ethiopia, nhóm nghiên cứu đã tìm thấy nhiều loại xạ khuẩn có khả năng tạo vòng kháng khuẩn là 29,2mm đối với *S. typhi* (Keshamo *et al.*, 2024). Nhóm nghiên cứu của do Nascimento Chaves (2024) đã cho thấy chủng *Streptomyces* PML5 phân lập từ đá Carbonate ở Amazon, có khả năng tạo vòng kháng khuẩn là 13mm đối với vi khuẩn *E. coli* và  $11,5 \pm 1,15$  mm đối với *A. baumannii* (do Nascimento Chaves *et al.*, 2024). Al-Ansari và đồng tác giả (2020) đã chỉ ra chủng *Streptomyces sp.* AS11 tạo vòng kháng đối với *S. typhi* là 16 mm (Al-Ansari *et al.*, 2020).

### Định danh chủng vi sinh vật

So sánh trình tự của dòng ĐN01 với trình tự các dòng xạ khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI và xây dựng cây phát sinh chủng loại cho thấy ĐN01 có sự tương đồng cao với chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* với tỷ lệ tương đồng đến 98% (Hình 3). Từ đó, có thể khẳng định ĐN01 là xạ khuẩn.



Hình 3. Giản đồ cây phát sinh chủng loại

### Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh chất kháng khuẩn

Chất kháng khuẩn từ xạ khuẩn thường do các nhóm gen sinh tổng hợp tạo ra. Khi ở những môi trường khác nhau thì nhóm gen này có biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát sự thay đổi 10 môi trường nuôi cấy đến khả năng kháng khuẩn của chủng ĐN01, kết quả thu được ở Bảng 2 và Hình 3.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy chủng xạ khuẩn ĐN01 không tạo ra chất kháng khuẩn trên môi trường M4, nhưng chúng vẫn sinh ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng *P. aeruginosa* trên các môi trường còn lại. Đặc biệt, trên môi trường M3 có khả năng sinh ra chất kháng khuẩn cao nhất tương ứng với vòng vô khuẩn đạt 18,34 mm. Có thể nói thành phần trong môi trường M3 là thành phần tối ưu cho sự sản sinh các hợp chất chuyển hóa thứ cấp của chủng ĐN01 tốt nhất trong nghiên cứu này. Từ kết quả này cho thấy các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh chất kháng khuẩn ở xạ khuẩn. Đây là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng, phát triển và sản sinh các hợp chất thứ cấp.

Bảng 2. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của 10 loại môi trường

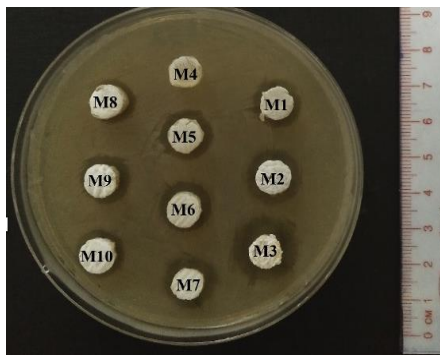
Vi sinh vật kiểm định *P. aeruginosa*

Môi trường	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
M1	15,02 <sup>d</sup> ± 2,23
M2	15,11 <sup>d</sup> ± 1,06

## CÔNG NGHỆ VI SINH, THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

M3	18,34 <sup>e</sup> ± 2,17
M4	-
M5	14,23 <sup>c</sup> ± 0,98
M6	13,17 <sup>b</sup> ± 3,30
M7	13,20 <sup>b</sup> ± 2,54
M8	12,18 <sup>a</sup> ± 1,09
M9	13,04 <sup>ab</sup> ± 1,33
M10	13,12 <sup>b</sup> ± 0,77

(-): Không có hoạt tính kháng khuẩn; các số nguyên biểu thị đường kính vòng vô khuẩn và được tính bằng mm.



Hình 4. Vòng kháng của chủng ĐN 01 được nuôi cấy trên 10 môi trường

### KẾT LUẬN

Từ mẫu bùn thu được ở hồ Khuê Trung, Đà Nẵng phân lập được 5 chủng xạ khuẩn ĐN01, ĐN02, ĐN03, ĐN04 và ĐN05. Chủng ĐN01 có khả năng kháng mạnh các chủng vi sinh vật kiểm nghiệm với đường kính kháng từ 12,03 - 28,45 mm. Môi trường nuôi cấy M3 là thành phần tối ưu cho tổng hợp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp của chủng ĐN01 tốt nhất trong nghiên cứu này. Chủng ĐN 01 có sự tương đồng cao với chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* với tỷ lệ bootstrap lên đến 98%.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Ansari M, Kalaiyarasi M, Almalki MA, Vijayaraghavan (2020), "Optimization of medium components for the production of antimicrobial and anticancer secondary metabolites from *Streptomyces* sp. AS11 isolated from the marine environment", *Journal of King Saud University-Science*, 32(3), tr. 1993-1998.
- Chu Thanh Bình (2024), "Hoạt tính đối kháng với vi sinh vật gây bệnh cho người của chủng xạ khuẩn streptomyces mip\_gn36 phân lập từ đất vùng rễ cây gừng", *Tạp chí Y học Quân sự* (369), tr. 6-6.
- Jiang Y, Zhang J, Huang X, Ma Z, Zhang Y, Bechthold A, Yu X (2022). Improvement of rimocidin production in *Streptomyces rimosus* M527 by reporter-guided mutation selection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(6), pp.1-30
- Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK; Gopalan N (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India), (in E). *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, vol. 4, no. 2, pp. 118-123.
- Dharmaraj S, Ashokkumar B, Dhevendaran K (2010). Isolation of marine *Streptomyces* and the evaluation of its bioactive potential. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no. 4, pp. 240-248.
- Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XS, Goodfellow M, Ruan JS (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine drugs*, vol. 7, no. 1, pp. 24-44.
- Kadaikunnan S, Alharbi NS, Khaled JM, Alobaidi AS, Rajivgandhi GN, Ramachandran G, Gnanasekaran C, Chelliah CK, Alanzi KF, Manoharan N (2021). Partially purified actinomycetes compounds enhance the intracellular damages in multi-drug resistant *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, (in E). *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28, no. 11, pp. 6057-6062.
- Keshamo A, Agena A, Bedewi Z (2024). Isolation and Characterization of Antibiotic Producing Actinomycetes from Soils of Hawassa, Southern Ethiopia. *East African Journal of Biophysical and Computational Sciences*, 5(1), pp. 25-39.
- Kpoda DS, Tapsoba F, Cisse H, Ouedraogo S, Traore R, Traore I, Soubeiga AP, Nikiema M, Hien YE, Zongo C, Savadogo A (2024). Isolement d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes à partir de sols prélevés dans la ville de Ouagadougou, Burkina Faso, (in E). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, vol. 18, no. 1, pp. 206-223.
- Manikkam R, Ganesan V, Kaari M, Venugopal G, Arumugam S, Joseph J (2021). Antibacterial efficacy of *Streptomyces maritimus* SACC-E6 against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, (in E). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 11, no. 1, pp. 089-094.

do Nascimento Chaves KR, de Andrade França MLT, Mendes AL, Cardoso PP, Vasconcelos KBP, de Santana RCF, Lotufo LVC, de Sousa Ramos SF, Ferreira MJPFJP, Gabriel Padilla G, da Silva SKR (2024). Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Activities of the Streptomyces PML5 strain isolated from Carbonate rocks in the Amazon. *Research Square*, pp.1-20

Salah El-Din Mohamed W and Zaki D F A (2019). Evaluation of antagonistic actinomycetes isolates as biocontrol agents against wastewater-associated bacteria, (in E). *Water Science and Technology*, vol. 79, no. 12, pp. 2310-2317.

Singh N, Patil S, Shah Nawaz M, Rai V, Patil A, Tripathi CKM, Wen F, Dong S, Cai D (2024). Green extraction of puromycin-based antibiotics from *Streptomyces albobacillus* (MS38) for sustainable biopharmaceutical applications, (in E). *Frontiers in Chemistry*, vol. 11, p. 1326328.

Watte MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Archives of Microbiology*, vol. 176, pp. 386-390.

Abidin ZAZ, Malek NA, Zainuddin Z, Chowdhury AJK (2016). Selective isolation and antagonistic activity of actinomycetes from mangrove forest of Pahang, Malaysia. *Frontiers in Life Science*, vol. 9, no. 1, pp. 24-31, 2016.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

## ANTIBACTERIAL CAPACITY OF ANTIBACTERIAL ISOLATED FROM MUD SAMPLES OF KHUE TRUNG LAKE, DA NANG CITY

Dinh Quoc Long<sup>1</sup>, Le Van Han<sup>2</sup>, Huynh Ngoc Thanh<sup>2</sup>,  
Dang Thi My Ha<sup>2</sup>, Le Hoang<sup>3</sup>, Nguyen Ngoc Hieu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

<sup>2</sup>Duy Tan University

<sup>3</sup>Nam Can Tho University

### SUMMARY

Actinomycetes are important microorganisms that produce a variety of antibiotics used in medicine and agriculture. In this study, we isolated actinomycetes from mud in Khue Trung Lake, Da Nang city and conducted antibacterial activity tests, surveyed the antibiotic creation environment and identified. The results were obtained from 5 strains of actinomycetes (ĐN01, ĐN02, ĐN03, ĐN04 and ĐN05) from mud samples, the ĐN01 strain had good resistance to 9 microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* anti-tetracycline ( $12,03 \pm 2,11$ mm), *Klebsiella pneumoniae* ( $15,83 \pm 1,2$ mm), *Candida albicans* ( $18,19 \pm 0,99$  mm), *Escherichia coli* ( $15,73 \pm 2,30$  mm), *Enterococcus faecalis* ( $14,76 \pm 1,33$ mm), *Staphylococcus aureus* ( $15,22 \pm 1,16$ mm), *Shigella sonnei* ( $28,45 \pm 3,31$  mm), *Acinetobacter baumannii* ( $16,16 \pm 0,76$ mm), *Salmonella typhimurium* ( $16,77 \pm 1,57$ mm). In CaCO<sub>3</sub> + NaCl + Peptone + Soya flour + Starch + Yeast extract culture, the ĐN01 strain is the best synthesizer of biologically active. The ĐN 01 strain has a high similarity with the strain of *Streptomyces rochei* with a bootstrap rate of 98%. In conclusion, this is a microbial strain with the potential to apply pharmaceutical technology, environment and agriculture in the future.

**Keywords:** Da Nang, anti-bacterial, anti-biotic, isolation, actinomycetes.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0708020101; Email: ngochieu0707@gmail.com

