

## 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 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.

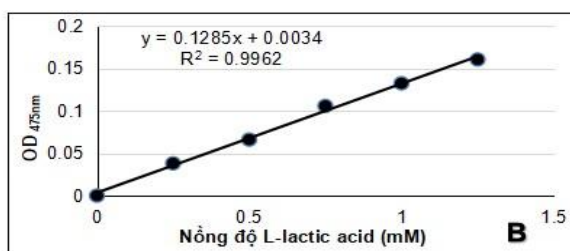
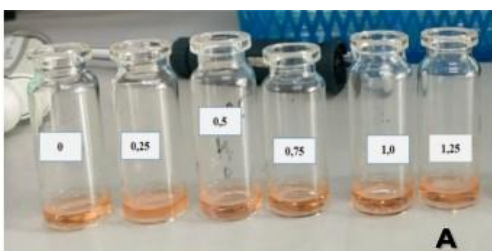
**Bảng 1. Hàm lượng lactic acid tổng số của các chủng vi khuẩn thuần khiết**

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)**

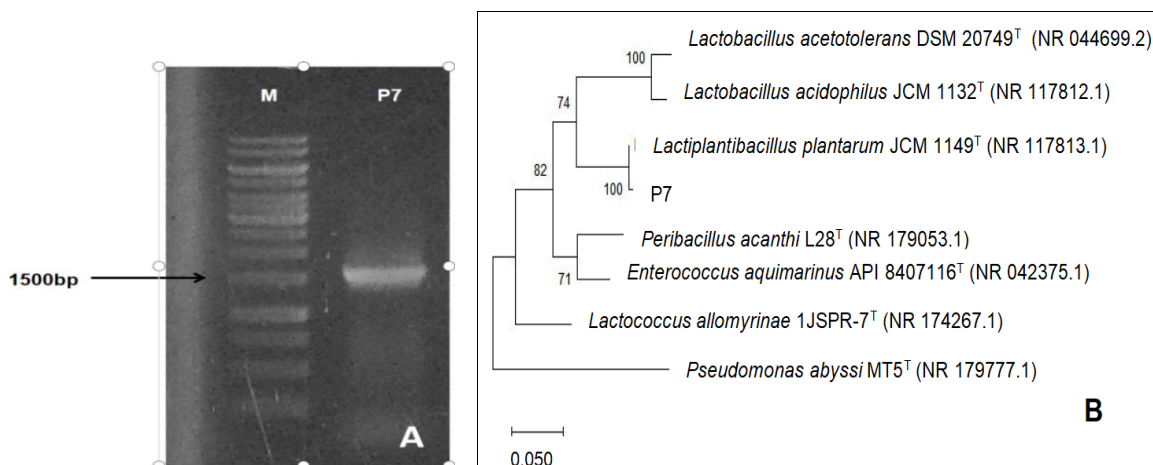
**Bảng 2. Hàm lượng L-lactic acid của các chủng vi khuẩn thuần khiết theo thời gian nuôi cấy**

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