

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 β -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).

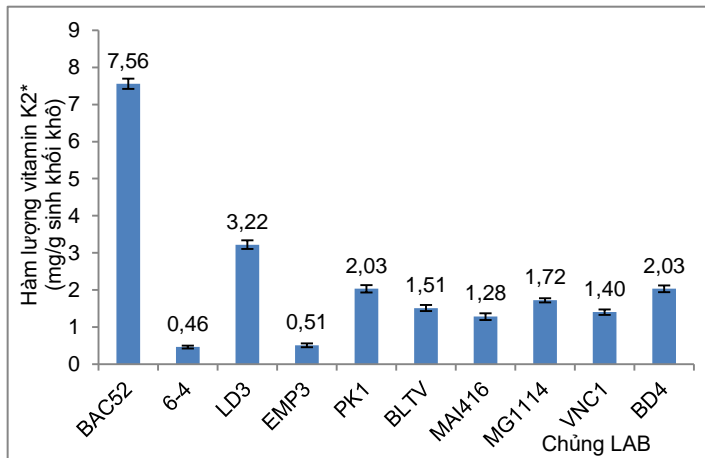
Phương pháp xác định khả năng gây tan huyết

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

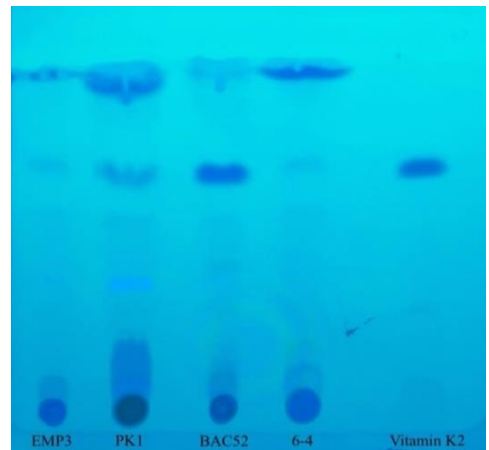
Khả năng sinh tổng hợp vitamin K2 ở các chủng vi khuẩn lactic

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).

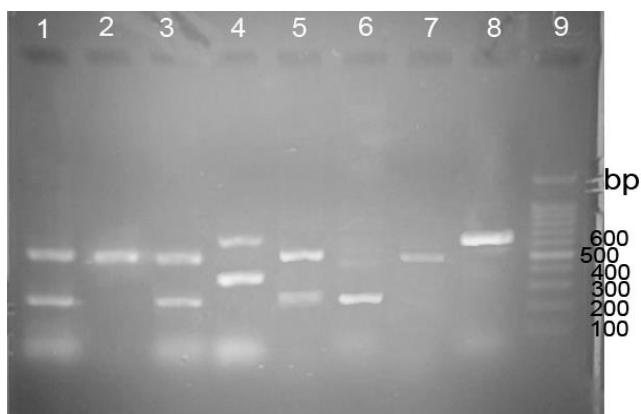
Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu và kiểu gen kháng kháng sinh ở các chủng LAB

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 β .

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- κ 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^{*}, 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 β -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 μ g/mL) in vegetable juices fermented by *Lb. fermentum* PK1 was significantly higher than that by strain LD3 (0.26 - 1.01 μ g/mL).

Keywords: Starter culture, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, vitamin K2.

^{*} Author for correspondence: Tel: 0904398264; Email: huongdt@firi.vn