

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**HOÀNG VĂN NGHĨA**

**PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT CỦA HOẠT  
CHẤT KHÁNG KHUẨN TỪ CHỦNG VI KHUẨN *Lactobacillus*  
TRONG NEM CHUA**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**HÀ NỘI - 2025**

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**HOÀNG VĂN NGHĨA**

**PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT  
CỦA HOẠT CHẤT KHÁNG KHUẨN TỪ CHỦNG VI KHUẨN  
*Lactobacillus* TRONG NEM CHUA**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

Mã số: 8420114

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

**TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'NSL', is written over the printed name of the supervisor.

**HÀ NỘI - 2025**

**LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

**Người làm luận văn**



**Hoàng Văn Nghĩa**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và nghiên cứu, ngoài sự nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ tận tình của các thầy, cô giáo, bạn bè và người thân. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh - người Thầy mẫu mực đã hết lòng dìu dắt, hướng dẫn tôi trên con đường học tập và nghiên cứu khoa học.

Tôi xin cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình học tập, để luận văn của tôi được hoàn thành.

Tôi xin cảm ơn Đảng ủy, Ban giám đốc, các khoa phòng, Bệnh viện Đa khoa Hồng Ngọc Phúc Trường Minh, các anh chị, em, các bạn đồng nghiệp đã tạo mọi điều kiện để tôi được học tập và hoàn thành chuyên ngành mình đã chọn.

Và những lời yêu thương nhất, tôi xin dành cho bố mẹ, gia đình, bạn bè, các anh chị, các em và những người đồng nghiệp đáng kính đã dành những tình cảm và đồng hành cùng tôi trải qua những điều tốt đẹp và cả những cung bậc thăng trầm trên suốt chặng đường này.

Hà Nội, tháng 3 năm 2025

**Người làm luận văn**



**Hoàng Văn Nghĩa**

## MỤC LỤC

<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>3</b>
1.1. TỔNG QUAN VỀ NEM CHUA VÀ CÁC VI SINH VẬT LÊN MEN TRONG NEM CHUA.....	3
1.1.1 Nem Chua.....	3
1.1.2. Các vi sinh vật trong Nem Chua .....	4
1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ BACTERIOCIN TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM.....	12
1.2.1. Các nghiên cứu về hoạt chất kháng khuẩn từ nhóm vi sinh vật lên men trên thế giới.....	12
1.2.2. Các nghiên cứu trong nước .....	14
1.2.3. Định danh vi sinh vật .....	16
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>18</b>
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	18
2.1.1. Mẫu nghiên cứu.....	18
2.1.2. Hoá chất, dụng cụ và thiết bị.....	18
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	19
2.2.1 Phân lập chủng vi khuẩn sinh hoạt tính kháng khuẩn từ nem chua .....	19
2.2.2 Đánh giá khả năng kháng khuẩn gây bệnh của chủng vi khuẩn có trong nem chua .....	20
2.2.3. Phương pháp sinh học phân tử trong định danh và phân tích vi khuẩn .....	21
2.2.4. Đánh giá và phân tích hợp chất kháng khuẩn .....	23
2.2.5. Tách chiết hoạt chất thứ cấp bằng dung môi phân cực .....	25
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>27</b>
3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn <i>Lactobacillus</i> từ các mẫu nem chua ở Việt Nam	27
3.1.1. Tạo bộ sưu tập các chủng vi khuẩn <i>Lactobacillus</i> từ các mẫu nem chua ở Việt Nam .....	27
3.1.2. Đánh giá hoạt tính kháng một số vi sinh vật gây bệnh .....	29
3.2. Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn .....	36
3.2.1. Khả năng chịu nhiệt và tính bền vững trước enzym phân giải protein của dịch chiết từ các chủng vi khuẩn.....	37
3.3. Tinh sạch sơ bộ và đánh giá một số tính chất của hoạt chất kháng khuẩn. ....	40
3.3.1. Phân tách sơ bộ Peptide có khả năng kháng khuẩn .....	40
3.3.2. Tách chiết hoạt chất thứ cấp bằng dung môi phân cực .....	42
3.3.3. Ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng khuẩn .....	46

<b>CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. KẾT LUẬN .....</b>	<b>48</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>49</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>58</b>

## DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
AMPs	Antimicrobial peptides	Các peptide kháng khuẩn
CFS	Cell free supernatant	Dịch nổi không chứa tế bào thu được sau ly tâm
EFSA	European Food Safety Authority	Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry	Sắc ký khí
GIT	Gastrointestinal Tract	Đường tiêu hóa
GRAS	Generally recognized as safe	Chứng nhận của FDA (Cục Quản lý Thực Phẩm và Dược Phẩm Hoa Kỳ)
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
LAB	Lactic acid bacteria	Nhóm vi khuẩn có khả năng lên men carbohydrate để tạo axit lactic
LB	Luria Bertani	Môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy vi khuẩn Gram âm
LPS	Lipopolysaccharide	Thành phần chính của màng ngoài vi khuẩn Gram âm
MRS	De Man Rogosa and Sharpe	Môi trường chọn lọc chuyên dụng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn lactic
OD	Optical density	Mật độ quang học
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng

**DANH MỤC BẢNG**

Bảng 3.1. Kí hiệu và hình thái các chủng phân lập từ các mẫu nem chua.....	27
Bảng 3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn được phân lập.....	30
Bảng 3.3 Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng NS1 so với các chủng trên ngân hàng gen .....	32
Bảng 3.4. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng SS3 so với các chủng trên ngân hàng gen .....	33
Bảng 3.5. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng PT2 so với các chủng trên ngân hàng gen .....	35
Bảng 3. 6. Khả năng tách kháng sinh của các hệ dung môi khác nhau trên TLC.....	42

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> dưới kính hiển vi điện tử .....	6
Hình 1.2: Hợp chất Plantacyclin B21AG được phân lập từ nem chua có khả năng tiêu diệt vi khuẩn có hại ( TLTK [54]).....	13
Hình 1.3: Cấu trúc protein của hợp chất này bền, khó bị phá vỡ.....	13
Hình 2.1: Nem chua Thanh Hóa .....	18
Hình 3.1. Khuẩn lạc một số chủng vi khuẩn từ mẫu nem chua theo bảng 3.1 .....	28
Hình 3.2. Hình thái vi khuẩn được đánh giá từ các khuẩn lạc.....	29
Hình 3.3. Điện di DNA tổng số (A); Sản phẩm PCR (B); Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng <i>Xho</i> I và <i>Xba</i> I (C). 1, 2, 3: chủng NS1, SS3, PT2: M: Marker. ....	31
Hình 3.4. Cây phân loại chủng NS1 và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng. ....	33
Hình 3.5. Cây phân loại chủng SS3 và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng NCBI. .	34
Hình 3.6 Cây phân loại chủng PT2 và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng NCBI...	35
Hình 3.7 Hoạt tính kháng khuẩn <i>S. aureus</i> của hợp chất sau khi xử lý nhiệt và proteinase K .....	37
Hình 3.8. Khả năng kháng khuẩn của <i>Lactobacillus plantarum</i> SS3 đối với hai chủng vi khuẩn. <i>E. coli</i> (A) và <i>Bacillus subtilis</i> (B).....	38
Hình 3.9. Sự biến đổi hoạt tính kháng khuẩn của chủng <i>Lactobacillus plantarum</i> SS3 đối với các vi khuẩn gây bệnh theo thời gian nuôi cấy. ....	39
Hình 3.10. Mối liên hệ giữa sự phát triển và khả năng tạo vùng kháng khuẩn tối ưu của chủng <i>Lactobacillus plantarum</i> SS3. ....	39
Hình 3.11. Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương <i>S. aureus</i> . Protein tổng số tương ứng 100-250-500-1000 $\mu$ g .....	40
Hình 3.12. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch protein tổng số trên <i>S. aureus</i> theo từng nồng độ.....	41
Hình 3.13. Kết quả TLC với các hệ dung môi khác nhau.....	42
Hình 3.14. Khả năng kháng khuẩn của các giá trị Rf .....	43
Hình 3.15. Hoạt tính kháng khuẩn của 30 phân đoạn.....	45
Hình 3.16. Phân tích các phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp TLC .....	45
Hình 3.17. Ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng khuẩn của hợp chất thứ cấp. ...	46

## MỞ ĐẦU

Nem chua là một loại thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam và là nguồn cung cấp dồi dào vi khuẩn axit lactic bao gồm *Lactobacillus* sp. Bên cạnh việc tăng chất lượng thực phẩm, quá trình trao đổi chất của các vi khuẩn này còn tạo ra các hợp chất kháng khuẩn, hỗ trợ cho việc bảo quản thực phẩm và ngăn ngừa các bệnh lây truyền qua thực phẩm.

Nghiên cứu về hợp chất kháng khuẩn từ nem chua đã thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các bacteriocin từ nem chua có hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ đối với một loạt các vi khuẩn gây bệnh, bao gồm cả các chủng vi khuẩn kháng thuốc. Điều này mở ra triển vọng lớn cho việc sử dụng các hợp chất kháng khuẩn từ nem chua trong ngành công nghiệp thực phẩm và y tế.

Trong ngành công nghiệp thực phẩm, các hợp chất kháng khuẩn từ nem chua có thể được sử dụng như các chất bảo quản tự nhiên. Điều này không chỉ giúp kéo dài thời gian bảo quản của thực phẩm mà còn giảm thiểu việc sử dụng các chất bảo quản hóa học, góp phần bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng. Các hợp chất kháng khuẩn này có thể được ứng dụng trong nhiều loại thực phẩm khác nhau, từ thịt, cá, đến sữa và các sản phẩm từ sữa.

Trong lĩnh vực y tế, các hợp chất kháng khuẩn từ nem chua có thể được khai thác để phát triển các liệu pháp kháng khuẩn mới. Sự gia tăng của các vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh là một vấn đề nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng. Các bacteriocin từ nem chua, với cơ chế hoạt động độc đáo và hiệu quả, có thể tiêu diệt các vi khuẩn kháng thuốc, mở ra cơ hội phát triển các thuốc kháng khuẩn mới. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng bacteriocin có thể tấn công các vi khuẩn mục tiêu thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm làm tổn thương màng tế bào, ức chế tổng hợp protein, và phá hủy DNA của vi khuẩn.

Sự an toàn và hiệu quả của các hợp chất kháng khuẩn từ nem chua cũng là một vấn đề quan trọng cần được đánh giá. Các thử nghiệm lâm sàng và tiền lâm sàng cần được thực hiện để đảm bảo rằng các bacteriocin không gây ra các phản ứng phụ có hại cho người tiêu dùng. Ngoài ra, việc tối ưu hóa quá trình sản xuất và tinh chế các hợp chất kháng khuẩn này cũng là một thách thức lớn đối với các nhà nghiên cứu.

Ứng dụng của các hợp chất kháng khuẩn từ nem chua không chỉ giới hạn trong lĩnh vực thực phẩm và y tế. Chúng còn có tiềm năng trong nhiều lĩnh vực khác như nông nghiệp, công nghiệp dược phẩm, và mỹ phẩm. Trong nông nghiệp, các bacteriocin có thể được sử dụng để kiểm soát các bệnh do vi khuẩn gây ra trên cây trồng và vật nuôi, giúp tăng năng suất và chất lượng sản phẩm nông nghiệp. Trong công nghiệp dược phẩm, các bacteriocin có thể được phát triển thành các sản phẩm chăm sóc sức khỏe, chẳng hạn như kem dưỡng da hoặc thuốc mỡ kháng khuẩn. Trong ngành mỹ phẩm, các hợp chất kháng khuẩn từ nem chua có thể được sử dụng để phát triển các sản phẩm làm sạch và bảo vệ da.

Vì vậy đề tài luận văn “**Phân lập, định danh và đánh giá tính chất của hoạt chất kháng khuẩn từ chủng *Lactobacillus* trong nem chua**” được thực hiện với các mục tiêu được đặt ra như sau:

- Phân lập và định danh được chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn từ trong nem chua.
- Tách chiết, tinh chế sơ bộ và đánh giá được hoạt tính kháng các loại vi khuẩn gây bệnh phổ biến như *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Các nội dung được xây dựng nhằm đáp ứng các mục tiêu nghiên cứu đã đề ra:

Nội dung 1: Phân lập chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sinh tổng hợp chất kháng khuẩn có trong nem chua và lựa chọn điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn đã phân lập được

Nội dung 2: Định danh chủng vi khuẩn *Lactobacillus* phân lập được bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

Nội dung 3: Tách chiết, tinh sạch sơ bộ và đánh giá một số tính chất của hoạt chất kháng các loại vi khuẩn gây bệnh từ chủng *Lactobacillus* thu được trong nem chua

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. TỔNG QUAN VỀ NEM CHUA VÀ CÁC VI SINH VẬT LÊN MEN TRONG NEM CHUA

#### 1.1.1 Nem Chua

Nem chua là một loại thực phẩm lên men lactic từ thịt, được người Việt Nam rất ưa chuộng. Hiện nay, nem chua được sản xuất rộng rãi trên cả nước, với mỗi vùng miền có hương vị đặc trưng riêng, phụ thuộc vào kinh nghiệm chế biến truyền thống. Một số địa phương nổi tiếng với nghề làm nem chua gồm:

- Miền Bắc: Nem Vẽ (Từ Liêm, Hà Nội), Nem Phủ Từ (Bắc Ninh),...
- Miền Trung: Nem chua Đông Ba (Huế), Nem chua Thanh Hóa, Nem chua Chợ Huyện (Bình Định),...
- Miền Nam: Nem Thủ Đức (Hồ Chí Minh), Lai Vung (Đồng Tháp),....

Mỗi loại nem chua không chỉ khác biệt về hương vị mà còn phản ánh đặc trưng ẩm thực và văn hóa của từng vùng miền.

Nem chua là một sản phẩm lên men lactic từ thịt sống, trong đó vi khuẩn lactic chuyển hóa đường thành acid lactic, tạo nên hương vị đặc trưng. Đây là một món đặc sản mang đậm hương vị quê hương. Do quá trình chín không qua xử lý nhiệt, nem chua giữ được phần lớn chất dinh dưỡng từ thịt, bao gồm vitamin và các axit amin hòa tan. Tuy nhiên, bên cạnh đó các cơ sở sản xuất nem chua đang là các hộ gia đình, sản xuất dựa trên kinh nghiệm. Do vậy việc đảm bảo vệ sinh và không mang các mầm bệnh truyền nhiễm là hết sức khó khăn. Bệnh truyền qua thực phẩm do ô nhiễm mầm bệnh là một mối quan tâm lớn trong ngành công nghiệp thực phẩm [1]. Các báo cáo ước tính rằng 4,1 triệu trường hợp viêm dạ dày ruột do thực phẩm xảy ra hàng năm, tiêu tốn khoảng 1,2 tỷ đô la mỗi năm. Việc phát hiện ra các chất kháng khuẩn góp phần vào an toàn thực phẩm sẽ có ý nghĩa kinh tế và xã hội ngày càng tăng và là một ưu tiên hàng đầu của ngành công nghiệp thực phẩm. Có những lo ngại về việc sử dụng hóa chất phụ gia thực phẩm và chất bảo quản [2], với nhu cầu về các phương pháp tiếp cận thay thế đối với an toàn thực phẩm, bao gồm các sản phẩm tự nhiên để kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm và các mầm bệnh truyền qua thực phẩm [3].

### 1.1.2. Các vi sinh vật trong Nem Chua

Vi khuẩn lactic (LAB) từ lâu đã được kết hợp với quá trình lên men thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, đặc biệt là môi trường nuôi khởi đầu trong sản xuất thịt lên men, rau, trái cây, đồ uống có cồn, các sản phẩm từ sữa và thức ăn ủ chua [4]. Chúng đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn làm hỏng thực phẩm cũng như ảnh hưởng có lợi đến các đặc tính dinh dưỡng, cảm quan và thời hạn sử dụng của các sản phẩm thực phẩm lên men [5]. Tác dụng bảo quản của LAB là do sản xuất các chất chống vi khuẩn, bao gồm axit hữu cơ, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocin và các chất kháng khuẩn giống bacteriocin. Trong số các thành phần kháng khuẩn này, vi khuẩn đã được chú ý đặc biệt trong những năm gần đây vì ứng dụng của chúng trong ngành công nghiệp thực phẩm như chất bảo quản tự nhiên và như các peptid kháng khuẩn tiềm năng hoặc các phân tử giống kháng sinh nhắm vào các mầm bệnh đa kháng thuốc [3].

Trong vài thập kỷ qua, nhiều vi khuẩn đã được xác định và nghiên cứu rộng rãi trong LAB [6]. Một số phương pháp đã được sử dụng để phân loại vi khuẩn. Ban đầu, Klaenhammer đề xuất phân loại vi khuẩn từ nhóm LAB dựa trên các đặc tính sinh hóa và di truyền [7]. Trong đó, vi khuẩn hình tròn được phân biệt với các nhóm vi khuẩn khác nhờ một quá trình biến đổi sau dịch mã đặc trưng, cụ thể là sự thất đầu N đến C thông qua liên kết amit [8].

Việc phân tích trình tự và phát sinh loài đã xác định hai họ riêng biệt của các bacteriocin dạng vòng: họ I và họ II. Bacteriocin dạng vòng thuộc họ I có xu hướng mang nhiều cation hơn, với điểm đẳng điện cao ( $pI > 9$ ), điển hình như các peptide enterocin AS-48, enterocin NKR-5-3B, carnocyclin A, cirarin A, garvicin ML, lactocyclin Q, leucocyclin Q, uberolysin, pumilarin và cerecyclin [3]. Ngược lại, bacteriocin dạng vòng thuộc họ II có xu hướng mang nhiều anion hơn, với điểm đẳng điện thấp ( $pI < 7$ ), tiêu biểu là acidocin B, butyriovibriocin AR10, gassericin A và plantaricyclin A [4]. Một trong những đặc điểm quan trọng của nhóm bacteriocin dạng vòng là cấu trúc ổn định của chúng, có được nhờ các biến đổi sau dịch mã (post-translational modifications). Những biến đổi này giúp bảo vệ peptide khỏi sự phân hủy bởi enzyme protease, đồng thời cải thiện hoạt tính kháng khuẩn và mở rộng phổ tác động của chúng [9]. Đặc biệt, enterocin AS-48, một bacteriocin dạng vòng được

sản xuất bởi *Enterococcus* spp., đã được chứng minh là có hiệu quả cao trong việc ức chế vi khuẩn gây hại. Bên cạnh đó, với khả năng chịu nhiệt tốt, bền vững trong nhiều điều kiện pH khác nhau và ổn định trong thời gian dài, AS-48 được xem là một giải pháp tiềm năng thay thế các chất bảo quản hóa học trong thực phẩm [10].

Ngoài AS-48, trong cấu trúc của bacteriocin dạng vòng còn mang lại những đặc tính độc đáo khác, bao gồm khả năng ổn định nhiệt cao, chống lại sự phân giải protein, cũng như duy trì hoạt tính sinh học trong thời gian dài. Những đặc điểm này khiến chúng trở thành đối tượng nghiên cứu đầy hứa hẹn cho các ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và các chế phẩm sinh học khác [11].

Một số *Lactiplantibacillus* / *Lactobacillus* spp. trước đây đã được phân lập từ xúc xích lên men, nem chua của Việt Nam [12]. Trong số các chủng phân lập này, *L. plantarum* B21 đã chứng minh một trong những hoạt động kháng khuẩn mạnh nhất chống lại một loạt các chủng vi khuẩn do sự kết hợp giữa sản xuất axit và bacteriocin [13]. Vi khuẩn lactic thuộc họ Lactobacillaceae, có đặc điểm sinh thái đa dạng nhưng sinh lý tương đối giống nhau. Chúng là vi khuẩn Gram dương, không tạo bào tử, không di động, hô hấp tùy tiện (có thể kỵ khí hoặc hiếu khí) và không chứa các enzyme hô hấp như cytochrome và catalase. Nguồn năng lượng của chúng đến từ quá trình phân giải hydrat carbon, tạo ra acid lactic, và sinh sản theo hình thức phân đôi tế bào.

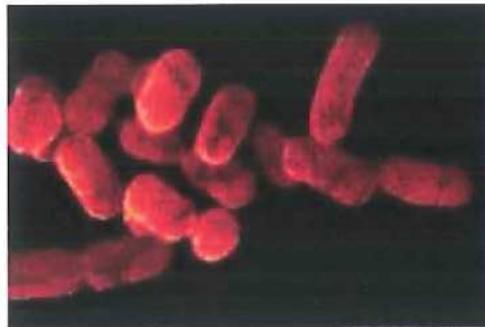
Nhóm vi khuẩn lactic bao gồm nhiều chi khác nhau như *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*. Ngày nay, người ta còn bổ sung thêm các chủng thuộc giống *Bifidobacterium* vào nhóm này do vai trò quan trọng của chúng trong thực phẩm lên men và hệ vi sinh đường ruột.

Trong sản xuất thực phẩm, các chủng vi khuẩn lactic thuần khiết được sử dụng nhằm tạo ra sản phẩm có chất lượng cao, ổn định và bảo quản tốt. Chúng có nhiều đặc tính ưu việt như khả năng sử dụng nhiều nguồn carbon, sinh axit mạnh, phát triển trong dải nhiệt độ rộng và chịu mặn tốt.

Giống *Lactobacillus* chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật của thịt lên men. Đây là trực khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, có thể lên men theo cả hai kiểu đồng hình hoặc dị hình. Chúng có khả năng thủy phân mạnh sucrose, phát triển tối ưu ở 30-35°C. Một số chủng phổ biến bao gồm: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sake*,...

Vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm vi khuẩn phổ biến trong tự nhiên, ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và được xem là chế phẩm sinh học an toàn cho con người [14]. Chúng có đặc điểm Gram dương, không di động, không sinh bào tử, phản ứng catalase âm, oxidase âm, nitrat reductase âm. Do khả năng tổng hợp các hợp chất sinh học yếu, chúng phụ thuộc vào nhiều loại acid amin, base nucleotid, vitamin từ môi trường. Bên cạnh đó, vì không có cytochrome, chúng thuộc nhóm vi khuẩn kỵ khí tùy nghi hoặc vi hiếu khí, có thể lên men trong cả điều kiện vi hiếu khí và kỵ khí.

*Lactobacillus plantarum* là một trong hơn 50 loài *Lactobacillus*. *Lactobacillus plantarum* là vi khuẩn gram dương, catalase âm, hình trực không sinh bào tử được tìm thấy trong hệ tiêu hóa của người và động vật. Vi khuẩn này lần đầu tiên được tìm thấy trong nước bọt của con người [15]. *Lactobacillus plantarum* là một loài vi khuẩn có khả năng thích nghi cao, có thể tồn tại trong dải nhiệt độ rộng (từ 1°C đến 60°C) và là vi khuẩn kỵ khí tùy nghi. Trong chi *Lactobacillus*, *L. plantarum* được xếp vào nhóm vi khuẩn lên men dị hình, có khả năng phát triển trong nhiều môi trường khác nhau, bao gồm thịt, cá, sữa, các quá trình lên men thực vật, động vật và nhiều loại phô mai [16].



**Hình 1. 1:** *Lactobacillus plantarum* dưới kính hiển vi điện tử  
([https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus\\_plantarum](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_plantarum))

*Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*), trước đây được gọi là *Lactobacillus plantarum*, là thuộc chi *Lactobacilli*. Phân nhóm vi khuẩn axit lactic (LAB) này bao gồm các sinh vật nhân sơ có mặt trong nhiều môi trường khác nhau, bao gồm đường tiêu hóa (GIT) của động vật có vú, niêm mạc âm đạo, chất nền thực phẩm, đất và các hốc liên kết với rau. *L. plantarum*, do được tìm thấy trong nhiều môi trường khác nhau và an toàn đối với con người (trong một số trường hợp, với đặc điểm nổi trội) nên thường được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm.

*Lactobacillus plantarum* được sử dụng để thúc đẩy các quá trình lên men trong sản xuất thực phẩm phục vụ cho nhu cầu tiêu dùng của con người. Đối với khả năng lên men và bảo quản thực phẩm, nâng cao các đặc tính cảm quan và giá trị dinh dưỡng, *L. plantarum* được biết đến trong lên men truyền thống hàng nghìn năm và do đó có mối quan hệ lâu dài với con người. Hơn nữa, giống như hầu hết các loài *lactobacilli*, loài này thường được công nhận là an toàn (GRAS) và đã được EFSA đưa vào danh sách các vi sinh vật được chứng nhận đủ điều kiện về an toàn (QPS) [17]. Gần đây, mối liên hệ giữa con người và *L. plantarum* đã được củng cố hơn nữa bằng các bằng chứng thực nghiệm làm nổi bật đặc tính probiotic của một số chủng [18], một số được thương mại hóa dưới dạng thực phẩm chức năng và thực phẩm bổ sung tăng cường sức khỏe [19]. Đối với tất cả các đặc tính được đề cập ở trên, loài này đại diện cho một mô hình tốt để nghiên cứu sâu về bản chất và cơ chế của chất kháng khuẩn như là những yếu tố chính liên quan đến hoạt động của probiotic đối với *lactobacilli*. Tính chất probiotic của chế phẩm sinh học có nghĩa là các vi sinh vật được có khả năng mang lại lợi ích sức khỏe cho con người khi được sử dụng trong hệ tiêu hóa với lượng thích hợp, điều này phụ thuộc vào một tập hợp các đặc tính của vi sinh vật bao gồm, khả năng tồn tại trong các điều kiện khắc nghiệt trong hệ tiêu hóa của con người, khả năng xâm chiếm, ít nhất là tạm thời, niêm mạc ruột, để củng cố chức năng hàng rào ruột, để bảo vệ cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và ngăn ngừa chứng loạn khuẩn, để kích thích phản ứng miễn dịch bằng cách tương tác với các tế bào bảo vệ vật chủ, hỗ trợ chức năng tiêu hóa và tổng hợp vitamin, axit béo chuỗi ngắn hoặc các phân tử hoạt tính sinh học có thể hữu ích cho con người [20], [21]. Tương tự, thuật ngữ còn gây tranh cãi “postbiotic” (hậu vi sinh vật) gần đây được đề xuất để chỉ các tế bào vi sinh vật bất hoạt, thành phần cấu trúc của chúng hoặc các chất chuyển hóa có khả năng mang lại lợi ích sức khỏe đã được chứng minh. Việc sử dụng thuật ngữ này vẫn đang được thảo luận nhằm đảm bảo phản ánh chính xác bản chất sinh học và cơ chế tác động của các thành phần nói trên [22], [23].

Việc sản xuất các hợp chất kháng vi sinh vật có vai trò quan trọng trong đặc tính probiotic của vi khuẩn lactic (LAB), cũng như trong cấu trúc protein liên quan của chúng trong các ứng dụng thực phẩm và đồ uống [24–28]. Đặc biệt, các hợp chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ *Lactobacilli* sống trong ruột có thể kiểm soát sự phát

triển của các mầm bệnh tiềm ẩn và vi sinh vật cơ hội, qua đó góp phần duy trì cân bằng hệ vi sinh đường ruột và cải thiện sức khỏe vật chủ [29], [30].

Ngoài ra, các chất kháng khuẩn từ *Lactobacilli* còn có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây ô nhiễm hoặc hư hỏng thực phẩm, giúp đảm bảo an toàn thực phẩm và kéo dài thời gian bảo quản sinh học [31–33].

Các hợp chất kháng khuẩn chính do *Lactobacilli* sản xuất có thể được phân thành hai nhóm chính: (i) các peptide được tổng hợp từ ribosome, thường được gọi là bacteriocin [34] và (ii) các sản phẩm phụ chuyển hóa có bản chất hóa học đa dạng, bao gồm hydro peroxit ( $H_2 O_2$ ) [35], axit lactic và các axit hữu cơ khác [36], cũng như các hợp chất phenolic [37].

Trong đó, bacteriocin thường thể hiện hoạt động kháng khuẩn có tính chọn lọc cao đối với một số vi khuẩn đích cụ thể, trong khi các hợp chất chuyển hóa hoạt động theo cơ chế rộng hơn, góp phần ức chế sự phát triển của nhiều loài cạnh tranh. Trước tình trạng kháng thuốc kháng sinh ngày càng gia tăng trên toàn cầu, các hợp chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ probiotic *Lactobacilli*, đặc biệt là bacteriocin, đang được nghiên cứu như một giải pháp thay thế tiềm năng cho kháng sinh truyền thống trong nhiều ứng dụng y sinh [38], [39].

*L. plantarum* có khả năng phát triển tốt trong điều kiện pH rộng, dao động từ 3.0 đến 8.5, nhưng tối ưu nhất ở pH khoảng 5.5 - 6.5. Nhiệt độ thích hợp để vi khuẩn này sinh trưởng dao động từ 30 - 37°C, mặc dù chúng có thể chịu được nhiệt độ thấp hơn hoặc cao hơn trong thời gian ngắn.

Một trong những đặc điểm nổi bật của *L. plantarum* là khả năng lên men nhiều loại đường khác nhau, bao gồm glucose, fructose, sucrose, maltose và nhiều loại carbohydrate khác. Quá trình lên men này giúp sản xuất acid lactic, đồng thời tạo ra các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (mVOCs), có vai trò quan trọng trong việc bảo quản thực phẩm và kiểm soát vi sinh vật gây bệnh.

*L. plantarum* là một trong những loài vi khuẩn lactic có khả năng tổng hợp bacteriocin, một loại peptide kháng khuẩn có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và nhiều vi khuẩn Gram dương khác. Đây là một đặc tính quan trọng giúp *L. plantarum* có tiềm năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm và kiểm soát sinh học trong y học

và nông nghiệp.

Ngoài ra, *L. plantarum* còn có khả năng sản sinh exopolysaccharides (EPS), đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng bám dính lên bề mặt ruột, hỗ trợ hệ vi sinh vật đường ruột và góp phần nâng cao sức khỏe con người.

*L. plantarum* đóng vai trò quan trọng trong ngành công nghiệp thực phẩm, đặc biệt là trong quá trình lên men thực phẩm. Vi khuẩn này không chỉ giúp tăng cường hương vị mà còn kéo dài thời gian bảo quản của các sản phẩm thực phẩm. Sản phẩm chứa *L. plantarum* thường được bổ sung vào sữa chua, phô mát, kim chi, dưa chua và các sản phẩm thực phẩm chức năng. Hơn nữa, *L. plantarum* còn được sử dụng như một vi khuẩn probiotic, giúp cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột và tăng cường hệ miễn dịch. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc bổ sung *L. plantarum* vào chế độ ăn có thể giúp giảm triệu chứng rối loạn tiêu hóa, ngăn ngừa táo bón và tăng cường sức khỏe đường ruột. *L. plantarum* đã được nghiên cứu rộng rãi về khả năng hỗ trợ điều trị và phòng ngừa nhiều loại bệnh. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng vi khuẩn này có khả năng làm giảm mức cholesterol trong máu, hỗ trợ kiểm soát huyết áp và tăng cường chức năng miễn dịch. *L. plantarum* cũng có vai trò quan trọng trong việc điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột, giúp ngăn ngừa các bệnh viêm nhiễm đường ruột như hội chứng ruột kích thích (IBS) và tiêu chảy do kháng sinh. Bên cạnh đó, vi khuẩn này còn giúp giảm viêm nhiễm nhờ khả năng điều chỉnh phản ứng miễn dịch của cơ thể.

*L. plantarum* đang được ứng dụng trong nông nghiệp như một giải pháp sinh học giúp kiểm soát vi sinh vật gây bệnh trên cây trồng và vật nuôi. Nhờ khả năng sản sinh các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (mVOCs), vi khuẩn này có thể giúp bảo vệ thực vật khỏi các loại nấm bệnh và côn trùng gây hại mà không cần sử dụng hóa chất tổng hợp. Ngoài ra, *L. plantarum* cũng có thể được sử dụng trong chế phẩm vi sinh dành cho thủy sản, giúp cải thiện hệ vi sinh đường ruột của cá và hỗ trợ tăng trưởng trong môi trường nuôi trồng thủy sản [40]. Bacteriocins của *L. plantarum* là peptide kháng khuẩn có khả năng ức chế nhiều vi khuẩn gây bệnh và làm hỏng thực phẩm, thông qua cơ chế làm rối loạn màng tế bào và ức chế tổng hợp protein của vi khuẩn đích [41]. Quá trình tinh sạch bacteriocin thường bao gồm các bước: thu nhận dịch lên men, kết tủa bằng amoni sulfat, sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel, với sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là bước cuối cùng để thu được sản phẩm có độ tinh khiết cao

[38], [40], [42].

Ngoài bacteriocin, *L. plantarum* còn sản xuất nhiều hoạt chất thứ cấp có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm và điều hòa miễn dịch, chẳng hạn như diacetyl, exopolysaccharide và các hợp chất dễ bay hơi (mVOCs) [43]. Các phương pháp phổ biến để tinh sạch các hoạt chất này bao gồm chiết xuất dung môi hữu cơ (methanol, ethyl acetate), sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký khí khối phổ (GC-MS) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định thành phần và tăng độ tinh sạch [44].

*Lactobacillus brevis* là một loài vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn lactic (Lactic Acid Bacteria - LAB), có khả năng lên men carbohydrate để tạo ra acid lactic. Đây là một vi khuẩn Gram dương, kỵ khí tùy nghi, không sinh bào tử và thường xuất hiện trong các sản phẩm lên men như bia, rượu vang, dưa chua, kim chi, và nhiều loại thực phẩm lên men khác. *L. brevis* có khả năng tồn tại trong nhiều loại môi trường khác nhau, bao gồm hệ tiêu hóa của con người và động vật. Đây là một trong những loài vi khuẩn có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, y học và nông nghiệp nhờ vào khả năng sản sinh các hợp chất có lợi như bacteriocin, acid hữu cơ, enzyme và các hợp chất có hoạt tính sinh học.

*L. brevis* là vi khuẩn có hình que, kích thước khoảng  $0.7 - 1.0 \times 2.0 - 4.0 \mu\text{m}$ . Vi khuẩn này có xu hướng tạo thành chuỗi ngắn hoặc xuất hiện đơn lẻ. Là vi khuẩn Gram dương, thành tế bào của *L. brevis* chứa nhiều peptidoglycan, giúp bảo vệ vi khuẩn khỏi các điều kiện khắc nghiệt trong môi trường. Một đặc điểm quan trọng của *L. brevis* là khả năng tổng hợp exopolysaccharides (EPS), giúp tăng khả năng bám dính lên bề mặt niêm mạc ruột và bảo vệ hệ vi sinh đường ruột. Ngoài ra, vi khuẩn này cũng sản xuất một số enzyme quan trọng như  $\beta$ -glucosidase, có vai trò trong quá trình thủy phân glycoside thực vật.

*L. brevis* có thể phát triển trong phạm vi pH từ 3.0 đến 8.0, thích nghi tốt với môi trường acid. Nhiệt độ tối ưu để vi khuẩn này phát triển nằm trong khoảng 30 - 37°C. *L. brevis* có khả năng lên men nhiều loại đường khác nhau, bao gồm glucose, fructose, maltose, sucrose, nhưng không lên men lactose, đây là một điểm khác biệt so với nhiều loài vi khuẩn lactic khác. *L. brevis* thuộc nhóm vi khuẩn lên men không đồng hình, có thể sản xuất không chỉ acid lactic mà còn một số sản phẩm phụ khác như ethanol, acetic acid và carbon dioxide. Điều này giải thích tại sao *L. brevis* thường

được tìm thấy trong quá trình lên men bia và các sản phẩm lên men có chứa khí CO<sub>2</sub>.

*L. brevis* là một chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất bacteriocin - một loại peptide kháng khuẩn có tác dụng ức chế các vi khuẩn gây bệnh như *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* [45]. Nhờ đặc tính này, *L. brevis* được đánh giá cao trong ứng dụng bảo quản thực phẩm và kiểm soát vi sinh vật gây hư hỏng thực phẩm.

Ngoài ra, *L. brevis* còn có khả năng tổng hợp Gamma-Aminobutyric Acid (GABA), một hợp chất có tác dụng an thần và hỗ trợ giảm căng thẳng [46]. Do đó, vi khuẩn này đang thu hút sự quan tâm trong lĩnh vực y học và dinh dưỡng, đặc biệt trong việc phát triển các sản phẩm probiotic có lợi cho sức khỏe thần kinh [47].

*L. brevis* được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, đặc biệt là trong sản xuất thực phẩm lên men như bia, rượu vang, dưa chua, kim chi và bánh mì chua. Vi khuẩn này đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra hương vị đặc trưng và tăng thời gian bảo quản thực phẩm. Trong sản xuất bia, *L. brevis* thường liên quan đến quá trình sour beer fermentation, giúp tạo ra hương vị chua đặc trưng do sự sản xuất axit lactic và carbon dioxide. Ngoài ra, *L. brevis* còn được ứng dụng trong công nghệ bảo quản thực phẩm tự nhiên, giúp ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn gây hại thông qua cơ chế sản sinh bacteriocin. *L. brevis* có nhiều lợi ích đối với sức khỏe con người, đặc biệt là trong việc duy trì hệ vi sinh vật đường ruột. Các nghiên cứu cho thấy vi khuẩn này có khả năng hỗ trợ điều trị hội chứng ruột kích thích (IBS), tiêu chảy do kháng sinh và các vấn đề liên quan đến hệ tiêu hóa khác. Một trong những ứng dụng quan trọng của *L. brevis* trong y học là khả năng sản xuất GABA, một chất có tác dụng làm giảm căng thẳng, cải thiện giấc ngủ và hỗ trợ điều trị bệnh trầm cảm. Chính vì vậy, *L. brevis* được sử dụng trong các sản phẩm probiotic dành cho sức khỏe tinh thần. Bên cạnh vai trò trong thực phẩm và y học, *Lactobacillus brevis* còn có tiềm năng trong việc hỗ trợ hệ miễn dịch nhờ khả năng sản sinh bacteriocin và điều chỉnh phản ứng miễn dịch, giúp cơ thể chống lại vi khuẩn gây bệnh [48].

Ngoài ra, *L. brevis* có thể được ứng dụng trong nông nghiệp như một chế phẩm vi sinh giúp kiểm soát sinh học. Với khả năng sản xuất bacteriocin và các hợp chất kháng khuẩn, vi khuẩn này có thể bảo vệ cây trồng khỏi vi khuẩn và nấm gây bệnh [49]. Trong lĩnh vực chăn nuôi, *L. brevis* cũng được sử dụng làm probiotic cho động

vật, hỗ trợ cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, tăng cường hấp thu dinh dưỡng và giảm thiểu các vấn đề tiêu hóa. Đây là một giải pháp tiềm năng giúp giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh trong ngành chăn nuôi [50].

*Lactobacillus sakei*: Hình que, Gram dương, chịu được môi trường muối cao. Vai trò trong nem chua: Hỗ trợ quá trình lên men và tạo ra axit lactic. Có đặc tính ức chế vi khuẩn gây hư hỏng như *Listeria monocytogenes*, giúp nem an toàn hơn. Tăng cường sự ổn định của sản phẩm trong quá trình bảo quản.

*Lactobacillus curvatus* : Hình que cong nhẹ, ưa môi trường có pH thấp. Hỗ trợ quá trình tạo độ chua nhanh, góp phần tạo kết cấu chắc của nem. Giúp kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn không mong muốn.

*Lactobacillus fermentum*: Có khả năng chịu được môi trường có độ axit cao. Tham gia quá trình tạo hương vị độc đáo, có thể giúp nem đạt được sự cân bằng giữa chua và thơm. Đóng góp vào hệ vi sinh vật có lợi cho đường ruột khi tiêu thụ nem chua.

Các vi sinh vật không mong muốn trong nem chua như một số loại vi khuẩn gây hư hỏng như *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. có thể làm hỏng nem nếu điều kiện bảo quản không đảm bảo. Một số vi khuẩn gây bệnh nếu nguyên liệu không sạch như *Salmonella*, *Escherichia coli* có thể xuất hiện và gây nguy cơ ngộ độc thực phẩm.

## 1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ BACTERIOCIN TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM

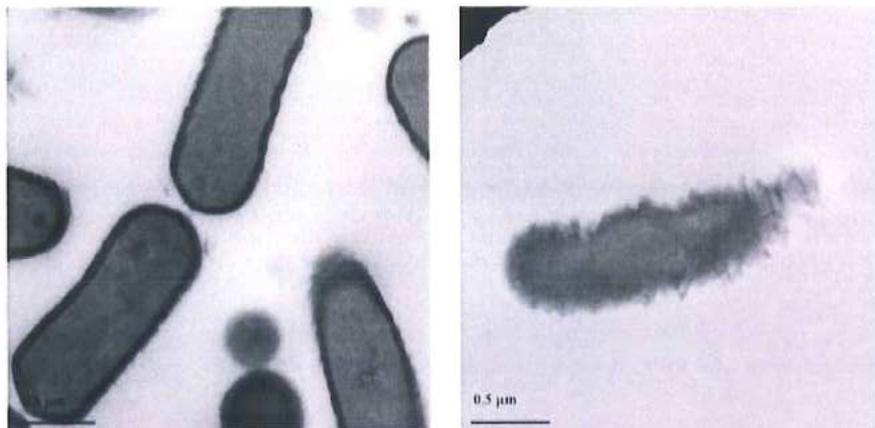
### 1.2.1. Các nghiên cứu về hoạt chất kháng khuẩn từ nhóm vi sinh vật lên men trên thế giới

Bản chất của quá trình lên men trong nem chua là nhờ hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn thuộc nhóm *Lactobacillus* [51], và coagulase-negative cocci (CNC) [52].

Năm 2004, Bromberg và cộng sự đã phân lập vi khuẩn lactic sản xuất bacteriocin từ thịt và các sản phẩm từ thịt, đồng thời xác định phổ ức chế vi khuẩn của chúng. Kết quả cho thấy bacteriocin từ vi khuẩn lactic có thể đóng vai trò như một hàng rào sinh học, giúp ức chế vi khuẩn gây hư hỏng và các tác nhân gây bệnh trong thực phẩm [53].

Năm 2015, nhóm nghiên cứu từ Đại học RMIT (Australia) đã phát hiện một hợp chất có khả năng kháng khuẩn hiệu quả trong nem chua, được đặt tên là Plantacyclin

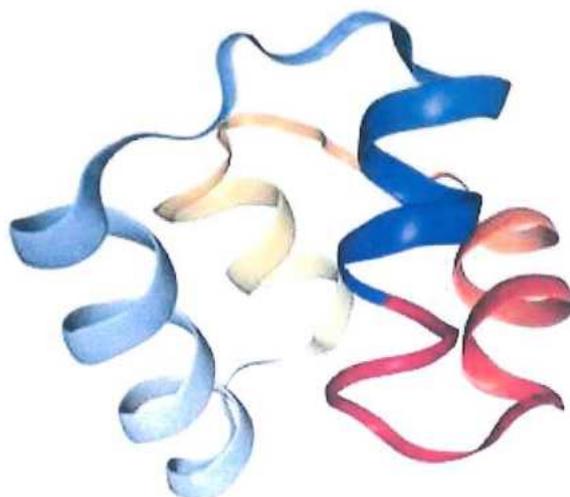
B21AG. Khi đến Việt Nam, họ nhận thấy người dân có thể ăn nem chua – một sản phẩm lên men từ thịt sống – mà không bị ngộ độc dù trong điều kiện khí hậu nóng ẩm. Điều này thôi thúc nhóm nghiên cứu tìm hiểu và xác định Plantacyclin B21AG chính là yếu tố giúp nem chua giữ được hương vị lâu mà không bị hỏng.



**Hình 1.2: Hợp chất Plantacyclin B21AG được phân lập từ nem chua có khả năng tiêu diệt vi khuẩn có hại [54]**

Bằng phương pháp sắc ký lỏng, các nhà khoa học phát hiện Plantacyclin B21AG có cấu trúc protein dạng vòng, nên bền và khó bị phá vỡ. Vì vậy, chúng có thể chịu mức đun nóng tới 90°C trong 20 phút và cả môi trường đông lạnh lên tới -80°C, tồn tại trong môi trường có độ pH cao thấp khác nhau (5,5-7,5).

Hợp chất này có thể tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh thường có trong thực phẩm gồm *Listeria* (vi khuẩn có khả năng gây chết người tồn tại trong tủ lạnh) và *Clostridium perfringens* (vi khuẩn trong thịt gia cầm sống, gây ngộ độc) [54].



**Hình 1.3: Cấu trúc protein của hợp chất này bền, khó bị phá vỡ [54]**

Bacteriocin được nghiên cứu sử dụng làm chất bảo quản sinh học trong công nghiệp thực phẩm, hoặc làm chất bổ sung tăng trưởng động vật, thực vật hay các chế phẩm sinh học (probiotic) trong nông nghiệp. Trong lĩnh vực y tế, bacteriocin đang được tập trung nghiên cứu thử nghiệm trong liệu pháp điều trị các bệnh nhiễm trùng và ung thư. Bài báo "Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approach for Biopreservation of Meat and Meat Products" thảo luận về việc sử dụng vi khuẩn lactic (LAB) và các peptide kháng khuẩn do chúng sản xuất, đặc biệt là bacteriocin, như một phương pháp bảo quản sinh học tự nhiên cho thịt và các sản phẩm từ thịt. LAB có khả năng ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây hư hỏng và mầm bệnh thông qua việc sản xuất các chất kháng khuẩn như axit lactic, hydrogen peroxide và bacteriocin. Việc ứng dụng LAB và bacteriocin trong công nghiệp thịt không chỉ giúp kéo dài thời gian bảo quản mà còn giảm thiểu việc sử dụng chất bảo quản hóa học, đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng về các sản phẩm tự nhiên và an toàn hơn. Tuy nhiên, để áp dụng hiệu quả, cần có sự hiểu biết sâu sắc về đặc tính của LAB và bacteriocin, cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của chúng trong các sản phẩm thịt [55].

Bacteriocin được nghiên cứu sử dụng làm chất bảo quản sinh học trong công nghiệp thực phẩm [54], hoặc làm chất bổ sung tăng trưởng động vật, thực vật hay các chế phẩm sinh học (probiotic) trong nông nghiệp [56, 57]. Trong lĩnh vực y tế, bacteriocin đang được tập trung nghiên cứu thử nghiệm trong liệu pháp điều trị các bệnh nhiễm trùng và ung thư [58].

### 1.2.2. Các nghiên cứu trong nước

Trong nhiều năm qua, nghiên cứu về vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic tại Việt Nam đã đạt được nhiều thành tựu quan trọng, góp phần vào lĩnh vực công nghệ thực phẩm và vi sinh vật học. Các nghiên cứu tập trung vào phân lập, định danh, đánh giá đặc tính probiotic và ứng dụng của nhóm vi khuẩn này trong thực phẩm lên men, dược phẩm và chế phẩm sinh học.

Phân lập và định danh vi khuẩn *Lactobacillus*, nghiên cứu đầu tiên về phân lập *Lactobacillus* ở Việt Nam được tiến hành từ những năm 2000, tập trung vào nguồn gốc từ hệ tiêu hóa và thực phẩm lên men truyền thống. Vào năm 2011, Hoàng Quốc

Khánh và Phạm Thị Lan Anh đã phân lập và định danh 15 chủng *Lactobacillus* từ phân trẻ sơ sinh, giúp hiểu rõ hơn về hệ vi sinh đường ruột và tiềm năng ứng dụng probiotic của chúng [59].

Năm 2015, Nguyễn Thị Phương Thảo và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu về sự đa dạng vi khuẩn lactic từ sữa mẹ và hệ tiêu hóa trẻ sơ sinh, từ đó xác định được các chủng có khả năng sinh bacteriocin và kháng khuẩn tốt đối với một số vi khuẩn gây bệnh [60]. Tương tự, nghiên cứu của Lê Thị Thanh Mai và cộng sự (2017) đã phân lập nhiều chủng *Lactobacillus* từ hệ tiêu hóa động vật nhai lại, nhằm tìm kiếm ứng dụng trong chăn nuôi và bảo vệ sức khỏe đường ruột [61].

Gần đây hơn, vào năm 2023, Dương Thị Hồng Nga và cộng sự đã tiến hành phân lập 19 dòng vi khuẩn lactic từ nem chua, một sản phẩm lên men truyền thống, nhằm tìm kiếm các chủng có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm lên men [62]. Kết quả cho thấy các chủng phân lập có đặc điểm khuẩn lạc điển hình của nhóm *Lactobacillus* và có khả năng sinh acid lactic tốt, giúp bảo quản thực phẩm và nâng cao giá trị dinh dưỡng.

Đánh giá đặc tính probiotic của *Lactobacillus*. Các nghiên cứu trong nước đã tập trung vào đánh giá khả năng sống sót trong môi trường đường ruột, sinh enzyme tiêu hóa, kháng khuẩn và điều hòa miễn dịch của *Lactobacillus*. Năm 2014, Nguyễn Thị Huyền và cộng sự đã khảo sát vi sinh vật trong 24 sản phẩm men tiêu hóa thương mại, kết luận rằng hầu hết các chủng phân lập đều có đặc tính probiotic tốt, giúp hỗ trợ tiêu hóa và tăng cường miễn dịch [63].

Ngoài ra, năm 2016, Trần Văn Hùng và cộng sự đã đánh giá khả năng chịu đựng của *Lactobacillus casei* và *Lactobacillus plantarum* trong điều kiện pH thấp và mật độ muối cao, cho thấy chúng có thể tồn tại tốt trong đường tiêu hóa và có tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng [64].

Ứng dụng *Lactobacillus* trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm

Ngoài ứng dụng trong thực phẩm lên men, vi khuẩn *Lactobacillus* còn được nghiên cứu để sản xuất các hợp chất sinh học có lợi. Vào năm 2018, Đồng Thị Hoàng Anh và cộng sự đã nghiên cứu đặc điểm của bacteriocin từ chủng *Lactobacillus plantarum* UL487 phân lập từ chao Huế. Bacteriocin này có hoạt tính kháng khuẩn

manh, chịu nhiệt tốt và hoạt động trong dải pH rộng, mở ra tiềm năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm và chế phẩm sinh học [65].

Năm 2020, Đặng Thị Thanh Hương và cộng sự đã nghiên cứu việc bổ sung *Lactobacillus* vào sữa đậu nành để tạo ra sản phẩm probiotic giàu dinh dưỡng. Kết quả cho thấy vi khuẩn này không chỉ giúp cải thiện mùi vị mà còn làm tăng giá trị sinh học của sữa đậu nành, giúp hỗ trợ tiêu hóa và tăng cường miễn dịch [66]. Một nghiên cứu khác của Lê Minh Hoàng năm 2021 đã thử nghiệm việc bổ sung *Lactobacillus* vào thức ăn chăn nuôi nhằm cải thiện hệ vi sinh đường ruột của gia súc, giúp tăng cường sức đề kháng và giảm sử dụng kháng sinh [67].

### 1.2.3. Định danh vi sinh vật

#### 1.2.3.1. Định danh vi sinh vật theo phương pháp truyền thống

Phương pháp truyền thống để định danh vi sinh vật chủ yếu dựa trên các tiêu chí phân loại như hình thái, sinh lý, biến dưỡng và sinh thái.

Đặc điểm hình thái: Bao gồm hình dạng và kích thước tế bào, đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng, màu sắc), khả năng di động, cũng như sự hiện diện của các cấu trúc như tiên mao, tiêm mao, bào tử, màng nhầy và thể vùi.

Đặc điểm sinh lý và biến dưỡng: Gồm khả năng sử dụng nguồn carbon và nitrogen, phương thức chuyển hóa năng lượng, các sản phẩm trao đổi chất, mối quan hệ với oxy, khả năng chịu áp suất thẩm thấu, cũng như khoảng nhiệt độ và pH thích hợp cho sự phát triển. Trong đó các thử nghiệm sinh hóa về đặc điểm sinh lý và đặc điểm biến dưỡng năng lượng là các chỉ tiêu cơ bản nhất trong phân loại vi sinh vật. Định danh vi sinh vật bằng phương pháp sinh hóa. Kết quả thử nghiệm sinh hóa từ nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đã được tổng hợp thành bảng sinh hóa định danh vi sinh vật, giúp phân biệt các loài dựa trên đặc điểm sinh hóa đặc trưng. Mỗi đặc điểm này được thể hiện bằng một giá trị phần trăm, phản ánh tỷ lệ mẫu thử cho kết quả dương tính trong thống kê của từng loài.

Trong phương pháp truyền thống, việc định danh vi sinh vật thường dựa vào khóa phân loại (hoặc bảng sinh hóa), trong đó Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (ấn bản thứ 9) là tài liệu phổ biến nhất. Tuy nhiên, với những trường hợp phức tạp, cần sử dụng phân tích vật liệu di truyền để xác định chính xác chủng vi sinh vật mục tiêu.

### ***1.2.3.2. Định danh vi sinh vật dựa vào vật liệu di truyền***

Thước đo tiến hóa: Dùng để đo sự thay đổi về mặt tiến hóa dựa trên các đại phân tử của tế bào. Sự khác nhau về trình tự nucleotide hay amino acid của các đại phân tử được tách chiết sẽ cho biết khoảng cách tiến hóa giữa hai sinh vật đó. Số lượng thay đổi tỷ lệ với số lượng thay đổi do đột biến bền vững trên phân tử DNA. Khi có các đột biến khác nhau trên các quần thể khác nhau thì xảy ra hiện tượng tiến hóa sinh học và dẫn đến kết quả cuối cùng là sự đa dạng sinh học. Muốn xác định mức tiến hóa chính xác giữa các sinh vật thì cần phải chọn một đại phân tử phù hợp để nghiên cứu trình tự của DNA.

Định danh vi khuẩn: Phương pháp định danh vi sinh vật dựa vào đặc điểm di truyền là một phương pháp hiện đại cho kết quả chính xác trong thời gian ngắn, thao tác đơn giản. Tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi trang thiết bị hiện đại và hoá chất đắt tiền. Như được đề cập ở trên, phân tử rRNA 16S được sử dụng làm thước đo tiến hóa ở prokaryote do đó nó được sử dụng phổ biến trong định danh vi khuẩn. Một vài vùng trên rRNA 16S của tất cả prokaryote có tính bảo tồn cao, trong khi đó tại một số vùng khác lại có một số khác biệt. Khi một trình tự rDNA 16S được giải mã hoàn toàn ta có thể định danh được loài vi sinh vật mục tiêu nhờ so sánh trình tự rDNA 16S của loài vi sinh vật đang quan tâm với tất cả các trình tự rDNA 16S của tất cả các loài vi sinh vật lưu trữ trong ngân hàng gen (GenBank) nhờ vào công cụ BLAST, hay kết hợp sử dụng các phần mềm để so sánh mức độ tương đồng của các trình tự. Từ những cơ sở dữ liệu này ta có thể vẽ được cây phát sinh loài, thể hiện mối quan hệ tiến hoá của các loài và vị trí của loài vi sinh vật cần định danh.

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Mẫu nghiên cứu

Các mẫu nem chua được thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau ở Thanh Hóa ( Nga Sơn, Thành Phố, Sầm Sơn..), Quảng Ninh, Phùng, Hoài Đức, Đông Anh, Phú Thọ,...



**Hình 2.1: Nem chua Thanh Hóa**

(Nguồn: <https://www.lotussia.com/vietnamese-sour-spring-roll-nem-chua>)

*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ Sinh học enzyme, Viện Công nghệ sinh học.

#### 2.1.2. Hoá chất, dụng cụ và thiết bị

*Các thiết bị được sử dụng:*

Tên thiết bị	Hãng sản xuất
Box cấy vi sinh clean beach	Trung tâm chuyên giao công nghệ, Việt Nam
Cân phân tích AB 240	Sartorius (Thụy Sĩ)
Lò vi sóng	Samsung (Hàn Quốc)
Máy đo pH	Metrohm (Thụy Sĩ)
Máy lắc nuôi cấy	Certomat HK(Đức)

Máy li tâm lạnh Miikro 22R	Hettich (Đức)
Máy quang phổ UV – 2500	LaboMed Inc (Mỹ)
Máy cô quay Buchi	Buchi (Đức)
Máy ly tâm	Sorvall Legend XTR (Nhật)
Nồi khử trùng ES – 315	Tomy (Nhật)

### Môi trường nuôi cấy

MT1. Môi trường MRS dùng để phân lập, nuôi cấy và nghiên cứu các đặc tính của vi khuẩn. Thành phần môi trường MRS (g/l) bao gồm: yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1%, D-glucose 2%,  $K_2HPO_4$  0,2%,  $MgSO_4$  0,02%,  $MnSO_4$  0,004%, tween 80 1 mL,  $CH_3COONa$  (sodium acetate) 0,5%, Agar 2%. MT2. Môi trường MRS lỏng dùng để nuôi cấy và nghiên cứu đặc tính của vi khuẩn LAB thành phần tương tự MT1 nhưng không có thêm agar. MT3. Môi trường MRS agar bổ sung 1%  $CaCO_3$  dùng để phân lập và khảo sát khả năng sinh acid tổng hợp. Thành phần môi trường MRS agar + 1%  $CaCO_3$ . MT4. Môi trường LB dùng để nuôi cấy vi khuẩn chi thị. MT5. Môi trường LB agar dùng để đo kháng khuẩn. Thành phần môi trường LB lỏng (MT4) + 2% agar.

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1 Phân lập chủng vi khuẩn sinh hoạt tính kháng khuẩn từ nem chua

Các mẫu nem chua dùng để phân lập vi khuẩn lactic được thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau như Thanh Hóa, Quảng Ninh, Phùng (Hà Nội), Hoài Đức, Đông Anh,... Tất cả các mẫu đều đảm bảo chất lượng, không bị hư hỏng. Tiêu chí đánh giá nem chua đạt chuẩn bao gồm màu đỏ hồng đặc trưng, hương vị hài hòa giữa chua, cay, mặn, và ngọt. Các bước tiến hành:

Mỗi mẫu nem (10 g) được cân chính xác và cho vào bình tam giác chứa 90 ml môi trường MRS lỏng đã tiệt trùng. Hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 24 giờ để tăng sinh vi khuẩn. Tiếp theo, tiến hành pha loãng mẫu và lấy 0,1 ml ở nồng độ  $10^{-5}$  trải đều trên đĩa Petri có chứa môi trường MRS agar bổ sung 1%  $CaCO_3$ . Đĩa được ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ. Những khuẩn lạc có khả năng làm tan  $CaCO_3$  được chọn

và cấy truyền nhiều lần cho đến khi thu được dòng vi khuẩn thuần chủng [62]. Sau khi được tách dòng, các chủng được chọn để phân tích hình thái và một số chỉ tiêu sinh hóa cơ bản để nhận dạng giống *Lactobacillus* theo phương pháp của Kandler and Wiss (1986) [69]. Các chủng *Lactobacillus* chọn lọc được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS lỏng (MT2) ở nhiệt độ 37°C, trong 24 giờ, sau đó giữ giống bằng cách bổ sung 20% glycerol ở -20°C cho các đánh giá tiếp theo.

Định danh sơ bộ vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram và kiểm tra tính chất sinh hóa

#### Nhuộm Gram

Mẫu vi khuẩn được chuẩn bị trên lam kính sạch và cố định bằng cách hơi qua ngọn lửa. Sau đó, tiến hành nhuộm theo quy trình tiêu chuẩn:

- Nhuộm tím tinh thể trong 1 phút, rửa bằng nước.
- Thêm dung dịch lugol (iodine) trong 1 phút để cố định màu, rửa lại bằng nước.
- Tẩy màu bằng cồn 96° trong khoảng 10–15 giây, rửa ngay bằng nước.
- Nhuộm nền bằng safranin trong 30 giây rồi rửa và để khô tự nhiên.

Kết quả được quan sát dưới kính hiển vi quang học (1000× với dầu soi). Vi khuẩn Gram dương giữ màu tím, trong khi vi khuẩn Gram âm có màu hồng/đỏ.

#### Kiểm tra phản ứng catalase

Một giọt H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> 3% được nhỏ lên lam có chứa khuẩn lạc vi khuẩn. Sự xuất hiện nhanh chóng của bọt khí (oxi) cho thấy phản ứng catalase dương tính – vi khuẩn có khả năng phân giải hydrogen peroxide. Nếu không có bọt khí, kết quả được coi là âm tính.

#### 2.2.2 Đánh giá khả năng kháng khuẩn gây bệnh của chủng vi khuẩn có trong nem chua

Dựa trên sự đối kháng giữa vi sinh vật kiểm định và vi sinh vật chỉ thị. Khả năng kháng khuẩn *S. aureus* được thực hiện theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch [68]. Vi khuẩn *S. aureus* được lựa chọn làm tác nhân gây bệnh thực phẩm trong nghiên cứu này. Chủng vi khuẩn này được bảo quản tại phòng thí nghiệm thuộc Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Để tăng sinh, vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB (MT4) ở 37°C trong 24 giờ. Trong khi đó,

các chủng *Lactobacillus* được nuôi trong môi trường MRS lỏng (MT2) dưới điều kiện tương tự. Sau khi nuôi cấy, dịch vi khuẩn được ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C để thu lấy phần dung dịch nổi (*Cell-Free Supernatant - CFS*). Đây chính là mẫu dùng để đánh giá khả năng kháng khuẩn.

Môi trường thạch LB agar (MT5) được chuẩn bị để làm cơ sở thử nghiệm. Tiếp đó, 100  $\mu$ L dịch nuôi *S. aureus* được dàn đều lên bề mặt thạch. Các lỗ thạch có đường kính 6 mm được đục trên bề mặt này. Sau đó, 100  $\mu$ L dịch CFS từ *Lactobacillus* được nhỏ vào mỗi lỗ. Để đảm bảo sự khuếch tán tối ưu, thạch được ủ 30 phút ở 4°C, sau đó tiếp tục ủ ở 37°C trong 24 giờ.

Khả năng kháng khuẩn được xác định dựa trên sự xuất hiện của vòng ức chế xung quanh lỗ thạch. Kích thước vòng kháng khuẩn (DK) được tính theo công thức:

$DK = D_i - d_w$ . Trong đó:  $D_i$ : Đường kính toàn bộ vùng ức chế vi khuẩn (mm);  $d_w$ : Đường kính lỗ thạch ban đầu (mm)

### **2.2.3. Phương pháp sinh học phân tử trong định danh và phân tích vi khuẩn**

#### **2.2.3.1. Định danh vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn trong nem chua bằng phương pháp sinh học phân tử**

##### **Tách chiết DNA tổng số**

Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng qua đêm ở 30°C, lắc 200 rpm, sau đó ly tâm 6500 rpm trong 8 phút ở 4°C. Tủa tế bào được bổ sung 900  $\mu$ l dung dịch phá tế bào, và 5  $\mu$ l proteinase K, đảo trộn. Ủ hỗn hợp ở 55°C đến khi tế bào bị phá hoàn toàn để nguội xuống nhiệt độ phòng. Sau đó thêm vào hỗn hợp 4  $\mu$ l RNase, đảo trộn đều, ủ ở 37°C từ 15 - 60 phút, rồi để nguội xuống nhiệt độ phòng. Bổ sung thêm 300  $\mu$ l amonium acetate 7,5M vào dịch phá tế bào đã xử lý bằng RNase, đảo trộn nhiều lần, và ủ trong đá 15-30 phút. Dịch nổi chứa DNA sau khi ly tâm 13000 rpm trong 3 phút ở 4°C được hút sang 1 ống eppendorf mới có chứa 900  $\mu$ l isopropanol. Hỗn hợp được đảo trộn và DNA kết tủa ở -20°C trong nhiều giờ. Tủa sau khi ly tâm 12000 rpm trong 5 phút ở 4°C được làm khô bằng giấy thấm và bổ sung 500  $\mu$ l cồn 70%, đảo trộn nhiều lần rửa DNA để loại muối và isopropanol. Sau khi ly tâm 13000 rpm trong 1 phút ở 4°C tủa được làm khô và hòa trong 100  $\mu$ l đệm TE và bảo quản DNA ở 4°C.

### **Khuếch đại phân đoạn 16S rRNA bằng PCR**

Vùng gen 16S rRNA được khuếch đại bằng cặp mồi tổng 9F và 926R có trình tự 9F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 926R: 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 94°C trong 4 phút, sau đó lặp lại 30 chu kỳ với các bước như sau: Biến tính ở 94°C trong 40 giây, gắn mồi ở 54°C trong 60 giây, tổng hợp DNA ở 72°C trong 90 giây. Cuối cùng phản ứng được duy trì 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel 0,8% agarose trong dung dịch đệm TBE 1X ở 100V trong 30 phút và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000. Kết quả được đối chiếu với thang chuẩn 1 Kb được mua từ công ty Fermentas.

### **Gắn sản phẩm PCR vào vector pJET1.2/blunt**

Cơ sở phương pháp được thực hiện theo GeneJET™PCR Cloning Kit của hãng Fermentas. Phương pháp này cho phép gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vector pJET1.2/blunt với sự tham gia của enzyme T4 ligase. Thành phần phản ứng gồm: 5 µl Buffer reaction 2x; 2,5 µl H<sub>2</sub>O cất tiêm; 1 µl sản phẩm PCR; 0,5 µl DNA blunting enzyme. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 70°C trong 15 phút. Sau đó hỗn hợp bổ sung thêm 0,5 µl pJET1.2/blunt và 0,5 µl T4 ligase, tổng thể tích 10 µl, mix đều các thành phần, sau đó hỗn hợp lai được ủ qua đêm ở 22°C.

### **Biến nạp plasmid**

Lấy tế bào khả biến tươi hoặc từ -80°C được giải đông từ từ trong đá khoảng 30 phút. Cho 5 µl dung dịch sau phản ứng ghép nối gene (sản phẩm PCR 16S + pJET1.2/blunt) vào ống eppendorf chứa 50 µl dịch tế bào khả biến chủng DH10b, đảo nhẹ nhàng, ủ trong đá khoảng 30 phút. Hỗn hợp được sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây, lấy mẫu ra và đặt ngay vào trong đá lạnh khoảng 10 phút. Bổ sung 250 µl LB lỏng, nuôi lắc 200 rpm ở 37°C trong 1 giờ. Cấy trải 100 µl dịch biến nạp trên đĩa thạch LB có bổ sung 0,1% ampicillin (100 µg/ml), ủ ở từ 37°C qua đêm.

#### **2.2.3.2. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose**

Kỹ thuật điện di được sử dụng để phân tách các đoạn nucleic acid dựa trên kích thước và điện tích của chúng. Do DNA mang điện tích âm, khi đặt trong điện trường một chiều, các đoạn DNA sẽ di chuyển từ cực âm về cực dương với tốc độ phụ thuộc vào kích thước và khối lượng của chúng.

Trong thí nghiệm này, gel agarose 0,8% được chuẩn bị bằng cách hòa tan agarose trong nước và đun sôi. Sau khi dung dịch agarose đạt nhiệt độ 50–60°C, nó được đổ

vào khay gel đã gắn sẵn rãnh lược. Khi gel đông cứng (khoảng 30 phút), rãnh lược được tháo ra, và gel được đặt vào bể điện di. Tiếp theo, đệm TAE 1X được đổ vào bể sao cho ngập bề mặt gel khoảng 2 mm.

Mẫu DNA được chuẩn bị bằng cách trộn 7  $\mu\text{L}$  DNA với 2  $\mu\text{L}$  loading dye, sau đó nạp vào các giếng trên gel. Quá trình điện di được tiến hành ở 100V với dòng điện 60–80 mA. Khi vệt màu bromophenol blue di chuyển đến vị trí thích hợp (khoảng 30 phút), quá trình điện di được dừng lại.

Để quan sát DNA, gel được nhuộm bằng ethidium bromide (EtBr, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) trong 10 phút, sau đó rửa sạch bằng nước. Dưới ánh sáng UV, các đoạn DNA hiện lên dưới dạng các vạch sáng. Hình ảnh điện di được ghi lại bằng hệ thống Bio-Rad sử dụng tia UV có bước sóng 320 nm [70].

### **2.2.3.3. Xác định trình tự DNA và phân tích phát sinh loài**

Sau khi plasmid tái tổ hợp được tinh sạch, đoạn DNA chèn vào plasmid được đọc trình tự nucleotide theo nguyên lý Sanger cải tiến dựa trên các dideoxy. DNA polymerase xúc tác gắn các dideoxynucleotide vào đầu 3'-OH mạch đơn DNA đang tổng hợp, quá trình tổng hợp sẽ dừng lại khi gặp dideoxynucleotide đánh dấu huỳnh quang không có nhóm 3'-OH. Kết quả là hỗn hợp sản phẩm sau phản ứng bao gồm các polynucleotide có kích thước hơn kém nhau một nucleotide và được phát hiện bằng mẫu dò huỳnh quang trên máy đọc trình tự tự động ABI PRIMS 3100 Avant Genetic Analyzer. Vector pJET1.2/blunt được gắn hai trình tự mỗi xuôi và mỗi ngược để đọc trình tự phân đoạn chèn DNA ngoại lai [70].

Kết quả đọc trình tự được phân tích, xử lý bằng phần mềm DNASTar và BLAST được sử dụng để tìm và so sánh trình tự nucleotide trong GenBank, tính khoảng cách di truyền và xây dựng cây phân loại. Nếu trình tự có tỷ lệ tương đồng > 97%, mẫu DNA được xác định thuộc cùng loài với trình tự tham chiếu. Các trình tự thu được cùng với trình tự tham chiếu từ NCBI được căn chỉnh bằng ClustalW. Cây phát sinh loài được dựng bằng phần mềm DNASTar với 1000 lần bootstrap trong phần mềm MEGA X để đánh giá mối quan hệ tiến hóa giữa các mẫu nghiên cứu.

### **2.2.4. Đánh giá và phân tích hợp chất kháng khuẩn**

Chuẩn bị môi trường và nuôi cấy vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường MRS lỏng (MT2) ở 37°C trong 24 giờ để đảm bảo sự phát triển tối ưu. Sau thời gian ủ, dung dịch vi khuẩn được thu thập và tiến hành ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C nhằm tách tế bào khỏi dịch nuôi cấy.

Phần dịch nổi thu được sau ly tâm được lọc qua màng 0,22 µm để loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn sống, đảm bảo chỉ có các hợp chất kháng khuẩn trong dịch nuôi cấy được sử dụng cho thí nghiệm.

Phương pháp kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Cụ thể:

Chuẩn bị môi trường: Đổ môi trường thạch Muller-Hinton (MH) vào đĩa petri, để đông đặc. Cấy vi khuẩn chỉ thị (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* hoặc vi khuẩn mục tiêu) theo phương pháp cấy phủ đều bề mặt. Tạo giếng trên thạch dùng đầu côn vô trùng hoặc ống hút tạo 4 giếng trên bề mặt môi trường thạch, mỗi giếng có đường kính khoảng 6 mm. Sau đó bổ sung các mẫu thử vào giếng:  
Giếng 1: Cloramphenicol 0,4% (đôi chứng dương, kháng sinh kiểm soát).

Giếng 2: Phần dịch nổi từ dịch nuôi cấy (CFS).

Giếng 3: Dịch nổi sau khi đun sôi trong 10 phút để kiểm tra tính bền nhiệt.

Giếng 4: Dịch nổi sau khi đun sôi 10 phút, có bổ sung protease K (1 mg/ml) nhằm kiểm tra xem tác nhân kháng khuẩn có phải là protein hay không.

Ủ và quan sát kết quả: Ủ đĩa thạch ở 37°C trong 24 giờ. Đo đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh các giếng và so sánh kết quả.

Phân tích kết quả:

Nếu giếng 2 tạo ra vòng kháng khuẩn rộng, chứng tỏ dịch nuôi cấy có chứa hợp chất kháng khuẩn.

Nếu giếng 3 không có vòng kháng khuẩn hoặc vòng nhỏ hơn giếng 2, điều này cho thấy hợp chất kháng khuẩn bị phân hủy khi đun sôi, tức là không chịu nhiệt.

Nếu giếng 4 không có vòng kháng khuẩn hoặc vòng nhỏ hơn giếng 3, chứng tỏ hợp chất kháng khuẩn có bản chất là protein (vì bị phân hủy bởi protease K).

### **2.2.5. Tách chiết hoạt chất thứ cấp bằng dung môi phân cực**

#### **2.2.5.1. Lựa chọn hệ dung môi tách chiết hoạt chất kháng khuẩn**

Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trong 50 mL môi trường MRS ở 37 °C trong 24 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau thời gian nuôi, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 1200 vòng/phút để thu phần dịch nổi. Dịch này được tiến hành chiết xuất bằng các hệ dung môi có độ phân cực giảm dần như ethyl acetate, n-hexan, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate và methanol với tỷ lệ thể tích nguyên liệu : dung môi là 1:1 [69]. Quá trình chiết được thực hiện hai lần ở nhiệt độ phòng bằng máy lắc trong 1 giờ. Sau đó, dung môi được loại bỏ bằng phương pháp cô quay.

Dịch chiết chứa các hợp chất chuyển hóa thứ cấp được hòa tan trong 1 mL DMSO, sau đó được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên thạch (well diffusion method).

#### **2.2.5.2. Tinh sạch hoạt chất bằng phương pháp sắc ký**

Cột silica gel 60F254 với kích thước 4 x 20 cm được sử dụng để tinh sạch mẫu chứa hoạt chất. 60 g hạt silica gel 60F254 được hòa tan trong methanol để tạo cột. Sau đó, cột được cân bằng với hệ dung môi ethyl acetate. Mẫu chiết ban đầu được đưa lên cột silica gel. Mỗi phân đoạn thu 200 ml. Mẫu được tách bằng hệ dung môi toluen và ethyl acetate tỉ lệ thể tích 3:7. Cuối cùng, mẫu được thổi hoàn toàn bằng methanol. Mẫu thu được sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng chạy trên bản TLC.

#### **2.2.5.3. Phương pháp tủa bằng các tác nhân gây tủa là dung môi hữu cơ ethanol 70%**

Dịch enzyme thô của chủng vi khuẩn được tủa bằng ethanol 70%, cất tủ lạnh -20°C trong 30 phút hoặc 1 tiếng, sau đó ly tâm 12000 rpm trong 15 phút ở 4°C và thu tủa. Tủa thu được phơi khô ở nhiệt độ -4 °C, tiến hành hòa tủa với đệm PBS 1X để xác định hàm lượng protein và hoạt độ của enzyme [8].

#### **2.2.5.4. Kiểm tra sơ bộ độ sạch bằng TLC**

Để đánh giá sơ bộ thành phần và độ tinh khiết của dịch chiết vi sinh vật, phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) được áp dụng với hệ dung môi được lựa chọn dựa trên độ phân cực phù hợp với mẫu.

Dung môi sử dụng: Nhiều hệ dung môi đã được thử nghiệm nhằm tìm ra hệ phù hợp nhất, bao gồm: Methanol : Ethyl acetate (8:2); Hexan : Ethyl acetate (8:2), (6:4), (5:5),

(4:6). Kết quả cho thấy hệ Hexan : Ethyl acetate (6:4) cho khả năng tách vết tốt nhất, với các vết rõ ràng và tách biệt, nên được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Cách tiến hành: Chuẩn bị bản TLC: Sử dụng bản silica gel đã được cắt thành miếng nhỏ kích thước phù hợp. Chấm mẫu: Dùng ống mao dẫn nhỏ chấm một giọt dịch chiết (đã hòa tan trong DMSO hoặc methanol) lên bản TLC, cách mép đáy khoảng 1 cm. Đợi khô trước khi chạy sắc ký. Pha động: Hệ dung môi đã chọn được cho vào buồng sắc ký, lót giấy lọc bão hòa hơi dung môi, và đậy kín nắp. Chạy sắc ký: Đặt bản TLC vào buồng sao cho mép đáy bản nằm dưới mức dung môi. Dung môi sẽ di chuyển lên nhờ mao dẫn, mang theo các hợp chất. Phát hiện vết: Sau khi dung môi lên đến vạch định sẵn (~2/3 chiều dài bản), lấy bản ra, để khô, sau đó quan sát dưới đèn UV (254 hoặc 366 nm) hoặc phun thuốc thử hiện màu nếu cần.

Đánh giá kết quả: Các vết thu được được đo khoảng cách di chuyển và tính giá trị R<sub>f</sub> (Retention factor) để so sánh. Sự hiện diện của một vết duy nhất gợi ý mẫu tương đối tinh khiết, trong khi nhiều vết cho thấy có lẫn tạp hoặc nhiều hợp chất.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* từ các mẫu nem chua ở Việt Nam

##### 3.1.1. Tạo bộ sưu tập các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* từ các mẫu nem chua ở Việt Nam

Trong nghiên cứu này, tổng cộng 91 chủng vi khuẩn lactic đã được phân lập từ hơn 30 mẫu nem chua thu thập tại nhiều địa điểm khác nhau của Việt Nam, bao gồm Quảng Ninh, Phùng, Thanh Hóa, Đông Anh, Phú Thọ, Hà Nội và Nghệ An. Các mẫu được lựa chọn nhằm đảm bảo sự đa dạng về nguồn gốc và điều kiện lên men tự nhiên, từ đó tăng khả năng phát hiện các chủng vi khuẩn có đặc tính hữu ích.

**Bảng 3.1. Kí hiệu và hình thái các chủng phân lập từ các mẫu nem chua**

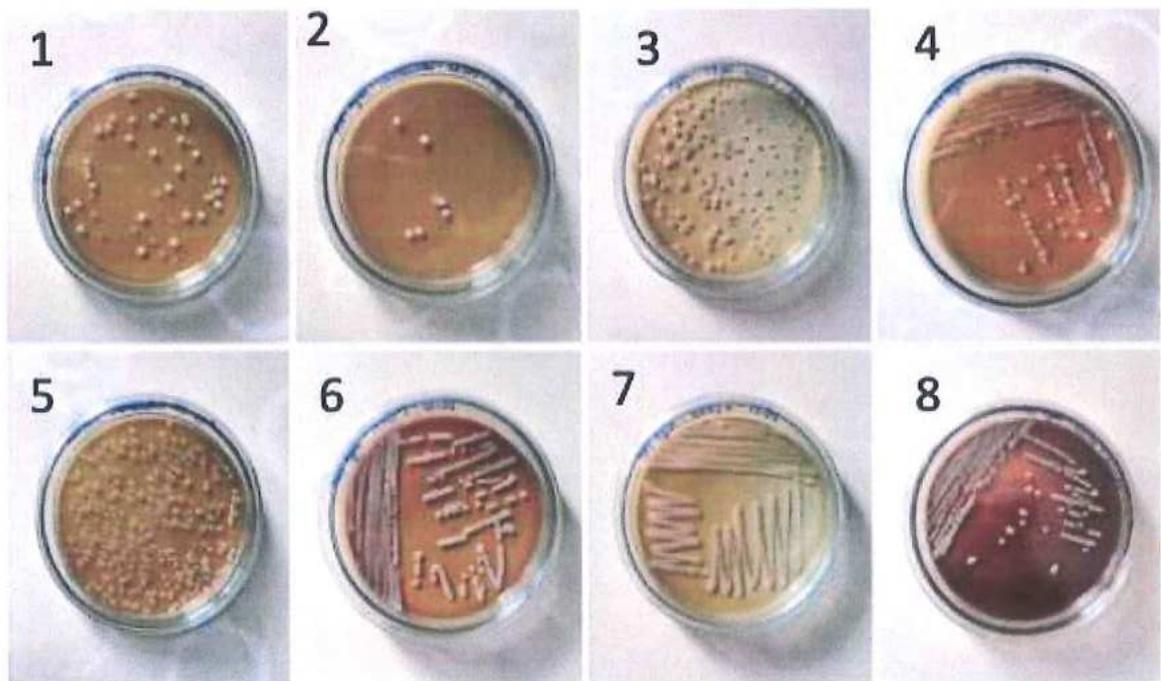
STT	Kí hiệu chủng phân lập	Hình thái khuẩn lạc của chúng
1	ULN1-5	Tròn, trắng ngà, bóng, lồi, bìa nguyên, trơn bóng
2	NPN1-5, HT1-5, QY1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, bìa nguyên, trơn láng
3	SS1-5, NPT1-5, STT1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi bìa nguyên, trơn bóng
4	ULT1-5, UBN1-5	Tròn, trắng đục, bóng, lồi, bìa nguyên, trơn bóng
5	NPT1-5, QNN1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, phẳng, bìa nguyên, trơn láng
6	QYT1-5, TH1-5, HTT1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, phẳng, bìa nguyên, trơn láng
7	THT1-5, PT1-5	Tròn, trắng sữa, lồi, bìa nguyên, trơn bóng
8	NS1-11	Tròn, nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên

*NP: nem Phùng; UL: Ước Lễ; QN: Quảng Ninh; UB: Ưông Bí; QY: Quảng Yên; SS: Sầm Sơn, NS: Nga Sơn; PT: Phú Thọ, N: hình dạng khuẩn lạc nhỏ, T: hình dạng khuẩn lạc to*

Sau khi thu thập, các mẫu nem chua được tiến hành nuôi cấy tăng sinh trong môi trường MRS lỏng. Sau 24 giờ nuôi cấy, dịch nuôi cấy được pha loãng theo hệ số thích hợp và trải đều lên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường MRS agar. Sau 48 giờ ủ ở điều kiện tối ưu, các khuẩn lạc mọc lên trên đĩa thạch được quan sát, làm thuần và kiểm

tra hình thái chung. Kết quả cho thấy, các khuẩn lạc thu được có dạng hình tròn, bề mặt lồi, trơn nhẵn và có độ bóng nhất định. Thông tin chi tiết về kết quả này được trình bày trong Bảng 3.1.

Để đảm bảo tính đồng nhất cũng như xác định chính xác các đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập, quá trình làm sạch được thực hiện bằng phương pháp cấy rìa nhiều lần trên môi trường thạch MRS. Phương pháp này giúp loại bỏ các vi khuẩn tạp nhiễm, đồng thời thu được các khuẩn lạc thuần nhất phục vụ cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

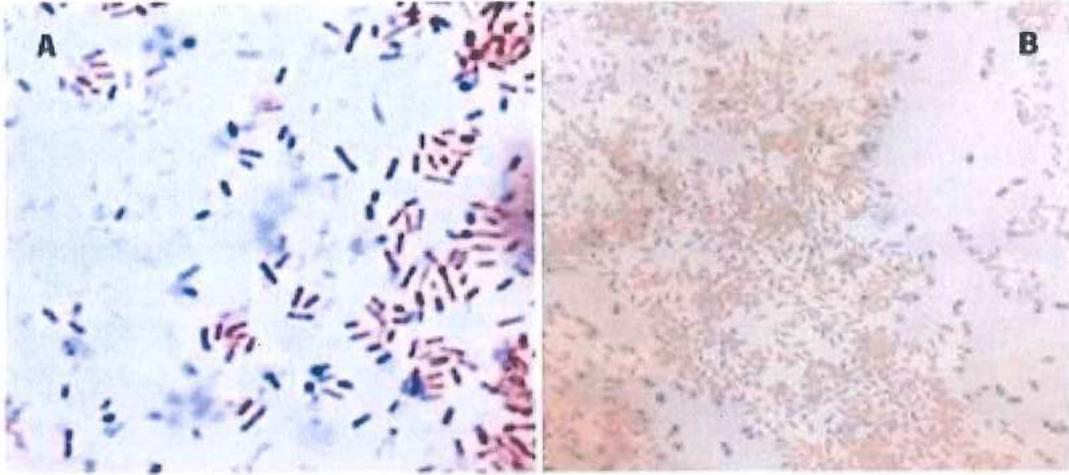


**Hình 3.1. Khuẩn lạc một số chủng vi khuẩn từ mẫu nem chua theo bảng 3.1**

Sau khi được làm sạch, các chủng vi khuẩn này được tiến hành phân loại sơ bộ dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc quan sát trên đĩa thạch và hình dạng tế bào dưới kính hiển vi. Bên cạnh đó, các chủng cũng được sàng lọc sơ bộ dựa trên khả năng kháng khuẩn, với kết quả thử nghiệm vòng kháng khuẩn được trình bày chi tiết trong Bảng 3.2.

Trong số 91 chủng đã phân lập, các chủng có tiềm năng cao sẽ tiếp tục được đánh giá khả năng kháng khuẩn thông qua phương pháp khuếch tán trong giếng thạch. Mức độ ức chế sự phát triển của vi khuẩn chỉ thị được đo lường bằng đường kính (mm) của vùng kháng khuẩn hình thành xung quanh giếng thạch, từ đó xác định mức

độ hiệu quả của từng chủng vi khuẩn lactic trong việc ức chế vi sinh vật gây hại. Sau khi được phân lập, các chủng vi khuẩn lactic tiếp tục được làm thuần nhằm đảm bảo tính đồng nhất về mặt di truyền và loại bỏ các vi khuẩn tạp nhiễm không mong muốn.



**Hình 3.2. Hình thái vi khuẩn được đánh giá từ các khuẩn lạc.**

(A): *Lactobacillus* sp. Gram dương, (B): *Lactobacillus* sp. không hình thành bào tử

Các chủng thuần được kiểm tra dựa trên nhiều tiêu chí khác nhau để xác định chính xác đặc điểm sinh học và phân loại chúng. Trước tiên, đặc điểm hình thái khuẩn lạc được quan sát trên môi trường thạch MRS để xác định các yếu tố như hình dạng, kích thước, màu sắc và bề mặt khuẩn lạc. Tiếp theo, các chủng vi khuẩn được tiến hành nhuộm Gram và soi kính hiển vi để đánh giá hình thái tế bào. Kết quả cho thấy, các chủng thuộc giống *Lactobacillus* đều có hình dạng trực khuẩn, bắt màu Gram dương, không sinh bào tử và không có khả năng di động.

Bên cạnh đó, các thử nghiệm sinh hóa cũng được thực hiện nhằm xác định đặc tính sinh lý của các chủng vi khuẩn này. Khả năng lên men đường được đánh giá thông qua bộ kit API 50 CHL hoặc thử nghiệm lên men đơn giản, giúp xác định kiểu sử dụng carbohydrate đặc trưng của từng chủng. Ngoài ra, các chủng *Lactobacillus* không có hoạt tính catalase, do đó kết quả thử nghiệm catalase đều âm tính (Catalase (-)).

### 3.1.2. Đánh giá hoạt tính kháng một số vi sinh vật gây bệnh

Sau khi hoàn thành các bước xác định trên, các chủng vi khuẩn lactic được kiểm tra khả năng kháng lại một số vi sinh vật gây bệnh phổ biến như *Staphylococcus aureus*. Thử nghiệm khuếch tán trên thạch cho thấy, ba chủng vi khuẩn được phân

lập từ mẫu nem chua Thanh Hóa, ký hiệu NS1, SS3, PT2 có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh này. Những chủng vi khuẩn này có tiềm năng cao trong việc sản sinh các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên, mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng trong bảo quản thực phẩm và phát triển chế phẩm sinh học có lợi cho sức khỏe con người. Kết quả chi tiết của các thử nghiệm sẽ được trình bày trong các bảng số liệu liên quan (Bảng 3.2).

**Bảng 3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn được phân lập**

Tên	Vùng ức chế (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
NS1	6,5	5,5	3,0
SS3	7,0	5,5	3,5
NPT1	2,5	2,5	0,0
STT2	3,0	3,5	1,5
UBN1	2,5	2,0	0,0
QYT2	3,0	4,5	2,4
QNT4	4,5	3,0	1,5
THT3	4,0	2,0	1,0
PT2	4,5	4,5	2,5
NS6	4,5	5,5	2,5
ULN1	3,5	2,5	1,0
TP2	2,5	2,5	1,0

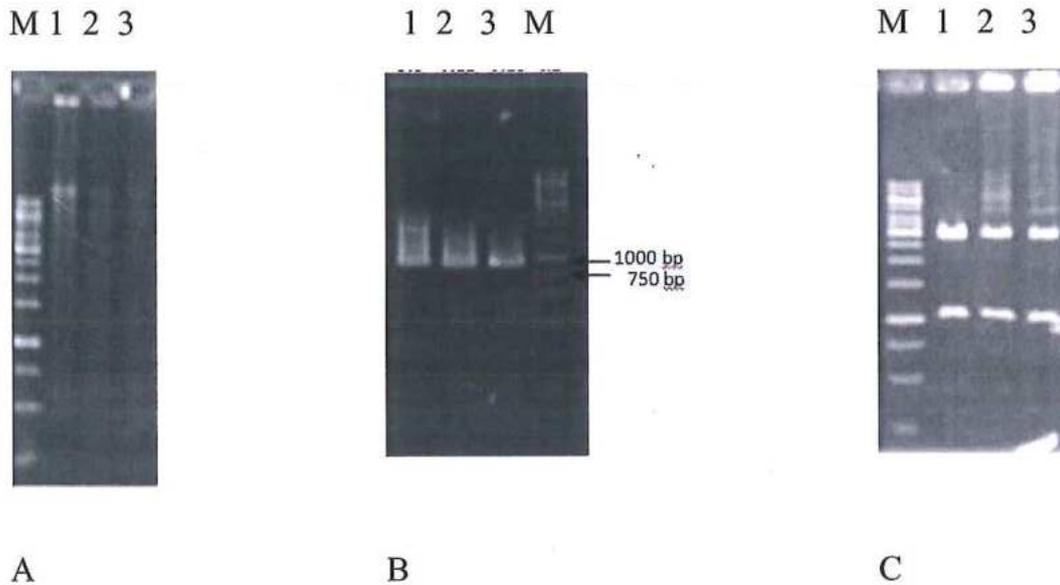
Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của các chủng phân lập nhằm tìm ra các chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất các hợp chất kháng khuẩn, đồng thời tạo tiền đề cho việc mô tả đặc tính trong tương lai. Từ kết quả, chủng *Lactobacillus* SS3, trong số 3 chủng *Lactobacillus* phân lập được chọn, có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất đối với vi khuẩn gây bệnh. Kết quả thực nghiệm cho thấy các chủng này có khả năng sản sinh ra các chất kháng khuẩn có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gram âm *E. coli* và vi khuẩn gram dương *S. aureus* và *B. subtilis*. Tuy nhiên, *S. aureus* có vùng diệt khuẩn rộng hơn nhiều so với hai chủng vi khuẩn kia. Các hoạt chất trong CFS có thể tương tác tốt với màng ngoài của vi khuẩn gram dương. Vi khuẩn gram dương có lớp peptidoglycan

dày trong thành tế bào của chúng, trong khi vi khuẩn gram âm có lớp peptidoglycan nhỏ hơn nhưng có thêm một màng ngoài chứa lipopolysaccharide (LPS).

### 3.1.3. Định danh các chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh

Có 3 chủng có hoạt tính kháng khuẩn tốt, có hình thái của vi khuẩn *Lactobacillus* được chúng tôi lựa chọn để định danh bằng cách đọc và so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA

Sản phẩm DNA tổng số tách chiết từ chủng NS1, SS3, PT2 được điện di kiểm tra trên gel 0,8% agarose. Kết quả ở Hình 3.3A cho thấy DNA tương đối sạch, không bị gãy, đủ điều kiện và chất lượng cho các nghiên cứu nhân dòng và đọc trình tự. Phản ứng PCR được tiến hành với cặp mồi 9F và 926R, sau khi điện di kiểm tra trên gel 0,8% agarose, sản phẩm thu được có kết quả khoảng 917 bp (Hình 3.3 B).



**Hình 3.3. Điện di DNA tổng số (A); Sản phẩm PCR (B); Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng *XhoI* và *XbaI* (C). 1, 2, 3: chủng NS1, SS3, PT2; M: Marker.**

Sản phẩm phản ứng PCR sau khi gắn vào vector pJET1.2/blunt và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH10b đã được tách plasmid, và đem cắt kiểm tra bằng cặp enzyme hạn chế *XhoI* và *XbaI*. Sản phẩm có kích thước khoảng 3000 bp tương ứng với kích thước của vector pJET1.2/blunt, băng còn lại có kích thước khoảng 917 bp tương ứng với đoạn DNA đã chèn vào (Hình 3.3 C).

Plasmid tái tổ hợp mang gen 16S rRNA mong muốn được tách và tinh sạch để xác định trình tự nucleotide. Đoạn gen 16S rRNA của chủng NS1, SS3, PT3 được

xác định trình tự nucleotide trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Sau khi phân tích trình tự và xử lý số liệu trình tự đoạn gene 16S rRNA có chiều dài 917 bp.

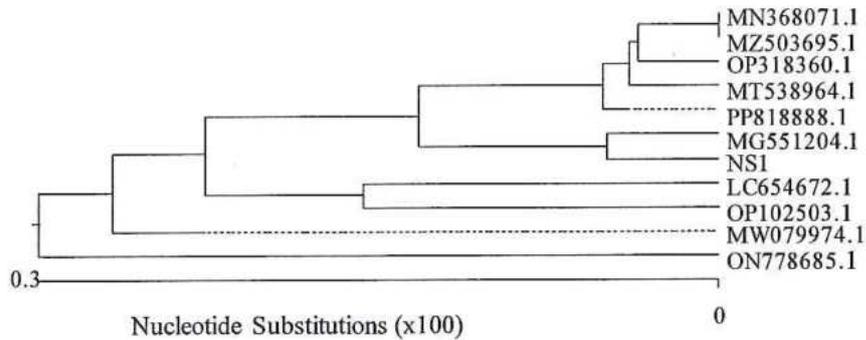
So sánh trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng NS1, SS3, PT2 với trình tự 16S rRNA của các chủng đã được công bố trên GenBank cho thấy, chủng NS1 có độ tương đồng trên 99% với các chủng *Lactobacillus brevis* có mã số tương ứng MG551204.1; PP818888.1; MT538964.1; MN368071.1; ON778685.1; MZ503695.1; MW079974.1; LC654672.1; OP102503.1; PQ303223.1. (Hình 3.4).

**Bảng 3.3 Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng NS1 so với các chủng trên ngân hàng gen**

ST T	Các loài vi khuẩn từ ngân hàng dữ liệu gene của NCBI	Mã số ngân hàng gene	Mức độ tương đồng
1	<i>Levilactobacillus brevis</i> NWAUFU1533	MG551204.1	99.7
2	<i>Levilactobacillus brevis</i> KFE2	PP818888.1	99.7
3	<i>Lactobacillus brevis</i> 8278	MT538964.1	99.7
4	<i>Lactobacillus brevis</i> MG5288	MN368071.1	99.7
5	<i>Levilactobacillus brevis</i> TMPC 4G374	ON778685.1	99.7
6	<i>Levilactobacillus brevis</i> P3 UASWS2545	MZ503695.1	99.7
7	<i>Lactobacillus brevis</i> 11512	MW079974.1	99.7
8	<i>Levilactobacillus brevis</i> ASK-1	LC654672.1	99.6
9	<i>Levilactobacillus brevis</i> MG5059	OP102503.1	99.6
10	<i>Levilactobacillus brevis</i> DC02	PQ303223.1	99.6

Từ kết quả trên ta thấy chủng NS1 có độ tương đồng 99,7% với *Lactobacillus brevis* NWAUFU1533; *L. brevis* KFE2; *L. brevis* 8278; *L. brevis* MG5288; *L. brevis* TMPC 4G374; *L. brevis* P3 UASWS2545; *L. brevis* 11512; và tương đồng 99,6 % so

với chủng *L. brevis* ASK-1; *L. brevis* MG5059; *Levilactobacillus brevis* DC02. Do vậy ta có thể kết luận đây là một chủng thuộc loài *Lactobacillus brevis*



**Hình 3.4.** Cây phân loại chủng NS1 và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng.

NCBI. MG551204.1: *Levilactobacillus brevis* NWAUFU1533; PP818888.1: *Levilactobacillus brevis* KFE2; MT538964.1: *Lactobacillus brevis* 8278; MN368071.1: *Lactobacillus brevis* MG5288; ON778685.1: *Levilactobacillus brevis* TMPC 4G374; MZ503695.1: *Levilactobacillus brevis* P3 UASWS2545; MW079974.1: *Lactobacillus brevis* 11512; LC654672.1: *Levilactobacillus brevis* ASK-1; OP102503.1: *Levilactobacillus brevis* MG5059; PQ303223.1: *Levilactobacillus brevis* DC02.

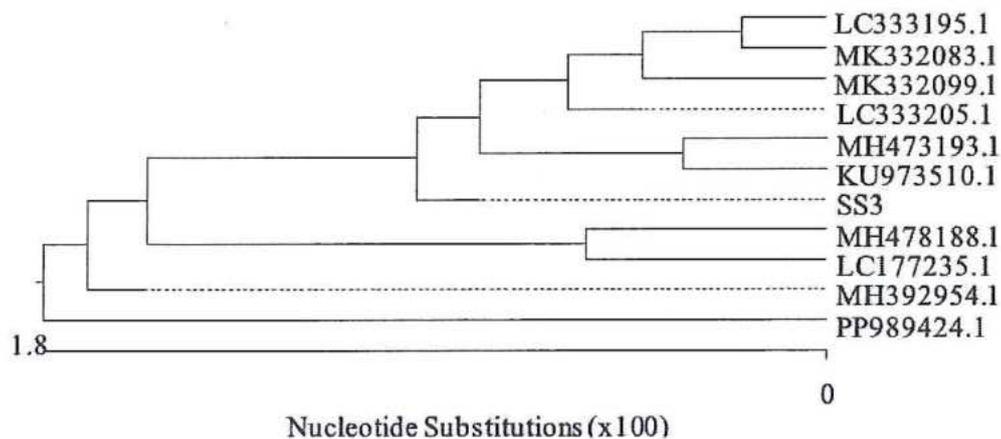
So sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng SS3 với trình tự 16S rRNA của các chủng đã được công bố trên GenBank cho thấy, chủng SS3 có độ tương đồng trên 99 % với các chủng *Lactobacillus plantarum* có mã số tương ứng MH392857.1; MH665782.1; OQ656900.1; MH473193.1; CP166731.1; MH266419.1; PQ683408.1; MN880113.1; CP068767.1; PP989424.1 (Hình 3.5).

**Bảng 3.4.** Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng SS3 so với các chủng trên ngân hàng gen

ST T	Các loài vi khuẩn từ ngân hàng dữ liệu gene của NCBI	Mã số ngân hàng gene	Mức độ tương đồng
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> BH-L1	LC333195.1	99.78
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> PMC67	MK332083.1	99.78

3	<i>Lactobacillus plantarum</i> RKC66	MK332099.1	99.78
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MH478188.1	99.78
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> Wakasa-SU3	LC333205.1	99.78
6	<i>Lactobacillus pentosus</i> L47I-A	KU973510.1	99.67
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> V4S	MH473193.1	99.45
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> HBUAS53269	MH392954.1	99.45
9	<i>Lactobacillus pentosus</i> HBUAS51093	LC177235.1	99.45
10	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> S23Y	PP989424.1	99.45

Từ kết quả trên ta thấy chủng SS3 có độ tương đồng 99,8% với *Lactobacillus plantarum* BH-L1; *Lactobacillus plantarum* PMC67; *Lactobacillus plantarum* RKC66; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus plantarum* Wakasa-SU3 và tương đồng 99,4 % so với chủng *Lactobacillus plantarum* V4S; *Lactobacillus pentosus* HBUAS51093; *Lactobacillus plantarum* HBUAS53269; *Lactiplantibacillus plantarum* S23Y. Do vậy ta có thể kết luận đây là một chủng thuộc loài *Lactobacillus plantarum*.

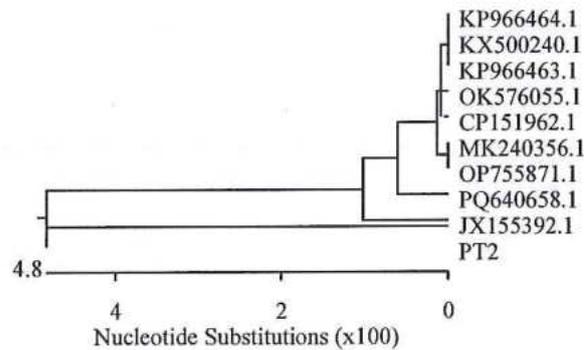


Hình 3.5. Cây phân loại chủng SS3 và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng NCBI.

LC333195.1: *Lactobacillus plantarum* BH-L1; MK332083.1: *L. plantarum* PMC67; MK332099.1: *L. plantarum* RKC66; MH473193.1: *L. pentosus* HBUAS51093; LC333205.1: *L. plantarum* Wakasa-SU3; KU973510.1: *L. pentosus* L47I-A;

MH478188.1: *L. plantarum* V4S; LC177235.1: *L. plantarum*; MH392954.1: *L. plantarum* HBUAS53269; PP989424.1: *Lactiplantibacillus plantarum* S23Y.

Kết quả so sánh trình tự chủng PT2 với trình tự 16S rRNA của các chủng đã được công bố trên GenBank cho thấy, chủng PT2 có độ tương đồng trên 97,6 % với các chủng *Bacillus atrophaeus* A1, *B. atrophaeus* GAU-111, *B. atrophaeus* CM1E6 có mã số tương ứng OP755871.1; MK240356.1; KM874429.1; và 97- 97.4% so với các chủng *Bacillus* sp. J-26, *Bacillus* sp, *Bacillus* sp. J2416-18, *Bacillus* sp. FSL L8-0358; *Bacillus* sp. AB6-6 có mã số tương ứng là: KP966464.1; KX500240.1; OK576055.1; CP151962.1; PQ640658.1. 96.6% so với các chủng *Bacillus* sp. T1D. *Bacillus* sp. T17 có mã số tương ứng là JX155392.1; MH 000675.1 (Hình 3.6).



**Hình 3.6** Cây phân loại chủng PT2 và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng NCBI

OP755871.1: *Bacillus atrophaeus* A1; MK240356.1: *B. atrophaeus* GAU-111; KM874429.1: *B. atrophaeus* CM1E6; KP966464.1: *Bacillus* sp. J-26; KX500240.1: *Bacillus* sp.; OK576055.1: *Bacillus* sp. J2416-18; CP151962.1: *Bacillus* sp. FSL L8-0358; PQ640658.1: *Bacillus* sp. AB6-6; JX155392.1: *Bacillus* sp. T1D; MH 000675.1: *Bacillus* sp. T17.

**Bảng 3.5.** Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng PT2 so với các chủng trên ngân hàng gen

ST T	Các loài vi khuẩn từ ngân hàng dữ liệu gene của NCBI	Mã số ngân hàng gene	Mức độ tương đồng
1	<i>Bacillus atrophaeus</i> A1	OP755871.1	97,6%
2	<i>Bacillus atrophaeus</i> GAU-111	MK240356.1	97,6%
3	<i>B. atrophaeus</i> CM1E6	KM874429.1	97,6%
4	<i>Bacillus</i> sp. J-26	KP966464.1	97,4%

5	<i>Bacillus</i> sp.	KX500240.1	97,4%
6	<i>Bacillus</i> sp. J2416-18	OK576055.1	97,4%
7	<i>Bacillus</i> sp. FSL L8-0358	CP151962.1	97%
8	<i>Bacillus</i> sp. AB6-6	PQ640658.1	97%
9	<i>Bacillus</i> sp. T1D	JX155392.1	96,6%
10	<i>Bacillus</i> sp. T17	MH 000675.1	96,6%

Từ kết quả trên ta thấy chủng PT2 có độ tương đồng 97,6% với *Bacillus atrophaeus* A1; *Bacillus atrophaeus* GAU-111; *B. atrophaeus* CM1E6; và tương đồng 96,6 % đến 97,4 % với *Bacillus* sp. J-26; *Bacillus* sp.; *Bacillus* sp. J2416-18; *Bacillus* sp. FSL L8-0358; *Bacillus* sp. AB6-6; *Bacillus* sp. T1D; *Bacillus* sp. T17. Do vậy ta có thể kết luận đây là một chủng thuộc loài *Bacillus atrophaeus*.

### 3.2. Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn

Để thực hiện nghiên cứu tiếp theo, hai chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 và *Lactobacillus brevis* NS1 được lựa chọn dựa trên khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn tốt hơn.

Một trong những đặc điểm đáng chú ý của các vi khuẩn được phân lập là khả năng chống lại vi khuẩn gây bệnh. Kết quả thử nghiệm cho thấy cả hai chủng NS1 và SS3 đều có thể ức chế sự phát triển của *Staphylococcus aureus* – một loại vi khuẩn thường gây nhiễm trùng. Tuy nhiên, chỉ riêng chủng SS3 mới có khả năng ức chế thêm hai loại vi khuẩn gây bệnh khác là *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli*.

Điều này cho thấy mỗi chủng vi khuẩn phân lập được có thể có tác dụng chọn lọc, chỉ kháng lại một số loại vi khuẩn nhất định. Trong đó, chủng SS3 nổi bật hơn cả vì có thể chống lại nhiều loại vi khuẩn gây bệnh khác nhau, kể cả những vi khuẩn cùng nhóm. Kết quả này cho thấy chủng SS3 có tiềm năng lớn để phát triển thành chất kháng khuẩn tự nhiên dùng trong bảo quản thực phẩm hoặc hỗ trợ điều trị bệnh.

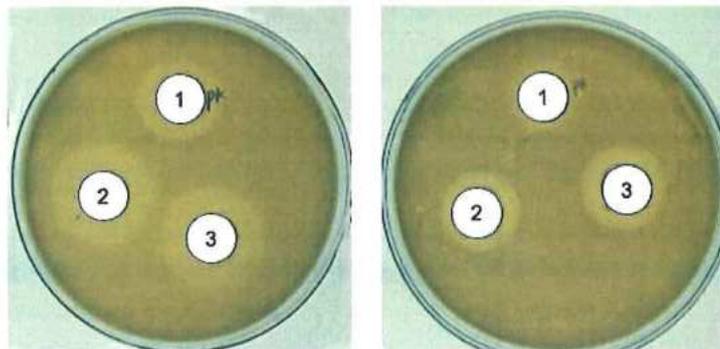
Các hợp chất trong CFS có thể nhắm đến cấu trúc màng tế bào, làm tăng tính thấm và gây ly giải tế bào vi khuẩn. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây [71], [72], trong đó chỉ ra rằng vi khuẩn gram âm có cơ chế nhạy cảm hơn với các hợp chất kháng khuẩn.

### 3.2.1. Khả năng chịu nhiệt và tính bền vững trước enzym phân giải protein của dịch chiết từ các chủng vi khuẩn

Để xác định sơ bộ xem hoạt chất kháng khuẩn từ hai chủng vi khuẩn đã chọn là peptide kháng khuẩn hay hợp chất thứ cấp, chúng tôi sử dụng enzyme proteinase K nhằm bất hoạt hoàn toàn các peptide có trong dịch nuôi cấy của hai chủng, sau đó đánh giá hoạt tính kháng khuẩn. Nếu chủng vẫn còn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn sau khi xử lý enzyme, điều đó chứng tỏ chúng có khả năng sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp.

Proteinase K được bổ sung vào các mẫu vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp đã trình bày. Kết quả cho thấy hợp chất kháng khuẩn vẫn duy trì hoạt tính sau 45 phút ủ ở 55°C với proteinase K (hình 3.7). Phát hiện này khẳng định rằng hợp chất kháng khuẩn do hai chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 và *Lactobacillus brevis* NS1 tạo ra bao gồm cả hoạt chất thứ cấp. Hoạt tính kháng khuẩn bị giảm đi khi xử lý bằng Protease K ở dịch chiết cả hai mẫu NS1 và SS3 chứng tỏ chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 và *Lactobacillus brevis* NS1 ngoài khả năng sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp còn có khả năng sinh peptide kháng khuẩn.

Dựa vào khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn của hai chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 và *Lactobacillus brevis* NS1, chúng tôi chọn chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



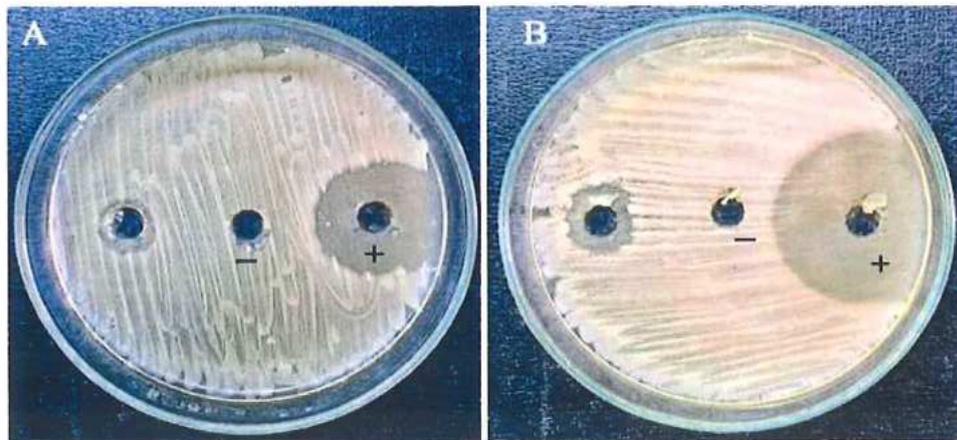
*Lactobacillus plantarum* SS3      *Lactobacillus brevis* NS1

**Hình 3.7** Hoạt tính kháng khuẩn *S. aureus* của hợp chất sau khi xử lý nhiệt và proteinase K. Giếng 1: Dung dịch nổi (CFS) được ủ ở 100 °C + protease K; giếng 2: Dung dịch nổi (CFS) được ủ ở 100 °C; giếng 3: Dung dịch nổi (CFS) ban đầu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của mẫu thử bị suy giảm khi xử lý bằng proteinase K. Điều này chứng tỏ rằng hợp chất kháng khuẩn không chỉ chứa bacteriocin mà còn có sự góp mặt của các chất chuyển hóa thứ cấp. Phát hiện này hoàn

toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó của Reis [73], trong đó nhấn mạnh rằng bacteriocin thường bị phân hủy bởi enzyme proteinase K, trong khi các chất chuyển hóa thứ cấp lại nhạy cảm với sự thay đổi của pH môi trường.

Tiếp tục thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn với 2 chủng vi khuẩn gây bệnh còn lại. Các hoạt chất do chủng SS3 sản sinh ra cho thấy hoạt tính ức chế đối với tất cả các vi khuẩn gây bệnh được sử dụng trong nghiên cứu này, bao gồm hai vi khuẩn gram dương *B. subtilis* và vi khuẩn gram âm (*E. coli*). Kết quả nghiên cứu chứng minh rằng hoạt chất từ các chủng phân lập có hoạt tính kháng khuẩn phổ tương đối rộng.

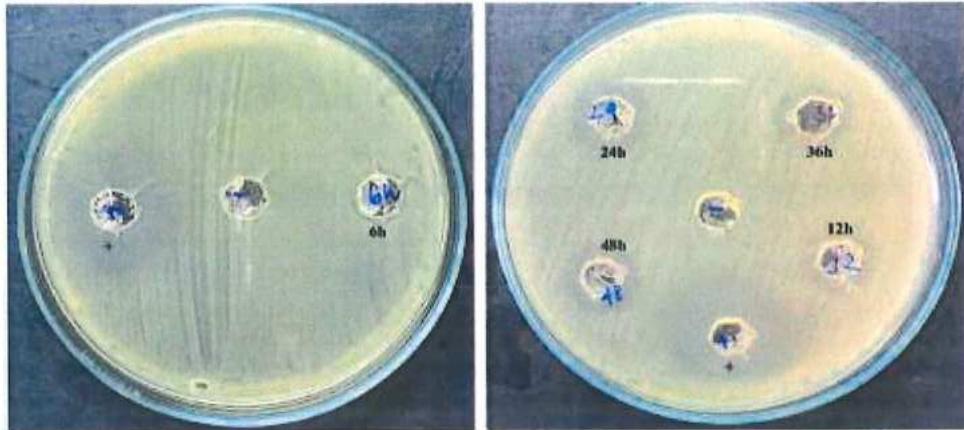


**Hình 3.8. Khả năng kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum* SS3 đối với hai chủng vi khuẩn. *E. coli* (A) và *Bacillus subtilis* (B)**

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 thể hiện khả năng kháng khuẩn đối với cả vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* và hai vi khuẩn Gram dương là *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis*. Tuy nhiên, mức độ ức chế không đồng đều giữa các chủng, trong đó vùng ức chế đối với *S. aureus* lớn hơn đáng kể so với *E. coli* và *B. subtilis*. Điều này cho thấy hợp chất kháng khuẩn do chủng SS3 sinh ra có khả năng tác động mạnh hơn lên màng tế bào của *S. aureus*. Dựa trên hiệu quả kháng khuẩn nổi bật này, *S. aureus* đã được lựa chọn làm đối tượng thử nghiệm chính trong các thí nghiệm tiếp theo nhằm đánh giá đặc tính của các hợp chất kháng khuẩn. Bên cạnh đó, đặc điểm hoạt tính kháng khuẩn quan sát được cho thấy khả năng hợp chất này có thể thuộc nhóm bacteriocin.

### 3.2.2. Thời gian nuôi cấy thích hợp để sản xuất hợp chất kháng khuẩn

Nhằm xác định thời điểm sinh trưởng tối ưu để vi khuẩn tạo ra hợp chất kháng khuẩn, các vùng ức chế vi khuẩn được đo tại các mốc thời gian 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ sau khi nuôi cấy.



**Hình 3.9.** Sự biến đổi hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 đối với các vi khuẩn gây bệnh theo thời gian nuôi cấy.

Kết quả cho thấy vùng ức chế vi khuẩn đạt kích thước lớn nhất sau 24 giờ ù, tương ứng với giá trị mật độ quang học (OD) đạt 3,94. Sau thời điểm này, sản lượng hợp chất kháng khuẩn có xu hướng giảm nhẹ. Đường kính vùng kháng khuẩn tăng nhanh trong khoảng 0 đến 24 giờ, sau đó giảm dần ở các thời điểm tiếp theo. Sự phát triển của tế bào vi khuẩn cũng ghi nhận mức tăng đáng kể trong 24 giờ đầu, và tiếp tục tăng nhẹ từ 24 đến 48 giờ. Các giá trị OD được trình bày là trung bình của ba lần đo lặp nhằm đảm bảo độ tin cậy và tính chính xác của dữ liệu. Những kết quả này được thể hiện trực quan trong Hình 3.9 thông qua kích thước vùng kháng khuẩn, trong khi Hình 3.10 mô tả chi tiết và khách quan sự biến đổi của quá trình phát triển vi khuẩn theo thời gian.



**Hình 3.10.** Mối liên hệ giữa sự phát triển và khả năng tạo vùng kháng khuẩn tối ưu của chủng *Lactobacillus plantarum* SS3.

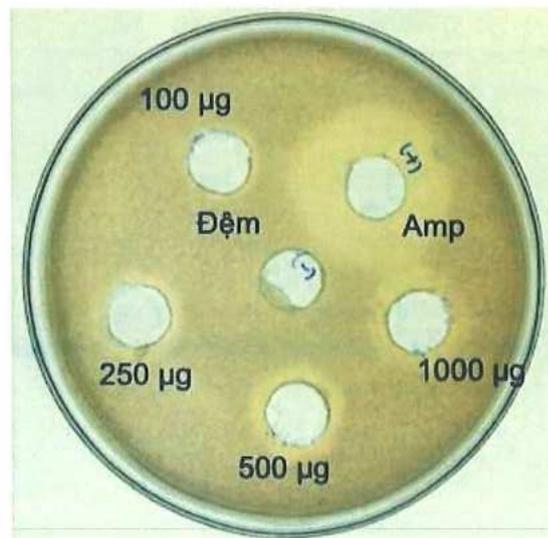
Thời gian nuôi cấy tối ưu được xác định là 24 giờ, thời điểm mà vi khuẩn bước vào pha logarit và đạt tốc độ sinh trưởng cao nhất. Trong giai đoạn này, vi khuẩn đồng thời tổng hợp một lượng lớn các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học mạnh, bao gồm các chất kháng khuẩn.

Mặc dù mật độ tế bào tiếp tục tăng sau 24 giờ, hoạt tính kháng khuẩn lại có xu hướng giảm. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy hoặc sự tích tụ các yếu tố bất lợi (như pH, chất chuyển hóa ức chế), từ đó làm suy giảm quá trình sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn.

### 3.3. Tinh sạch sơ bộ và đánh giá một số tính chất của hoạt chất kháng khuẩn.

#### 3.3.1. Phân tách sơ bộ Peptide có khả năng kháng khuẩn

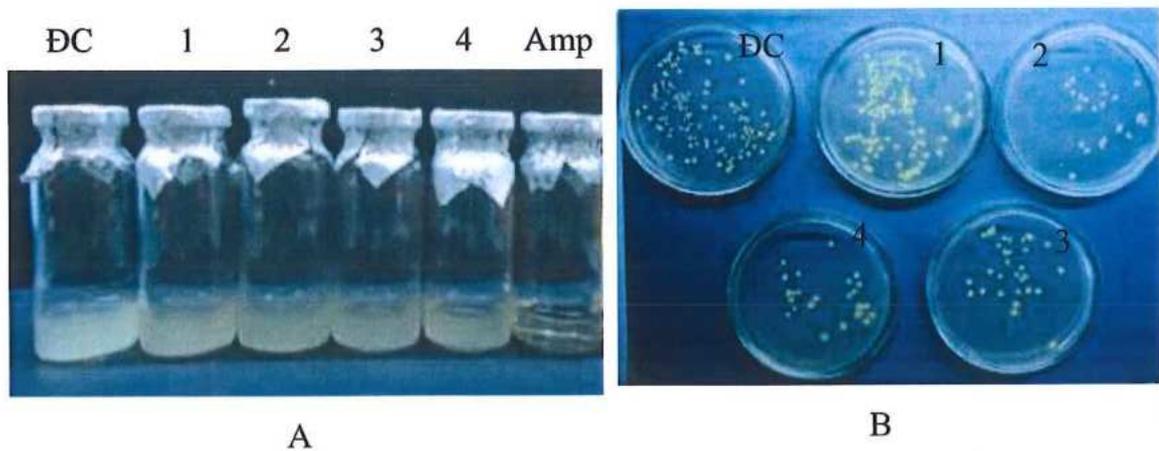
Để phân tách sơ bộ các bacteriocin có khả năng kháng khuẩn, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng ethanol 70% để tủa protein và peptide có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn SS3. 30 ml dịch nuôi cấy được bổ sung 70 ml ethanol, dung dịch sau đó được tủa trong đá lạnh trong vòng 1 giờ. Tủa thu được sau khi ly tâm 15 000 vòng/ phút, làm khô và pha vào dung dịch đệm phosphate pH7. Các protein và peptide còn lại được thử hoạt tính kháng khuẩn.



**Hình 3.11. Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương *S. aureus*. Protein tổng số tương ứng 100-250-500-1000 µg**

Hoạt tính kháng *S. aureus* của dịch protein thu được trong dịch chiết tế bào được kiểm tra theo phương pháp vòng kháng khuẩn. Như vậy, peptide tách chiết được có hoạt tính kháng khuẩn.

Để xác định nồng độ ức chế dịch protein chứa peptide được bổ sung trực tiếp vào dịch nuôi cấy *S. aureus* ở các nồng độ 100-250-500-1000  $\mu\text{g}$  protein tổng số. Đối chứng lọ nuôi không bổ sung dịch biểu hiện (ĐC) đục hơn so với các lọ nuôi có bổ sung dịch biểu hiện (Hình 3.12A)



**Hình 3.12. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch protein tổng số trên *S. aureus* theo từng nồng độ.** (ĐC: mẫu đối chứng âm, 1- 4: mẫu nuôi cấy *S.aureus* có bổ sung dịch chiết tế bào với nồng độ lần lượt 100-250-500-1000  $\mu\text{g}$  protein tổng số, Amp: mẫu nuôi cấy *S.aureus* bổ sung 50  $\mu\text{g}$  ampicilin.)

Đồng thời kết quả trên đĩa thạch cũng cho thấy ở nồng độ 100  $\mu\text{g}$  đã ức chế được khoảng 60%, ở nồng độ cao hơn số khuẩn lạc mọc trên đĩa giảm tương ứng với khả năng ức chế tăng dần, ở nồng độ 1000  $\mu\text{g}$  đã ức chế được tới 90% *S. aureus* (Hình 3.12B). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đó về tác dụng kháng khuẩn của peptide kháng khuẩn (AMPs) đối với *S. aureus*. Chẳng hạn, nghiên cứu của Jenssen đã cho thấy các AMPs có thể ức chế sự phát triển của *S. aureus* với hiệu quả phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tiếp xúc [74]. Một nghiên cứu khác của Hancock & Sahl cũng chỉ ra rằng các peptide kháng khuẩn hoạt động chủ yếu bằng cách phá hủy màng tế bào vi khuẩn, gây rò rỉ các thành phần nội bào và dẫn đến chết tế bào [75].

Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Mishra (2011) peptide kháng khuẩn có thể ức chế tới 95% sự phát triển của *S. aureus* ở nồng độ khoảng 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tương tự với kết quả của chúng tôi [76]. Điều này cho thấy rằng peptide trong nghiên cứu hiện tại có thể có cơ chế tác động tương tự với các AMPs đã được công bố.

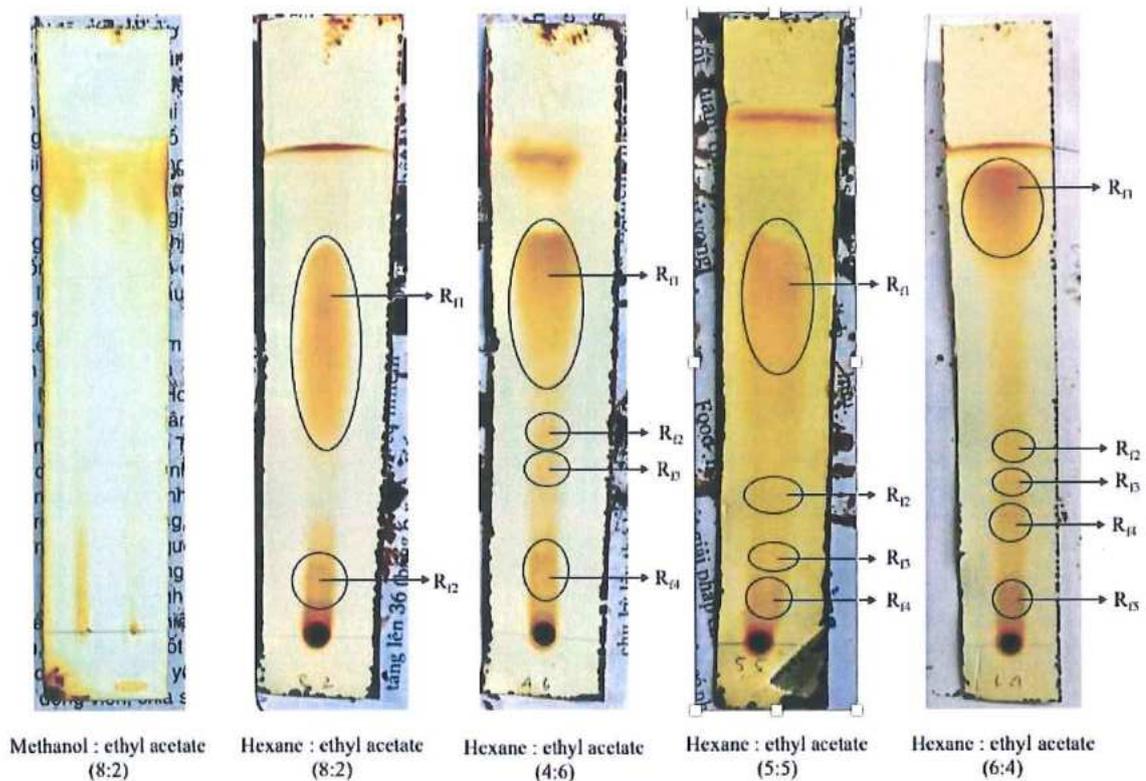
Tuy nhiên, hiệu quả ức chế của peptide có thể khác nhau tùy thuộc vào loại peptide, điều kiện môi trường nuôi cấy và đặc điểm chủng vi khuẩn. Chẳng hạn,

ngiên cứu của Bahar & Ren cho thấy một số AMPs có thể hoạt động tốt hơn trong môi trường có pH thấp hoặc chứa ion kim loại nhất định [77]. Do đó, cần có thêm nghiên cứu để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố này đến hiệu suất của peptide đang nghiên cứu.

### 3.3.2. Tách chiết hoạt chất thứ cấp bằng dung môi phân cực

#### 3.3.2.1. Lựa chọn hệ dung môi để chiết xuất kháng sinh

Một lượng 20  $\mu\text{L}$  từ mỗi mẫu chiết xuất được nhỏ lên bản mỏng (TLC) bằng micropipette, sau đó tiến hành xông hơi bằng iốt để hiển thị các vết. Kết quả nghiên cứu hệ dung môi sử dụng nhằm đánh giá khả năng phân tách các thành phần hoạt tính thứ cấp từ chiết xuất kháng sinh thô được trình bày trong Hình 3.13.



**Hình 3.13. Kết quả TLC với các hệ dung môi khác nhau**

Khi chạy hệ dung môi methanol : etyl axetat (8:2), mẫu được kéo lên đến vạch đích trên sắc ký đồ. Với hệ dung môi hexan : etyl axetat (8:2), mẫu bị tách thành hai vệt dài, tạo điều kiện cho các tạp chất bám vào. Trong hai hệ dung môi hexan : etyl axetat (4:6) và hexan : etyl axetat (5:5), vẫn xuất hiện một vệt kéo dài gần vạch đích trên tấm TLC. Ngược lại, khi sử dụng hệ dung môi hexan : etyl axetat (6:4), mẫu được tách thành các vệt rõ ràng. Do đó, chúng tôi chọn hệ dung môi này để tiếp tục

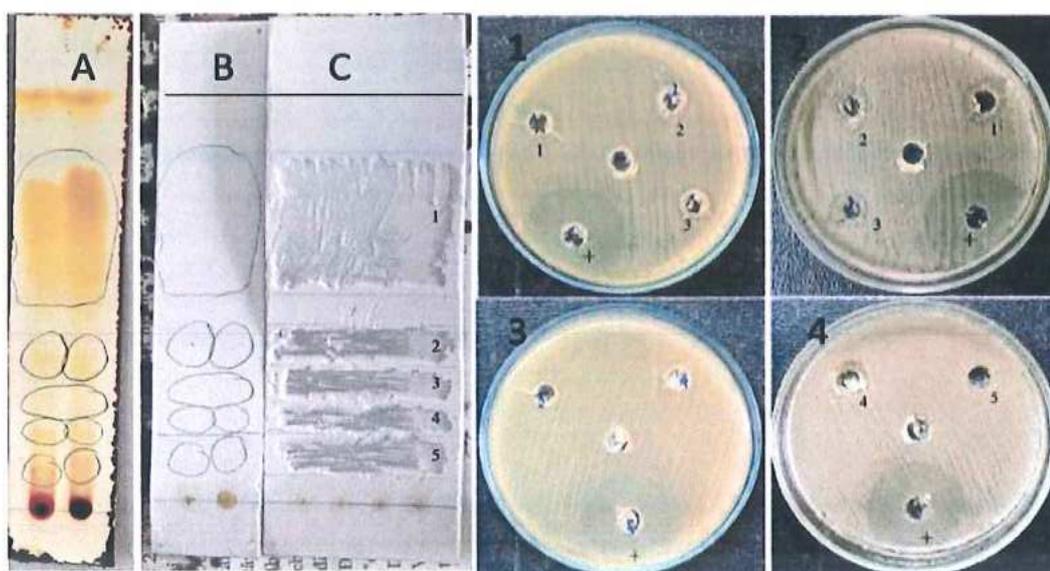
nghiên cứu và thực hành phương pháp sắc ký cột. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Bhattacharya, trong đó chỉ ra rằng việc lựa chọn hệ dung môi thích hợp là yếu tố quan trọng quyết định hiệu suất tách và tinh chế hợp chất sinh học [78]. Ngoài ra, nghiên cứu của Pavia cũng nhấn mạnh rằng việc tối ưu tỷ lệ dung môi trong sắc ký lớp mỏng giúp cải thiện đáng kể độ tinh khiết của hợp chất đích trước khi áp dụng sắc ký cột [79]. Do đó, việc lựa chọn hệ dung môi hexan : etyl axetat (6:4) là phù hợp nhằm đạt hiệu quả tinh chế cao nhất. Kết quả  $R_f$  được trình bày trong bảng 3.6

**Bảng 3. 6. Khả năng tách kháng sinh của các hệ dung môi khác nhau trên TLC**

No.	Hệ thống dung môi	$R_f$ value				
		$R_{f1}$	$R_{f2}$	$R_{f3}$	$R_{f4}$	$R_{f5}$
1	Methanol : ethyl acetate (8:2)	6,75/7				
2	Hexane : ethyl acetate (8:2)	4,5/7	1/7			
3	Hexane : ethyl acetate (4:6)	5,8/7	3,2/7	2,5/7	1/7	
4	Hexane : ethyl acetate (5:5)	5/7	2,1/7	1,7/7	1/7	
5	Hexane : ethyl acetate (6:4)	6,6/7	3,1/7	2,5/7	1,9/7	1/7

### 3.3.2.2. Xác định vạch kháng khuẩn của hoạt chất thứ cấp

Chỉ có ba giá trị vị trí  $R_{f1}$ ,  $R_{f2}$  và  $R_{f3}$  có hoạt tính kháng khuẩn rõ ràng trong số năm vùng riêng biệt được cạo để thử nghiệm hoạt tính (thể hiện ở Hình 3.14).



**Hình 3.14. Khả năng kháng khuẩn của các giá trị  $R_f$**

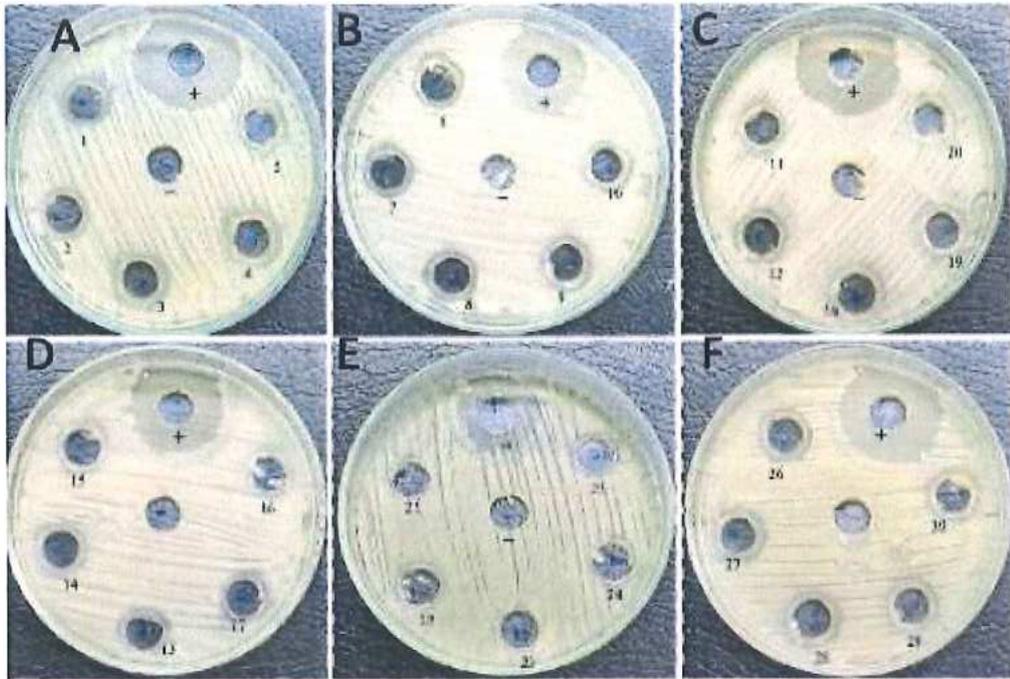
A: Xông Iot, B: Không xông Iot, C: Mẫu sau khi cạo sau đó được kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn; 1, 2, 3, 4 mẫu cạo số 1, 2, 3, 4, 5 được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn.

Giá trị  $Rf_1$  có vòng kháng khuẩn rộng nhất, nhưng dựa trên kết quả khi chạy TLC, chúng tôi không chọn vì nó quá gần vạch đích, do đó thời gian rửa giải nhanh và dễ bị lẫn tạp chất khác (thể hiện ở Hình 3.14). Với các giá trị  $Rf_2$ ,  $Rf_3$ , chúng tôi chọn vạch thứ hai vì nó có vòng kháng khuẩn rộng hơn, ngoài ra  $Rf_2 = 3,1/7$  thời gian rửa sẽ vừa phải và các vạch cũng tách biệt rõ ràng và không dính vào nhau. Vì vậy, vạch thứ hai này được sử dụng cho sắc ký cột để tách và tinh chế các tiểu đơn vị hoạt chất thứ cấp trong dịch chiết chủng vi khuẩn.

Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về việc lựa chọn vạch TLC tối ưu trong quá trình tinh chế hợp chất kháng khuẩn. Chẳng hạn, nghiên cứu của Betts đã chỉ ra rằng các vạch có giá trị  $Rf$  trung bình thường cho hiệu suất tách tốt hơn so với các vạch quá gần điểm xuất phát hoặc quá gần đầu dung môi [80]. Tương tự, nghiên cứu của Kumar & Bhardwaj cũng ghi nhận rằng việc chọn vạch TLC dựa trên sự tách biệt rõ ràng giúp cải thiện đáng kể hiệu suất tinh chế bằng sắc ký cột, giảm nguy cơ lẫn tạp chất và nâng cao độ tinh khiết của hợp chất đích [81]. Ngoài ra, việc chọn vạch  $Rf$  dựa trên sự kết hợp giữa khả năng kháng khuẩn và đặc tính tách biệt rõ ràng cũng được hỗ trợ bởi các nghiên cứu của Singh và cộng sự, trong đó nhấn mạnh rằng các hợp chất có vòng kháng khuẩn lớn trên TLC thường có tiềm năng ứng dụng cao hơn trong kiểm soát vi khuẩn gây bệnh [82]. Do đó, việc chọn vạch  $Rf_2$  cho quá trình tinh chế là quyết định hợp lý nhằm đảm bảo hiệu quả kháng khuẩn tốt nhất trong các điều kiện nghiên cứu.

### **3.3.2.3. Chiết xuất và tinh chế các chất chuyển hóa thứ cấp**

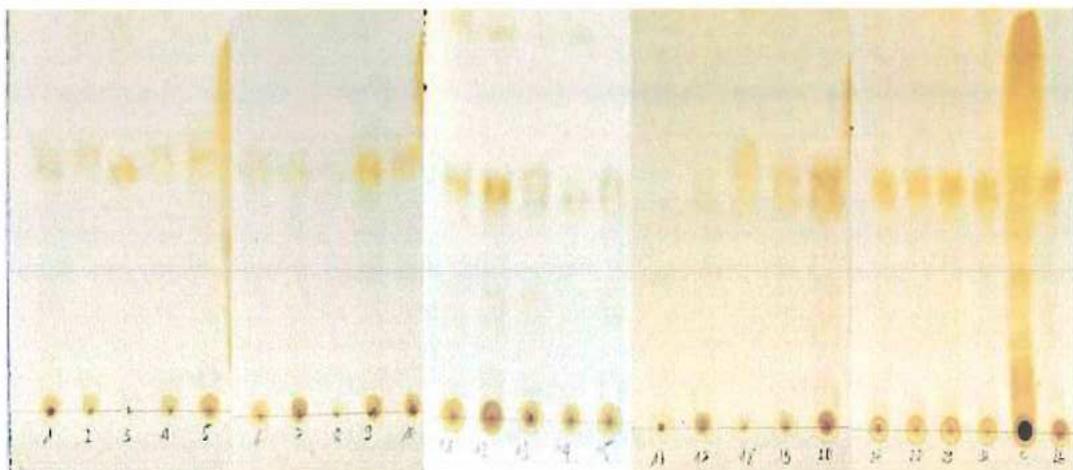
Sắc ký cột được chạy bằng dung môi hexan và etyl axetat (6:4) ở áp suất thường. Tốc độ rửa là 1ml/phút, thu dịch rửa giải vào 30 ống nghiệm, mỗi ống có 2ml. Dịch rửa giải được cô đặc và thử hoạt tính. Kết quả cho thấy hầu hết các ống đều có hoạt tính, ngoại trừ các ống nghiệm từ 21 đến 25 có hoạt tính không rõ ràng.



**Hình 3.15. Hoạt tính kháng khuẩn của 30 phân đoạn**

A: phân đoạn từ 1 đến 5, B: phân đoạn từ 6 đến 10, C: phân đoạn từ 11, 12, 18,19,20, D: phân đoạn từ 13 đến 17, E: phân đoạn từ 21 đến 25, F: phân đoạn từ 26 đến 30.

TLC đã được chạy trên tất cả các ống có hoạt tính kháng khuẩn và thấy rằng trong các ống từ 11 đến 20, các điểm vẫn dính vào nhau, gần nhau và các điểm không rõ ràng. Chỉ có các ống từ 1 đến 10 (phân đoạn 1) và 26 đến 30 (phân đoạn 2) có sự tách biệt tốt nhất, với các chất tách ra xa nhau và có thể nhìn thấy. Đối với các phân đoạn đã chọn,  $R_f = 3,5/7$ , gần bằng  $R_f$  của dòng thứ hai mà chúng tôi đã chọn để tinh chế ở trên. Kết quả chạy TLC được hiển thị trong Hình 3.16.

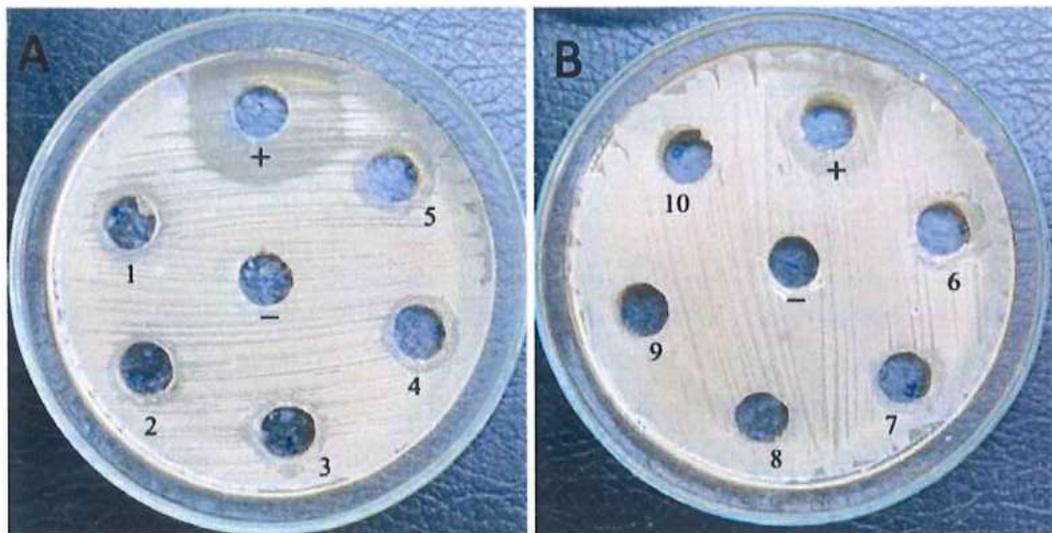


**Hình 3.16. Phân tích các phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp TLC**

Với kết quả này, chúng tôi đã tinh chế thành công hoạt chất thứ cấp sơ bộ. Gộp các ống nghiệm 1 đến 10 thành 1 ống và 26 đến 30 thành 1 ống rồi thử hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả cho thấy cả hai ống đều có hoạt tính kháng khuẩn mạnh.

### 3.3.3. Ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng khuẩn

Khi điều chỉnh pH của dịch chiết CFS từ chủng *L. plantarum* SS3 trong khoảng từ pH 1 đến pH 10, kết quả cho thấy hoạt tính kháng khuẩn được duy trì ổn định trong khoảng pH 1–7. Tuy nhiên, khi pH tăng lên 8, hoạt tính kháng khuẩn giảm rõ rệt và hoàn toàn không còn được ghi nhận ở pH 9 và 10. Nhằm kiểm tra giả thuyết cho rằng trong điều kiện kiềm, các hợp chất kháng khuẩn có thể bị phân cực và chuyển sang pha nước, dẫn đến sự thay đổi về vị trí tác động mà vẫn duy trì hiệu quả kháng khuẩn, chúng tôi đã tiến hành đánh giá hoạt tính kháng khuẩn trong pha nước. Kết quả cho thấy không phát hiện được bất kỳ hoạt tính kháng khuẩn nào trong pha này (thể hiện trong Hình 3.17).



**Hình 3.17. Ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng khuẩn của hợp chất thứ cấp.**  
( A: pH từ 1 đến 5, B: pH từ 6 đến 10 )

Điều này chỉ ra rằng chiết xuất CFS chứa các hợp chất kháng khuẩn ổn định trong môi trường axit và trung tính (pH 1-7), nhưng trở nên không ổn định hoặc không hiệu quả trong điều kiện kiềm (pH  $\geq$  8). Kết quả này cho thấy các chất chuyển hóa thứ cấp có thể rất nhạy cảm với những thay đổi về pH, đặc biệt là trong điều kiện kiềm, dẫn đến biến tính hoặc thay đổi cấu trúc, làm mất đặc tính kháng khuẩn.

Nghiên cứu của Var và cộng sự đã cho thấy rằng nhiều hợp chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ vi sinh vật chỉ duy trì hoạt tính tối ưu trong khoảng pH hẹp, thường là từ pH 4 đến 7 [83]. Tương tự, nghiên cứu của Ghosh và cộng sự đã báo cáo rằng các peptide kháng khuẩn thường mất hoạt tính khi pH môi trường vượt quá 8, do sự phá vỡ liên kết hydro và thay đổi cấu trúc bậc hai của protein [84]. Ngoài ra, theo một nghiên cứu của Martínez sự thay đổi pH có thể ảnh hưởng đến điện tích của các phân tử hoạt tính, làm giảm khả năng tương tác với màng tế bào vi khuẩn, từ đó làm suy giảm hiệu quả kháng khuẩn [85]. Những phát hiện này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tối ưu hóa điều kiện môi trường khi ứng dụng các hợp chất kháng khuẩn, đặc biệt là trong sản xuất chế phẩm sinh học và dược phẩm.

Các kết quả nghiên cứu đã xác định hợp chất kháng khuẩn thứ cấp từ *Lactobacillus SS3*, có khả năng ức chế *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis*. Hợp chất này được phân lập sơ bộ thông qua phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký cột. Đáng chú ý, hoạt tính của hợp chất bị giảm khi có mặt enzyme proteinase K và có tính bền nhiệt, cho thấy đây là một chất chuyển hóa thứ cấp và cả bacteriocin. Những phát hiện này góp phần quan trọng vào việc xác định các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên, mở ra tiềm năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm và y học, đồng thời đáp ứng nhu cầu của ngành công nghiệp thực phẩm đối với các chất bảo quản tự nhiên..

## CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1. KẾT LUẬN

Từ 30 mẫu nem chua được thu thập tại các cơ sở sản xuất nem chua khác nhau trên cả nước, nghiên cứu đã phân lập được tổng cộng 91 chủng vi sinh vật. Trong đó, có 12 chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn như *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli*. Có 3 chủng thể hiện hoạt tính mạnh nhất được định danh bằng phương pháp so sánh trình tự gen 16S rRNA là *Lactobacillus plantarum* SS3, *Lactobacillus brevis* NS1 và *Bacillus* PT2.

Đã tinh sạch sơ bộ hoạt chất kháng khuẩn từ chủng có hoạt tính mạnh nhất là *Lactobacillus plantarum* SS3 và xác định được chủng này có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin và hợp chất thứ cấp. *L. plantarum* SS3 sinh tổng hợp hợp chất kháng khuẩn có giá trị  $R_f = 3,5/7$ , trong hệ dung môi hexan : etyl axetat = 6:4. Những đặc điểm này cho thấy tiềm năng ứng dụng cao của chủng *L. plantarum* SS3 trong bảo quản thực phẩm và sản xuất chế phẩm sinh học an toàn

### 4.2. KIẾN NGHỊ

Từ kết quả cho thấy chủng *Lactobacillus plantarum* SS3 có khả năng sinh tổng hợp bacteriocin với hoạt tính kháng khuẩn mạnh, đặc biệt đối với *Staphylococcus aureus*, nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào hai hướng chính:

Tối ưu hóa điều kiện sản xuất bacteriocin: Cần xác định các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp như pH, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy, thành phần môi trường... nhằm nâng cao hiệu suất và ổn định chất lượng hợp chất trong điều kiện sản xuất quy mô phòng thí nghiệm và hướng tới ứng dụng thực tế.

Xác định cấu trúc phân tử của bacteriocin: Việc làm rõ cấu trúc hóa học sẽ giúp hiểu rõ bản chất, cơ chế tác động cũng như khả năng ứng dụng của bacteriocin trong các lĩnh vực như bảo quản thực phẩm và phát triển các chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh truyền thống.

Hai định hướng này sẽ góp phần nâng cao giá trị ứng dụng của chủng *L. plantarum* SS3, đồng thời mở rộng tiềm năng phát triển các sản phẩm sinh học an toàn và hiệu quả trong công nghiệp thực phẩm và y sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Parada J. L., Caron C. R., Medeiros A. B. P., Soccol C. R., 2007, Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (3), pp.521-542
2. Molognoni L., Daguer H., Motta G. E., Merlo T. C., Lindner J. D. D., Interactions of preservatives in meat processing: Formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents, *Food Research International*, vol. 125, p. 108608, doi: 10.1016/j.foodres.2019.108608.
3. Yang S. C., Lin C. H., Sung C. T., Fang J.Y., 2014, Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals, *Frontiers in Microbiology*, 5, p. 241.
4. Fardet A., Rock E., 2018, In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence, *Nutrition Research Reviews*, 31, 52-70
5. Carr J. G., Cutting C. V., and Whiting G. C., 2022, Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, *Boston, MA: Springer*, 2002. doi: 10.1007/978-1-4615-0711-8.
6. Nes I. F., Diep D. B., Ike Y., 2007, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5): 675-690.
7. Gabrielsen C., Brede D. A., Nes I. F., Diep D. B., 2014, Antimicrobial peptides produced by bacteria: The bacteriocins, *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, 2014, pp. 1-12.
8. Klaenhammer T. R., 1988, Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 70(3), pp. 337-349.
9. Davidson H. R., Hill J. M., 2019, Post-translational modifications in circular bacteriocins, *Microbial Biotechnology*, 12(2), pp. 150-162.
10. Pérez-Ramos S., Callejo A. M. F., Martín-Platero J. M., 2020, Enterocin AS-48 and its role in food preservation, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 85, ( 5), pp. 456-467.

11. Zhao Y., Ross K. M., Johnson B. R., 2021, Phylogenetic classification of circular bacteriocins," *Frontiers in Microbiology*, 11, 1024.
12. Tran K., 2010, Investigation of the native microflora and isolation of protective starter culture for a traditional Vietnamese fermented meat, *RMIT University*, pages.
13. Tran K. T., May B. K., Smooker P. M., Van T. T. & Coloe P. J., 2011, Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage, *Food Research International*, 44(1): 338-344.
14. Ikeda T., Yasui C., Hoshino K., Arikawa K., 207, Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *Salmonella enterica* serovar enteritidis," *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (20), pp. 6404–6409. doi: 10.1128/AEM.00704-07.
15. Waugh M., Sparks J. H., Broadbent R. G., 2009, Identification and characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from human saliva, *J. Appl. Microbiol.*, 107 (3) pp. 1032–1041.
16. Tannock G. W., 2024, Probiotics and Prebiotics: *Scientific Aspects*, Caister Academic Press.
17. Anon, 2008, Qualified Presumption of Safety (QPS) of Microorganisms in Food and Feed, *EFSA Journal*, vol. 923, pp. 1-17,.
18. Gheziel T., Callewaert A., Deschamps H. A., Probiotic properties and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented foods, *Front. Microbiol.*, 10 ( 12), pp. 1–10.
19. Seddik H., Bendali N. H., Cudennec D. G., Drider F., 2017, *Lactobacillus plantarum* probiotic properties and applications, *Microbiol. Res.*, 198, 25–34.
20. Fiocco D., Longo F., Ventura M., 2020, *Lactobacillus plantarum*: from fermentative metabolism to probiotic properties, *Crit. Rev. Microbiol.*, 46(2), pp. 200–219.
21. LeBlanc J. G., Matar D., and Perdigón G. J., 2017, Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum*: A potential probiotic for functional food applications, *Nutr. Rev.*, 75, no. 5, pp. 329–345, 2017.

22. Aguilar-Toalá F., Garcia-Varela B., Garcia M. R., 2021, Postbiotics: A new horizon in microbiome research and applications, *Trends Food Sci. Technol.*, 108, pp. 63–75.
23. Salminen S., Collado L., Vinderola G., 2021, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: An update, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 70, pp. 70–78.
24. Arena M. P., 2018, Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* and its potential applications in food and beverage industries,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), pp. 569–587.
25. Prabhurajeshwar M., Chandrakanth R. K., 2019, Probiotic potential of *Lactobacillus* species with antimicrobial activity against multidrug-resistant pathogens,” *Biomedical Research*, 30, (3), pp. 792–806.
26. Rodríguez-Sánchez P., 2021, Bioactive compounds from *Lactobacillus* with applications in food preservation and human health, *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, article 658931,.
27. Carlos L., Jorge C., Quiles J. M., Torrijos ., Vento M., Gormaz M., Mañes J., Meca G., 2021, Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product, *Journal of Functional Foods*, Volume 84, 104599,.
28. Petrariu O.A., Barbu I.C., Niculescu A.G., Constantin M., Grigore G.A., Cristian R.E., Mihaescu G., Vrancianu C.O., 2024, Role of probiotics in managing various human diseases, from oral pathology to cancer and gastrointestinal diseases. *Front Microbiol.* 5(14):1296447. doi: 10.3389/fmicb.2023.
29. Wen M., Chen S., Zhang Y., Liu Y., Tang C., Zhang J., Sun J., Li X., Ding Y., Lu L., Long K., Nie Y., Li X., Li M., Ge L., Ma J., 2024, Diversity and host interaction of the gut microbiota in specific pathogen-free pigs, *Front Microbiol.* 10(15), 1402807, doi: 10.3389/fmicb.1402807.
30. Huang R., Wu F., Zhou Q., Wei W., Yue J., Xiao B., Luo Z., 2022, *Lactobacillus* and intestinal diseases: Mechanisms of action and clinical applications. *Microbiol Res.* 260:127019. doi: 10.1016/j.micres.2022.127019.
31. Sharma A., Lee H-J., 2025, Antimicrobial Activity of Probiotic Bacteria Isolated from Plants: A Review. *Foods.*; 14(3):495.

32. Zapaśnik A., Sokołowska B., Bryła M., 2022, Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, Apr 28;11(9):1283.
33. Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E., 2006, Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511.
34. Hancock R. E., Sahl H. G., 2006, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
35. Mishra B., Reiling S., Zarena D., Wang G., 2011, Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: Design and application strategies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3), 512-521.
36. Bahar A. A., Ren D., 2013, Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
37. Betts J. W., Wareham D. W., Newton-Foot M., 2013, Optimization of thin-layer chromatography methods for antimicrobial compound purification. *Journal of Chromatography B*, 930, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.002>
38. Kumar R., Bhardwaj A., 2017, Thin-layer chromatography for bioactive compound separation: Recent advancements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.032>
39. Singh S., Gupta P., Verma N., 2020, Bioautography-guided screening of antimicrobial compounds using TLC-based methods. *Analytical Biochemistry*, 601, 113777. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113777>.
40. Var I., Pamuk S., Bostan K., 2015, Stability of antimicrobial metabolites from lactic acid bacteria under different pH conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 25-30.
41. Vuyst D. F., Leroy F., 2021, Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12(1), 85-108.
42. Yang E., Fan X., Jin Y., Song H., 2018, Purification strategies and applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Microbiological Research*, 214, 51-59.

43. Gänzle G., 2015, Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.
44. Pachapur M., Brar, P. R., Dhillon S. R., Verma, M., 2019, Bioprocessing strategies for production of bioactive compounds from lactic acid bacteria: Purification and identification approaches. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107368.
45. Ghosh S., Chatterjee S., Das S., 2019, pH-dependent stability and activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(2), 335-345.
46. Martínez B., Rodríguez A., Suárez J. E., 2021, Influence of pH on the antimicrobial activity of bacteriocins. *Microbiology Spectrum*, 9(5), e00753-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00753-21>
47. Bhattacharya S., Pal S., Mondal S., 2014, Optimization of solvent system for thin-layer chromatography-based separation of bioactive compounds. *Journal of Chromatography Science*, 52(9), 907-915.
48. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Engel R. G., 2019, Introduction to Organic Laboratory Techniques: *A Microscale Approach*. Cengage Learning. ISBN: 978-0357362927.
49. Pelinescu R., 2009, The role of *Lactobacillus brevis* in immune modulation and antimicrobial activity, *Microbial Biotechnology*, vol. 5, no. 4, pp. 521–531.
50. Smith J., 2015, Biological control potential of *Lactobacillus brevis* against plant pathogens,” *Agricultural Microbiology Journal*, vol. 11, no. 3, pp. 210–220.
51. Tanaka M., Yamamoto K., Fujita S., and Nakamura H., 2020, “Probiotic applications of *Lactobacillus brevis* in livestock: A sustainable alternative to antibiotics,” *Animal Health Research Reviews*, vol. 18, no. 2, pp. 115–130.
52. Ravyts F., Vuyst L. D., Leroy F., 2012, Bacterial diversity and functionalities in food fermentations, *Engineering in Life Sciences*. 12(4), pp. 356-367.
53. Salman M., Tariq A., Ijaz A., Naheed S., Hashem A., Fathi, E., Soliman M. H., Javed M. R., 2019, In Vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Lactobacillus coryniformis* BCH-4 bioactive compounds and determination of

- their bioprotective effects on nutritional components of Maize (*Zea mays* L.). *Molecules*, 25(20), 4685. <https://doi.org/10.3390/molecules25204685>
54. Golneshin A., Adetutu E., Ball A. S., May B. K., Thi Thu Hao Van, Smith A. T., , 2015, Complete Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* Strain B21, a Bacteriocin-Producing Strain Isolated from Vietnamese Fermented Sausage Nem Chua, *Genome Announc.* 3(2), pp. e00055-15.
55. Gálvez H., Abriouel R., Lucas A., Benomar G., “Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approaches for Biopreservation of Meat and Meat Products,” *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 13, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1007/s12602-021-09756-2.
56. Abbasiliasi S., Tan J.S., Ibrahim T.A.T., Bashokouh F., Ramakrishnan N.R., Mustafaab S., Ariff A.B., 2017, Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria, *RSC Advances*. 7, pp. 29395-29420.
57. Hernández-González J.C., Martínez-Tapia A., Lazcano-Hernández G., García-Pérez B.E., Castrejón-Jiménez N.S., 2021, Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine, *Animals*. 11(4), p. 979.
58. Nazari M., Smith D. L., 2020, A PGPR-produced bacteriocin for sustainable agriculture: a review of thuricin 17 characteristics and applications, *Frontiers in Plant Science*. 11, p. 916.
59. Hoàng Quốc Khánh, Phạm Thị Lan Anh, 2011, Phân lập và định danh vi khuẩn *Lactobacillus* từ phân trẻ sơ sinh. *Tạp chí Sinh học Việt Nam*, 33(4), 45-52.
60. Nguyễn Thị Phương Thảo, Trần Hữu Đức, Lê Thanh Tâm, 2015, Đa dạng vi khuẩn lactic trong sữa mẹ và hệ tiêu hóa trẻ sơ sinh. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 420, 112-119.
61. Lê Thị Thanh Mai, Nguyễn Văn Hạnh, Trần Thị Mỹ Duyên, 2017, Phân lập và đánh giá *Lactobacillus* từ hệ tiêu hóa động vật nhai lại. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*, 25(3), 88-96.
62. Dương Thị Hồng Nga, Lê Văn Thành, Nguyễn Quang Huy, 2023, Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic từ nem chua. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 9, 67-75.

63. Nguyễn Thị Huyền, Trần Minh Hạnh, Phạm Hoàng Nam, 2014, Khảo sát thành phần vi sinh vật và đặc tính probiotic của các sản phẩm men tiêu hóa trên thị trường. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 21(3), 88-95
64. Trần Văn Hùng, Nguyễn Thanh Tú, Lê Minh Khoa, 2016, Đánh giá khả năng chịu đựng của *Lactobacillus* trong điều kiện khắc nghiệt. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 24(2), 101-109.
65. Đồng Thị Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thu Hằng, Trần Văn Định, 2018, Nghiên cứu đặc điểm bacteriocin từ *Lactobacillus plantarum* UL487 phân lập từ chao Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 30(4), 57-64.
66. Đặng Thị Thanh Hương, Phạm Văn Long, Lê Thị Thảo, 2020, Ứng dụng *Lactobacillus* trong sữa đậu nành. *Tạp chí Công nghệ Thực phẩm*, 12(1), 45-52.
67. Lê Minh Hoàng, Trần Xuân Bách, Nguyễn Thị Kim Chi, 2021, *Lactobacillus* trong thức ăn chăn nuôi: tác động đến hệ vi sinh đường ruột. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*, 29(6), 79-85.
68. Luchi A., Haruguchi S., Mongkolthanaruk W., Arima J., Nagase M., Hoang K., Ichianagi T., Yamaguchi T., Shimomura N., Aimi T., 2012, Characterization of Novel Amylase from Amyolytic Lactic Acid Bacteria *Pediococcus ethanolidurans* Isolated from Japanese Pickles (Nuka-zuke)", *Food Science and Technology Research*. 18, pp. 861-867.
69. Kandler, 1986, "Genus *Lactobacillus*," in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Eds. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins, pp. 1209–1234.
70. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, Dec. 1977.
71. Gevers D., Huys G., Swings J., 2001, Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species, *FEMS Microbiology Letters*. 205(1), pp. 31-36.
72. Mohan G., Thipparamalai Thangappanpillai A. K. Ramasamy B., 2016, Antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of

- sponge endosymbiotic bacteria *Bacillus* sp. at Agatti Island, Lakshadweep Archipelago, *Biotechnology Reports*, 11(44-52).
73. Reis J. A., Paula A. T., Casarotti S., Penna A., 2012, Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>.
74. Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E., 2006, Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511.
75. Hancock R. E., Sahl H. G., 2006, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
76. Mishra B., Reiling S., Zarena D., Wang G., 2011, Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: Design and application strategies, *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3), 512-521.
77. Bahar A. A., Ren D., 2013, Antimicrobial peptides, *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
78. Bhattacharya A., Kaur P., Gupta U., 2014, Solvent system optimization for thin-layer chromatography: A key factor in bioactive compound purification, *Journal of Chromatographic Science*, 52(8), 1205-1212.
79. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Engel R. G., 2019, Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Small Scale Approach. *Cengage Learning*.
80. Betts T. J., Smith L. R., Williams P. D., 2013, Optimization of Rf values in thin-layer chromatography for antimicrobial compound purification, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 150-158.
81. Kumar A., Bhardwaj R., 2017, Thin-layer chromatography in bioactive compound separation: A critical evaluation. *Journal of Chromatography B*, 1040, 215-225.
82. Singh M., Patel R., Chauhan H., 2020, Correlation between antimicrobial activity and Rf values in bioactive compound purification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(3), 1201-1215.
83. Var P., Patel S., Kaur G., 2015, Effect of pH on antimicrobial activity of microbial-derived compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 895-904.

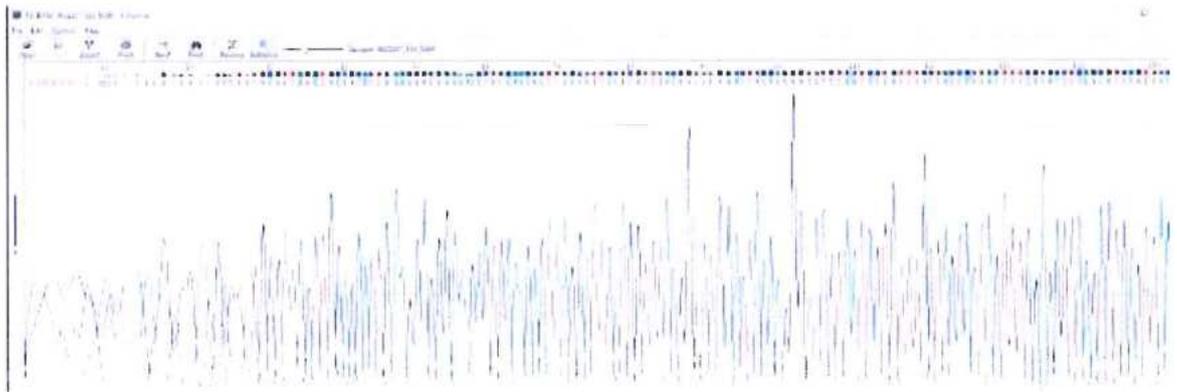
84. Ghosh T., Sen R., Banerjee D., 2019, Structural integrity of antimicrobial peptides under varying pH conditions. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(2), 307-319.
85. Martínez C., López M., Rodríguez A., 2021, Impact of pH variations on the antimicrobial efficacy of bioactive molecules. *Biotechnology Advances*, 39, 107512. 66.

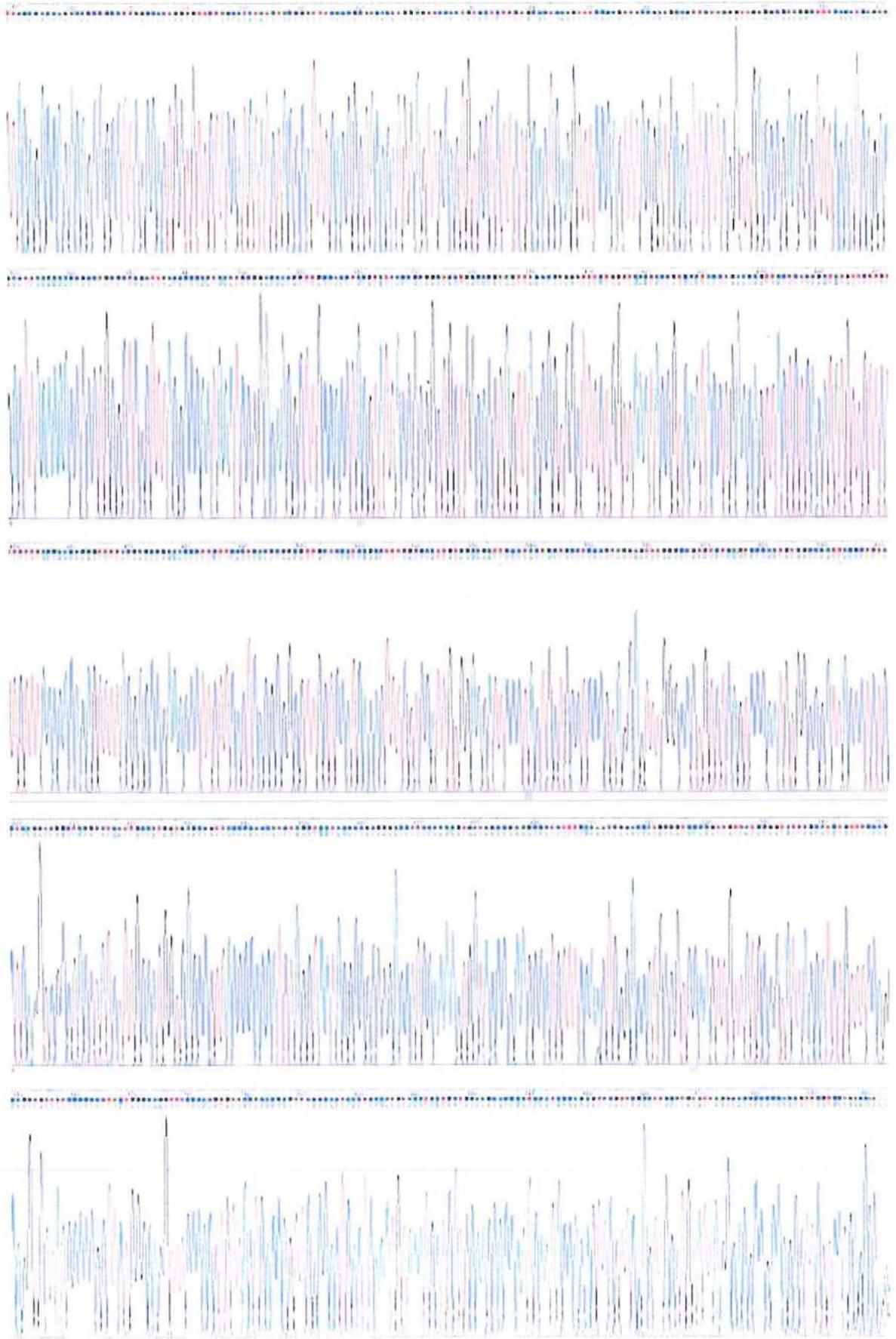
## PHỤ LỤC

Trình tự nucleotide của phân đoạn 16S rRNA của chủng SS3:

**BASE\_4922207\_SS3\_926R:**

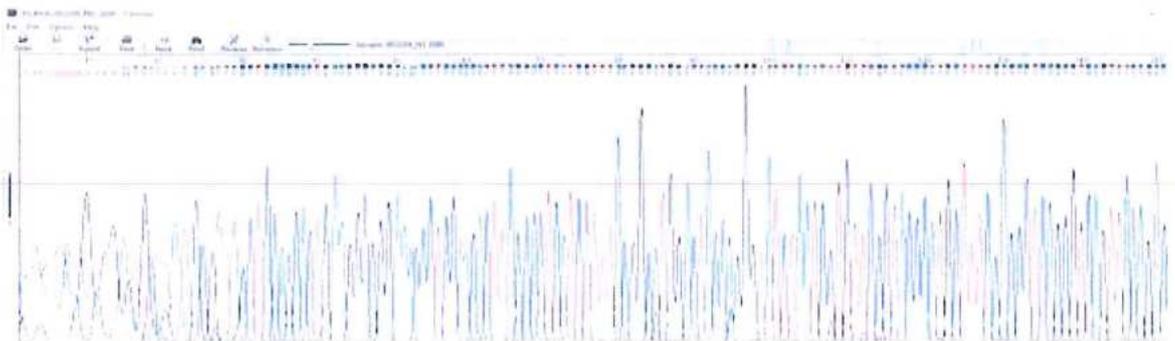
NNNNNNNCNACTCCAGGCGGATGCTTATGCGTTAGCTGCAGCACT  
 GAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTA  
 TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAG  
 CCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTG  
 TTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCAC  
 TGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCG  
 GTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCCTGCGC  
 TCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTA  
 TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAA  
 TACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAA  
 CAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGT  
 TGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGC  
 CTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCCGATT  
 ACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACC  
 CCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGC  
 CGAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATG  
 CGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAG  
 GTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAA  
 TCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTCGACTTGCA  
 TGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCAGAGAATAAAA  
 ACCTAAAA

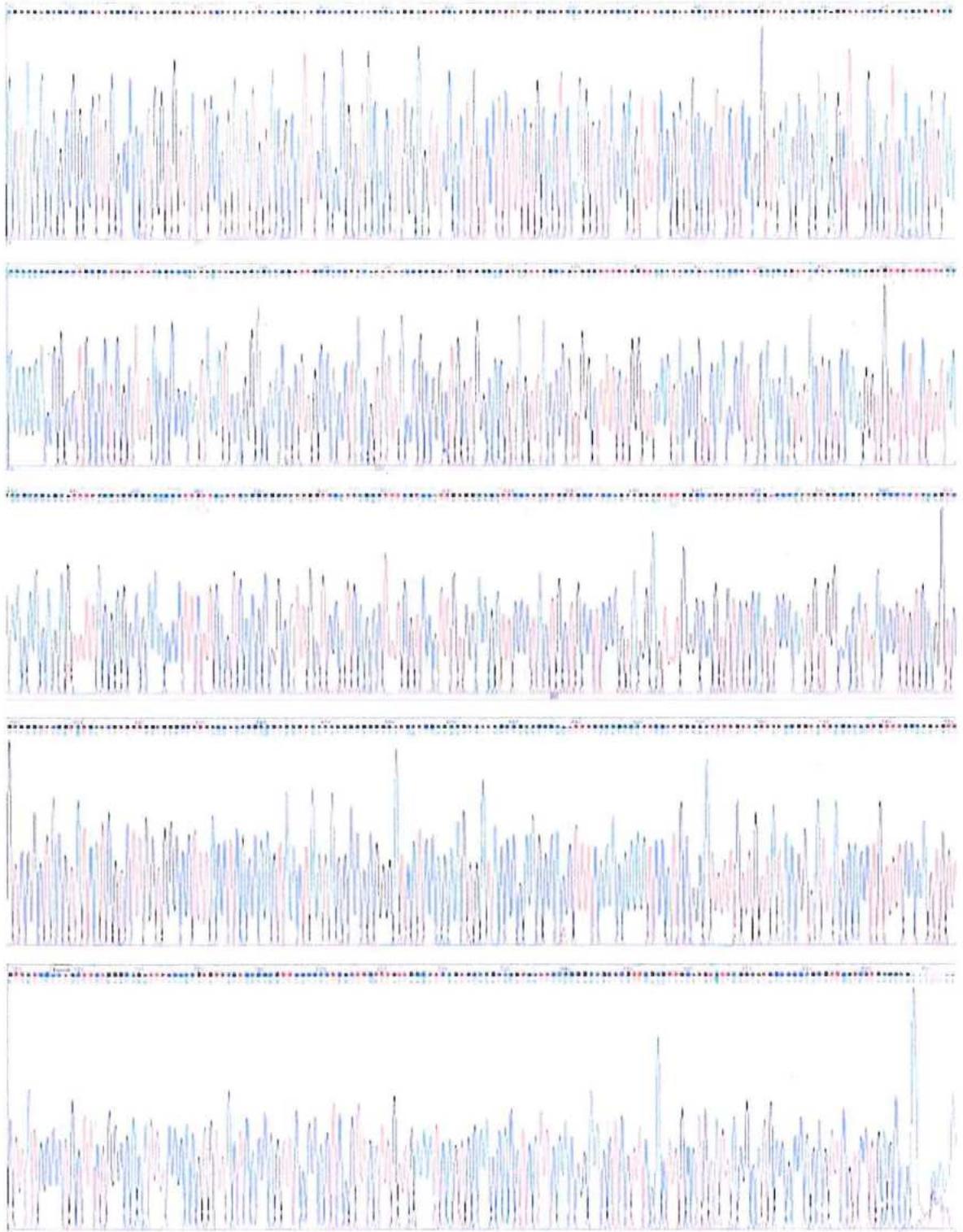




Trình tự nucleotide của phân đoạn 16S rRNA của chủng NS1:  
**BASE\_4922206\_NS1\_926R:**

NANNNNNNNNCGGTAGTGCTTATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAG  
 GGC GGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGA  
 CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTC  
 AGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCT  
 TCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTC  
 CTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTT  
 AAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACC GCCTGCGCTCG  
 CTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTA  
 CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATA  
 CCGTCAACCCTTGAACAGT TACTCTCAAAGGTGTTCTTCTTTAACA  
 ACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCATTG  
 CTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT  
 CCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTA  
 CCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCTTTACCT  
 CACCAACTAATAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCC  
 GAAGCCACCTTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTTGTGTTATAC  
 GGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTGCTTCTGGGCAGA  
 TTTCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCGCTTCATTGTTGAA  
 ATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGACTTGCAT  
 GTATTAGGCATGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCAGAATNNA AAAA  
 CTCAA AAGNNATAAACAATGTAAGTAAAGAGAG

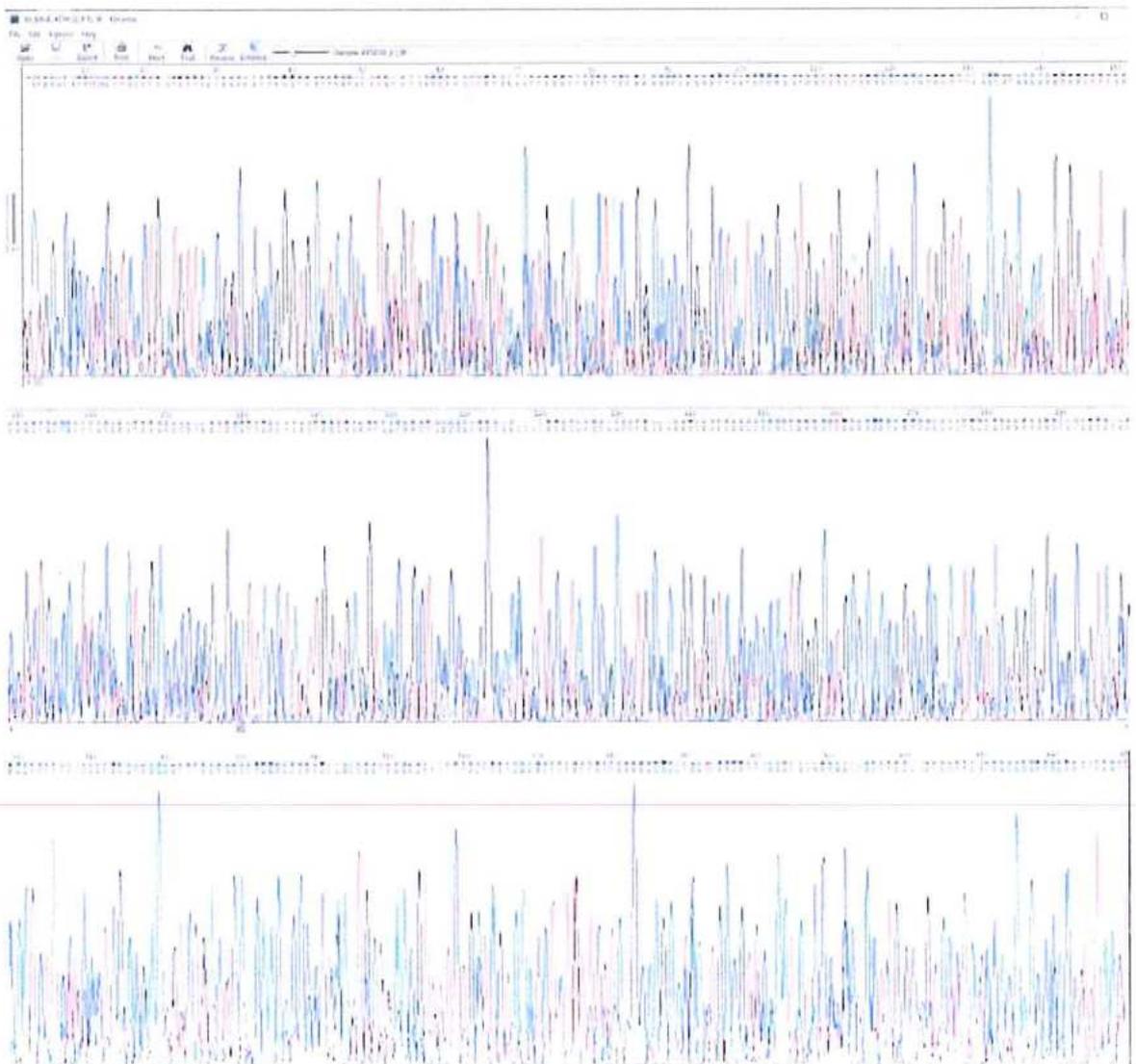


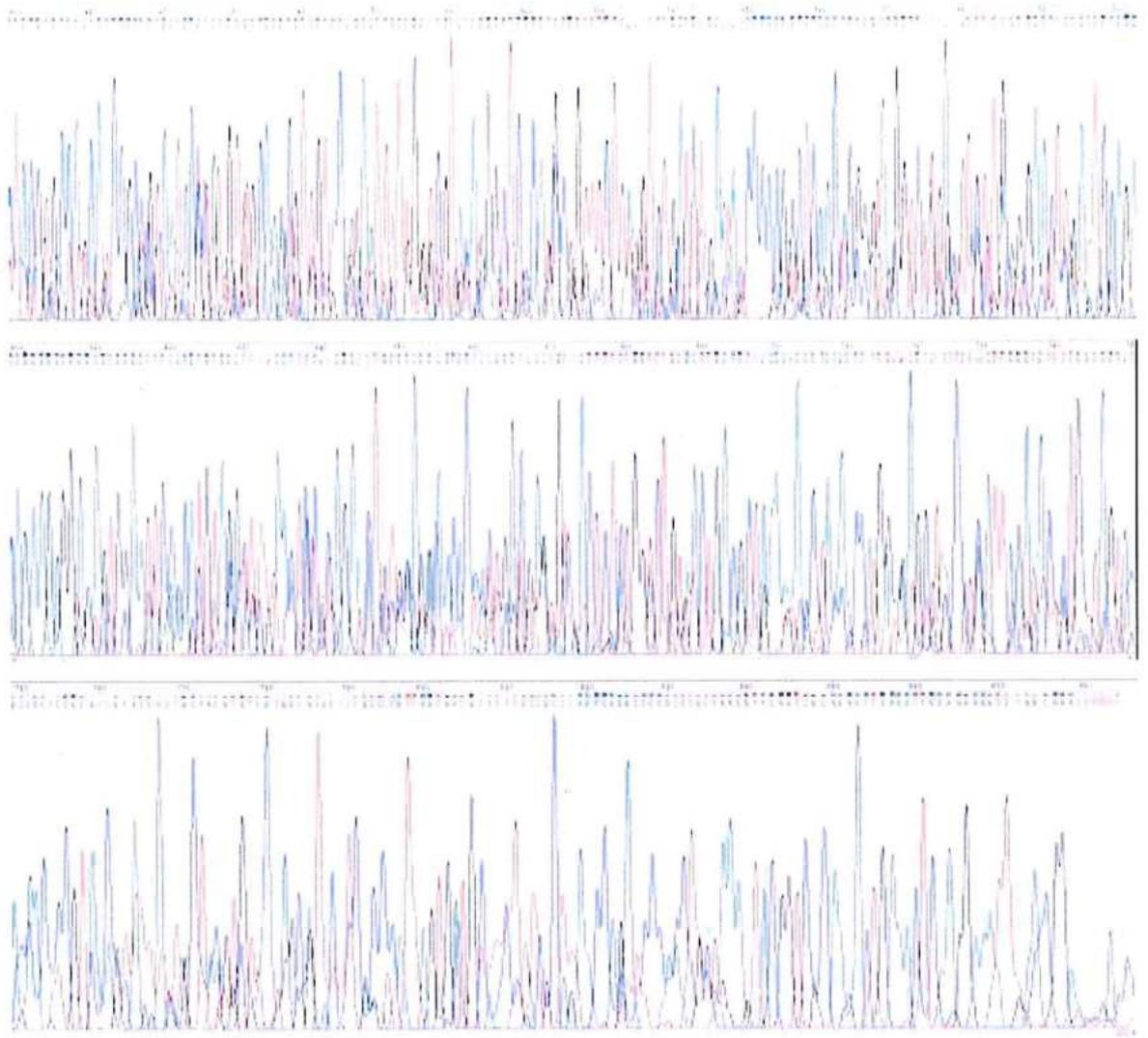


Trình tự nucleotide của phân đoạn 16S rRNA của chủng PT2

TATGAGCACCTTCCGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGCCGGGTGACT  
 AACACCTGTGTTACCTGCCTGTAAAAGTGGGATAACTCCGGGAAA  
 CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCCGCAT  
 GGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGAC  
 CCGCGGCGCACCGCGGCGCATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCT

CACCAAGGCAACTATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCC  
ACACTGGGACTGAGACACAGCCCACTCCTACGGGAGGCCACA  
GTATGGAATCTTCCTCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGTCTGACG  
GACCAACACCGCGTAAATGATGAAGGTTTTCTGATCGTAAAGCTC  
TGTTGTTAGGGAAGAATGACTGCCGTTTCGAATATGGCGGCTCCTT  
GACCGTACCTATCCACAAAGCCACGTCTAACTACGTGCCAGCATC  
CGCGGTAATACGCATGTGTGCAAGCGTTGTCCTGAATTATTGGTC  
GTACAGGGCTCGCATGCGGTTTCTTAATTCTGATGTGAAATCCCCC  
GGCTCAACCGGGGTAGGGTCTTTATATCTTGGGGAAGTTGATTGC  
AGAAGAGGAGAGTGGAATTCCGTGGAATTCCACATGTAGACTTG  
AACTCCGCAGATCTGTGGAGGAACACCACGGACAAATGTTACTCT  
CTGTTACTCTCTTGACGCTAAAATAGC





**Phụ lục: Danh sách 91 chủng vi khuẩn phân lập**

STT	Ký hiệu chủng phân lập
1	ULN-1
2	ULN-2
3	ULN-3
4	ULN-4
5	ULN-5
6	NPN-1
7	NPN-2
8	NPN-3
9	NPN-4
10	NPN-5
11	HT-1
12	HT-2
13	HT-3
14	HT-4
15	HT-5
16	QY1-1
17	QY1-2
18	QY1-3
19	QY1-4
20	QY1-5
21	SS1
22	SS2
23	SS3
24	SS4
25	SS5
26	NPT1
27	NPT2
28	NPT3

29	NPT4
30	NPT5
31	STT1
32	STT2
33	STT3
34	STT4
35	STT5
36	ULT1
37	ULT2
38	ULT3
39	ULT4
40	ULT5
41	UBN1
42	UBN2
43	UBN3
44	UBN4
45	UBN5
46	NPT1
47	NPT2
48	NPT3
49	NPT4
50	NPT5
51	QNN1
52	QNN2
53	QNN3
54	QNN4
55	QNN5
56	QYT1
57	QYT2
58	QYT3

59	QYT4
60	QYT5
61	TH1
62	TH2
63	TH3
64	TH4
65	TH5
66	HTT1
67	HTT2
68	HTT3
69	HTT4
70	HTT5
71	THT1
72	THT2
73	THT3
74	THT4
75	THT5
76	PT1
77	PT2
78	PT3
79	PT4
80	PT5
81	NS1
82	NS2
83	NS3
84	NS4
85	NS5
86	NS6
87	NS7
88	NS8

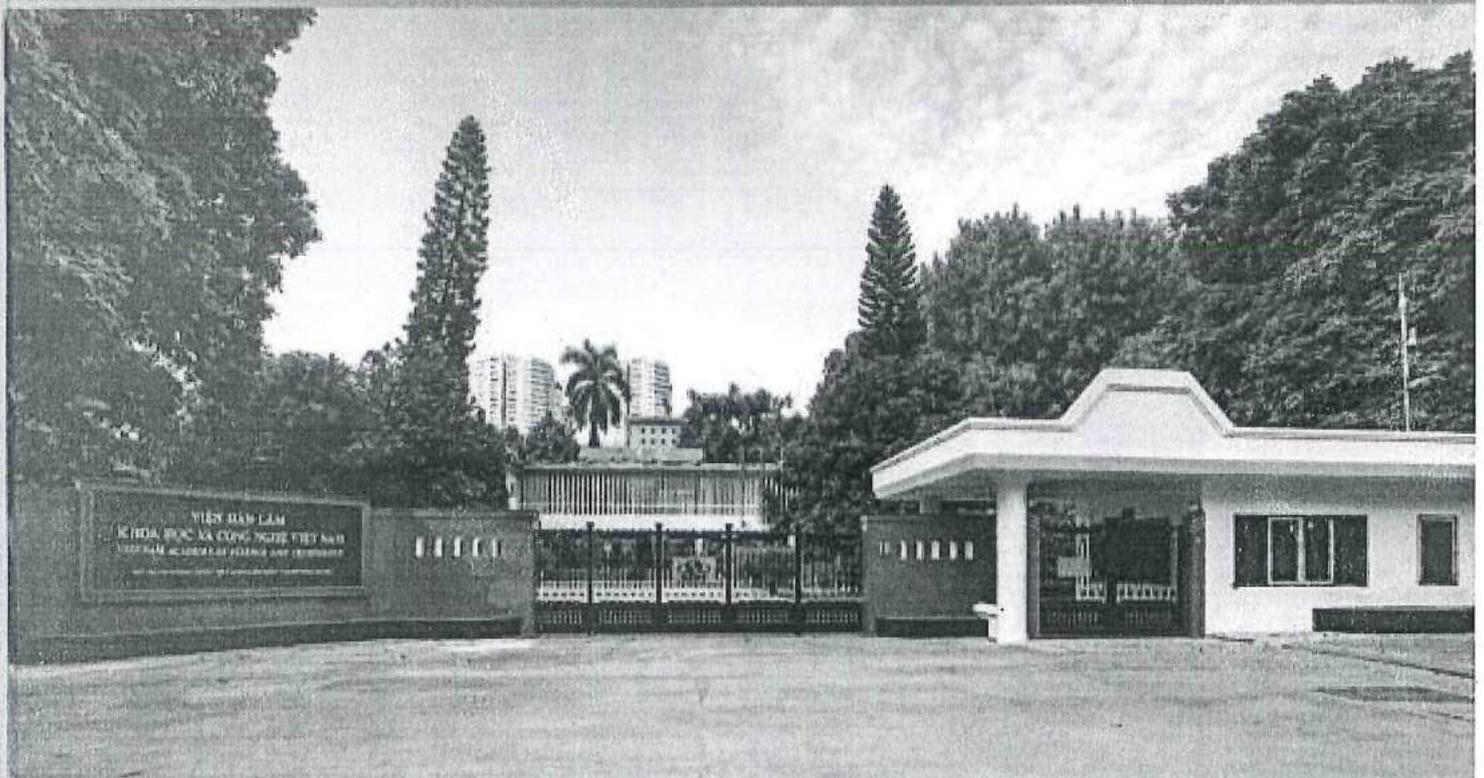
89	NS9
90	NS10
91	NS11

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
TIỂU BAN HỘI NGHỊ KHOA HỌC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

# HỘI NGHỊ KHOA HỌC

CÔNG NGHỆ SINH HỌC - PHỤC VỤ PHÁT TRIỂN BỀN VỮNG  
VÀ THÚC ĐẨY PHÁT TRIỂN KINH TẾ TUẦN HOÀN

KỶ NIỆM 50 NĂM THÀNH LẬP  
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
(1975-2025)



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ

20. NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA DẪN CHẤT NANO - HONOKIOLÊN TRONG ĐIỀU TRỊ U MANG KHỐI U NGOẠI LAI SARCOMA 159  
Lê Thị Thuý Dương, Đỗ Thị Huyền, Lê Thị Huệ,  
Nguyễn Công Đức, Nguyễn Thị Mai Phương
21. TIỀM NĂNG CỦA MICRORNA396G TRONG KHẢ NĂNG NÂNG CAO TÍNH CHỐNG CHỊU MẠN TRÊN CÂY LÚA (*Oryza sativa* L.) ĐỘC PHỤNG 167  
Nguyễn Đức Quân, Nguyễn Huy Hoàng
22. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA RONG LỤC *Ulva reticulata* ĐẾN ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CHỨNG *Bacillus subtilis*, P2 173  
Bùi Hương Giang, Ngô Thị Hoài Thu, Nguyễn Thị Minh, Chu Nhật Huy, Hoàng Phương Hà
23. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN CẮT SỮA TRẮNG (*Rhopilema hispidum*) TỬ CHỨNG *Lyssinibacillus sphaericus* VN3 182  
Nguyễn Khắc Huy, Phạm Thanh Huyền, Đặng Thuý Dương,  
Nguyễn Phương Nhuệ, Bạch Thị Mai Hoa
24. NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG MỘT SỐ DNA BARCODE TRONG VIỆC ĐỊNH DANH LOÀI *Tinospora sinensis* TẠI TỈNH ĐẮK NÔNG 189  
Trần Trung Nguyên, Nguyễn Hoàng Dũng, Vũ Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Vũ Phong
25. NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU GEN NGƯỜI BỆNH VIỆT NAM PHỤC VỤ CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH DI TRUYỀN 195  
Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thanh Ngân, Nguyễn Văn Tùng,  
Nguyễn Thanh Hiền, Hà Hồng Hạnh, Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Huy Hoàng
26. ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÀ PHÊ ARABICA LÊN MEN BĂNG NẤM KOJI (*Aspergillus oryzae*) 210  
Ngô Thị Hoài Thu, Lê Anh Huy, Nguyễn Ngọc Đạt, Đàm Quang Duy,  
Lê Thị Thanh Hoa, Nguyễn Thị Kim Cúc
27. TINH SẠCH VÀ KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH ENZYME NATTOKINASE BẰNG NANOCHITOSAN 218  
Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Đỗ Thị Tuyên, Nguyễn Thị Thảo
28. PHÂN LẬP VI KHUẨN *Lactobacillus* TRONG NEM CHUA VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT CỦA HOẠT CHẤT KHÁNG KHUẨN 224  
Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Hoàng Văn Nghĩa
29. PHÂN LẬP VÀ NHÂN NUÔI TẾ BÀO GÓC CƠ BÒ 231  
Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Thị Hồng, Lê Thành Long, Hồ Nguyễn Quỳnh Chi
30. NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY BUCEP (*Bucephalandra motleyana*) IN VITRO 238  
Đỗ Đăng Giáp, Trần Trọng Tuấn, Nguyễn Thị Như Quỳnh, Trần Quang Vinh,  
Nguyễn Thị Huyền Trang, Đặng Thị Kim Thuý, Nguyễn Thị Thu Hằng,  
Nguyễn Võ Thu Thảo, Trần Thị Mỹ Trâm, Nguyễn Thị Xuân Trang

## PHÂN LẬP VI KHUẨN *Lactobacillus* TRONG NEM CHUA VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT CỦA HOẠT CHẤT KHÁNG KHUẨN

Nguyễn Sỹ Lê Thanh<sup>1,2</sup>, Hoàng Văn Nghĩa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện 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

Email: nslthanh@ibt.ac.vn

### TÓM TẮT

Nem chua là một loại thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam và là nguồn cung cấp dồi dào vi khuẩn axit lactic bao gồm *Lactobacillus* sp.. Bên cạnh việc tăng chất lượng thực phẩm, quá trình trao đổi chất của các vi khuẩn này còn tạo ra các hợp chất kháng khuẩn, hỗ trợ cho việc bảo quản thực phẩm và ngăn ngừa các bệnh lây truyền qua thực phẩm. Trong nghiên cứu này, từ 30 mẫu nem chua thu thập tại các cơ sở sản xuất nổi tiếng ở Việt Nam, đã phân lập được 91 chủng vi sinh vật, trong đó ba chủng có khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli*, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm và y học. Hai chủng có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất được xác định là *Lactobacillus plantarum* SS3 và *Lactobacillus brevis* NS1 thông qua phân tích gen 16S rRNA. Đặc biệt, *L. plantarum* SS3 không chỉ sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn mà còn tạo ra bacteriocin - một peptide kháng khuẩn tự nhiên có khả năng ức chế *S. aureus*. Hoạt chất bacteriocin kháng khuẩn từ chủng này đã được tinh sạch sơ bộ khẳng định tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm lên men an toàn và bảo quản sinh học.

**Từ khóa:** Vi khuẩn axit Lactic, *Lactobacillus*, phân lập, định danh, hoạt tính kháng khuẩn, Bacteriocins.

### MỞ ĐẦU

*Lactobacillus* là một chi vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn lactic (lactic acid bacteria - LAB), nổi bật với khả năng lên men sinh tổng hợp acid lactic. Các loài thuộc chi này không chỉ đóng vai trò thiết yếu trong quá trình sản xuất thực phẩm lên men truyền thống như sữa chua, kim chi, dưa cải mà còn được biết đến với vai trò như những vi sinh vật có lợi cho sức khỏe đường ruột và hệ miễn dịch. Khả năng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp, đặc biệt là các hợp chất có hoạt tính sinh học như bacteriocin, hydrogen peroxide hay acid hữu cơ, đã góp phần tạo nên đặc tính kháng khuẩn tự nhiên của *Lactobacillus* (Golneshin et al. 2020).

Các hợp chất kháng khuẩn do *Lactobacillus* sản xuất được phân thành hai nhóm chính: bacteriocin và các hợp chất không phải bacteriocin. Trong đó, bacteriocin là các peptide hoặc protein có trọng lượng phân tử thấp, được tiết ra ngoài tế bào và có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt vi sinh vật khác, bao gồm cả vi khuẩn và đôi khi cả nấm (Oh et al., 2006). Các chủng vi khuẩn Gram dương như LAB và *Bacillus* sinh bào tử là nguồn sản sinh bacteriocin quan trọng. Những peptide này không chỉ hiệu quả với vi khuẩn đa kháng mà còn có thể tăng cường tác dụng của kháng sinh và thể hiện hoạt tính kháng virus (Labib et al., 2022).

Bacteriocin hiện đang được khai thác rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp thực phẩm, y dược, nông nghiệp và các sản phẩm tiêu dùng khác (Cheruvari & Kammara, 2025). Các nghiên cứu đã chứng minh rằng một số chủng LAB probiotic tiết ra bacteriocin có vai trò bảo vệ vật chủ chống lại tác nhân gây bệnh. Ví dụ, *Lactobacillus acidophilus* có khả năng ức chế sự phát triển của *Helicobacter pylori*, trong khi *Lactococcus* sp. HY 499 có thể tiêu diệt nhiều loại vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt là *Staphylococcus aureus* (Oh et al., 2006). Ngoài khả năng bảo vệ đường ruột, tiềm năng điều trị các bệnh nhiễm trùng và ung thư của các hợp chất này cũng đang được nghiên cứu tích cực (Petrariu et al., 2024).

Một nghiên cứu khác cho thấy vi khuẩn lactic và các peptide kháng khuẩn như bacteriocin có thể thay thế chất bảo quản hóa học trong ngành công nghiệp thực phẩm, đặc biệt là thịt, nhằm kéo dài thời hạn sử dụng và nâng cao độ an toàn sản phẩm (Carlos et al., 2021). Điều này hoàn toàn phù hợp với xu hướng tiêu dùng hiện đại, hướng đến các sản phẩm tự nhiên và hạn chế hóa chất. Trong lĩnh vực dược phẩm, bacteriocin còn được kỳ vọng phát triển thành các sản phẩm chăm sóc sức khỏe như kem bôi hoặc thuốc mỡ

có tác dụng kháng khuẩn. Riêng trong ngành mỹ phẩm, các hợp chất này, đặc biệt là từ nem chua, đang được xem xét để ứng dụng vào sản phẩm làm sạch và bảo vệ da. Xuất phát từ những tiềm năng ứng dụng thực tiễn của bacteriocin nghiên cứu phân lập, định danh chủng *Lactobacillus* trong nem chua và đánh giá tính chất của hoạt chất đã được triển khai nhằm tìm những vi sinh vật bản địa có tiềm năng sản xuất hoạt chất kháng khuẩn mới.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Các mẫu nem chua được thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau ở Thanh Hóa ( Huyện Nga Sơn, Thành Phố, Sầm Sơn,...), Quảng Ninh, Hà Nội (Phùng, Hoài Đức, Đông Anh), Phú Thọ,... *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* trong bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ Sinh học enzyme, Viện Công nghệ Sinh học (nay đã được hợp nhất thành Viện Sinh học). Các ống Eppendorf 2 mL; 1,5 mL; 0,5 mL; các ống falcon 15 mL, 50 mL; pipet các loại 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1.000  $\mu$ L; đĩa petri, cốc đong, ống đong, chai đựng hoá chất; túi màng thẩm tích; một số dụng cụ khác như giá, rổ các loại,...

### Môi trường nuôi cấy

MT1. Môi trường MRS dùng để phân lập, nuôi cấy và nghiên cứu các đặc tính của vi khuẩn. Thành phần môi trường MRS (g/L) bao gồm: yeast extract 0,4 %, beef extract 0,8 %, peptone 1 %, D-glucose 2 %,  $K_2HPO_4$  0,2 %,  $MgSO_4$  0,02 %,  $MnSO_4$  0,004 %, Tween 80 1 mL,  $CH_3COONa$  (sodium acetate) 0,5%, Agar 2 % (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960).

MT2. Môi trường MRS lỏng dùng để nuôi cấy và nghiên cứu đặc tính của vi khuẩn LAB thành phần tương tự MT1 nhưng không có thêm agar.

MT3. Môi trường MRS agar bổ sung 1 %  $CaCO_3$  dùng để phân lập và khảo sát khả năng sinh acid tổng hợp. Thành phần môi trường MRS agar + 1 %  $CaCO_3$ .

MT4. Môi trường LB dùng để nuôi cấy vi khuẩn chỉ thị. MT5. Môi trường LB agar dùng để đo kháng khuẩn. Thành phần môi trường LB lỏng (MT4) + 2 % agar.

### Phương pháp

#### Phân lập chủng vi khuẩn sinh hoạt tính kháng khuẩn từ nem chua

Các mẫu nem chua dùng để phân lập vi khuẩn lactic được thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau như Thanh Hóa, Quảng Ninh, Hà Nội (Phùng, Hoài Đức, Đông Anh),... Tất cả các mẫu đều đảm bảo chất lượng, không bị hư hỏng. Mỗi mẫu nem (10 g) được cân chính xác và cho vào bình tam giác chứa 90 mL môi trường MRS lỏng đã tiệt trùng. Hỗn hợp này được ủ ở 37 °C trong 24 giờ để tăng sinh vi khuẩn. Tiếp theo, tiến hành pha loãng mẫu và lấy 0,1 mL ở nồng độ  $10^{-5}$  trải đều trên đĩa petri có chứa môi trường MRS agar bổ sung 1 %  $CaCO_3$ . Đĩa được ủ kỵ khí ở 37 °C trong 48 giờ. Những khuẩn lạc có khả năng làm tan  $CaCO_3$  được chọn và cấy truyền nhiều lần cho đến khi thu được dòng vi khuẩn thuần chủng. Các chủng được chọn để phân tích hình thái và một số chỉ tiêu sinh hóa cơ bản để nhận dạng giống *Lactobacillus* theo phương pháp của Kandler and Wiss (1986). Các chủng *Lactobacillus* chọn lọc được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS lỏng (MT2) ở nhiệt độ 37 °C trong 24 giờ, sau đó giữ giống bằng cách bổ sung 20 % glycerol ở -20 °C cho các đánh giá tiếp theo.

#### Định danh vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn trong nem chua bằng phương pháp sinh học phân tử

Vùng gen 16S rRNA được khuếch bằng cặp mồi tổng 9F và 926R có trình tự 9F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 926R: 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET Gel Extraction Kit của hãng Thermo Fisher Scientific sau đó đọc trình tự trên máy giải trình tự tự động tại Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA phân lập từ chủng L1, 22A được xử lý và phân tích bằng phần mềm DNASTAR để xác định hệ số tương đồng và dựng cây phân loại. Sử dụng phần mềm BLAST trong NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Đánh giá khả năng kháng khuẩn gây bệnh của chủng vi khuẩn có trong nem chua**

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB (MT4) ở 37 °C trong 24 giờ. Các chủng *Lactobacillus* được nuôi trong môi trường MRS lỏng (MT2) dưới điều kiện tương tự. Sau khi nuôi cấy, dịch vi khuẩn được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C để thu lấy phần dung dịch nổi (*Cell-Free Supernatant - CFS*). Môi trường thạch LB Agar (MT5) được chuẩn bị để làm cơ sở thử nghiệm. 100 µL dịch nuôi *S. aureus* được trải lên bề mặt thạch. Các lỗ thạch có đường kính 6 mm được đục trên bề mặt này. Sau đó, 100 µL dịch CFS từ *Lactobacillus* được nhỏ vào mỗi lỗ. Để đảm bảo sự khuếch tán tối ưu, thạch được ủ 30 phút ở 4 °C, sau đó tiếp tục ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định dựa trên sự xuất hiện của vòng ức chế xung quanh lỗ thạch. Kích thước vòng kháng khuẩn (DK) được tính theo công thức:  $DK = Di - dw$ ; Trong đó: Di: Đường kính toàn bộ vùng ức chế vi khuẩn (mm); dw: Đường kính lỗ thạch ban đầu (mm).

**Phương pháp tủa bằng các tác nhân gây tủa là dung môi hữu cơ ethanol 70 %**

Dịch protein thô của chủng vi khuẩn được tủa bằng ethanol 70 %, cất tủ lạnh -20 °C trong 30 phút hoặc 1 tiếng, sau đó ly tâm 12.000 rpm trong 15 phút ở 4 °C và thu tủa. Tủa thu được phơi khô ở nhiệt độ -4 °C, tiến hành hòa tủa với đệm PBS 1X để xác định hàm lượng protein và xác định hoạt tính kháng khuẩn.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Tạo bộ sưu tập các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* từ các mẫu nem chua ở Việt Nam**

Trong nghiên cứu này, tổng cộng 91 chủng vi khuẩn lactic đã được phân lập từ hơn 30 mẫu nem chua thu thập tại nhiều địa điểm khác nhau của Việt Nam, bao gồm Quảng Ninh, Phùng, Thanh Hóa, Đông Anh, Phú Thọ, Hà Nội và Nghệ An. Các mẫu được lựa chọn nhằm đảm bảo sự đa dạng về nguồn gốc và điều kiện lên men tự nhiên, từ đó tăng khả năng phát hiện các chủng vi khuẩn có đặc tính hữu ích. Sau khi thu thập, các mẫu nem chua được tiến hành nuôi cấy tăng sinh trong môi trường MRS lỏng. Sau 24 giờ nuôi cấy, dịch nuôi cấy được pha loãng theo hệ số thích hợp và trải đều lên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường MRS agar. Sau 48 giờ ủ ở điều kiện tối ưu, các khuẩn lạc mọc lên trên đĩa thạch được quan sát, làm thuần và kiểm tra hình thái chung. Kết quả cho thấy, các khuẩn lạc thu được có dạng hình tròn, bề mặt lồi, trơn nhẵn và có độ bóng nhất định. Thông tin chi tiết về kết quả này được trình bày trong Bảng 3.1.

**Bảng 3.1. Kí hiệu và hình thái các chủng phân lập từ các mẫu nem chua**

Kí hiệu chủng phân lập	Hình thái khuẩn lạc của chúng
ULN1-5	Tròn, trắng ngà, bóng, lồi, bìa nguyên, trơn bóng
NPN1-5, HT1-5, QY1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, bìa nguyên, trơn láng
SS1-5, NPT1-5, STT1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi bìa nguyên, trơn bóng
ULN1-5, UBN1-5	Tròn, trắng đục, bóng, lồi, bìa nguyên, trơn bóng
NPT1-5, QNN1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, phẳng, bìa nguyên, trơn láng
QYT1-5, HTT1-5, TH1-5	Tròn, trắng sữa, bóng, phẳng, bìa nguyên, trơn láng
THT1-5, PT-5	Tròn, trắng sữa, lồi, bìa nguyên, trơn bóng
NS1-11	Tròn, nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên

Ghi chú: NP: nem Phùng; UL: Ước Lễ; QN: Quảng Ninh; UB: Ưông Bí; QY: Quảng Yên; SS: Sầm Sơn, NS: Nga Sơn; PT: Phú Thọ, N: hình dạng khuẩn lạc nhỏ, T: hình dạng khuẩn lạc to.

**Đánh giá hoạt tính kháng một số vi sinh vật gây bệnh**

Sau khi hoàn thành các bước xác định trên, các chủng vi khuẩn lactic được kiểm tra khả năng kháng lại một số vi sinh vật gây bệnh phổ biến như *Staphylococcus aureus*. Thử nghiệm khuếch tán trên thạch cho thấy, hai chủng vi khuẩn được phân lập từ mẫu nem chua Thanh Hóa, ký hiệu NS1, SS3 có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh này. Những chủng vi khuẩn này có tiềm năng cao trong việc sản sinh các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên, mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng trong bảo quản thực phẩm

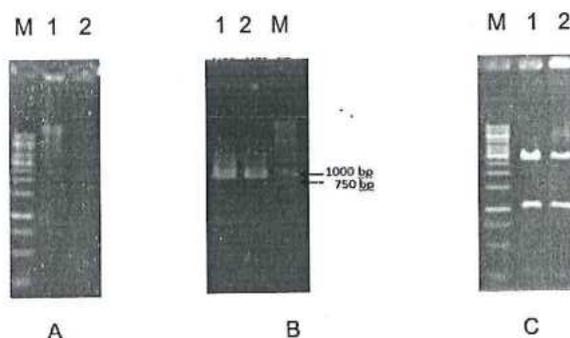
và phát triển chế phẩm sinh học có lợi cho sức khỏe con người. Kết quả chi tiết của các thử nghiệm sẽ được trình bày trong các bảng số liệu liên quan (Bảng 3.2).

Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn của các chủng phân lập nhằm tìm ra các chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất các hợp chất kháng khuẩn, đồng thời tạo tiền đề cho việc mô tả đặc tính trong tương lai. Từ kết quả, chỉ có 2 chủng *Lactobacillus* phân lập được chọn, có hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn gây bệnh. Kết quả thực nghiệm cho thấy các chủng này có khả năng sản sinh ra các chất kháng khuẩn có khả năng tiêu diệt vi khuẩn Gram âm *E. coli* và vi khuẩn Gram dương *S. aureus* và *B. subtilis*. Tuy nhiên, *S. aureus* có vùng diệt khuẩn rộng hơn nhiều so với hai chủng vi khuẩn kia. Các hoạt chất trong CFS có thể tương tác tốt với màng ngoài của vi khuẩn gram dương. Vi khuẩn Gram dương có lớp peptidoglycan dày trong thành tế bào của chúng, trong khi vi khuẩn Gram âm có lớp peptidoglycan nhỏ hơn nhưng có thêm một màng ngoài chứa lipopolysaccharide (LPS).

**Bảng 3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn được phân lập**

Tên	Vùng ức chế (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
NS1	6,5	5,5	3,0
SS3	7,0	5,5	3,5
NPT1	2,5	2,5	0,0
STT2	3,0	3,5	1,5
UBN1	2,5	2,0	0,0
QYT2	3,0	4,5	2,4
QNT4	4,5	3,0	1,5
THT3	4,0	2,0	1,0
PT2	4,5	4,5	2,5
NS6	4,5	5,5	2,5
ULN1	3,5	2,5	1,0
PT2	2,5	2,5	1,0

**Định danh các chủng có hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh**

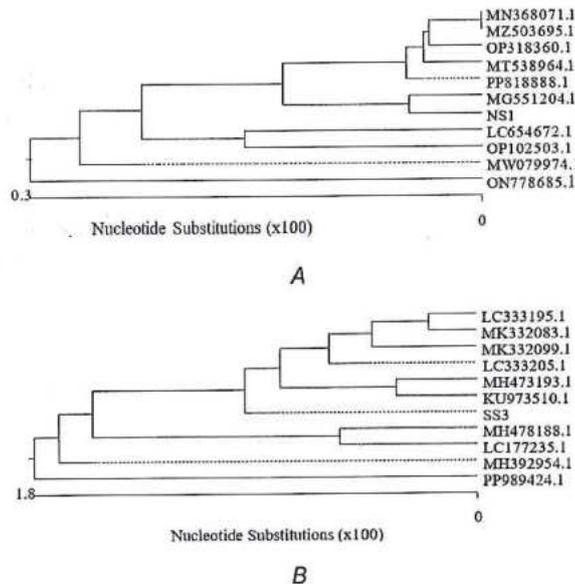


**Hình 1. Điện di DNA tổng số (A); Sản phẩm PCR (B); Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng *XhoI* và *XbaI* (C). 1, 2, 3: chủng NS1, SS3, DC: M: Marker**

Có 2 chủng có hoạt tính kháng khuẩn tốt, có hình thái của vi khuẩn *Lactobacillus* được chúng tôi lựa chọn để định danh bằng cách đọc và so sánh trình tự đoạn gen *16s RNA*. Sản phẩm DNA tổng số tách chiết từ chủng NS1, SS3 được điện di kiểm tra trên gel 0,8 % agarose. Kết quả ở Hình 1A cho thấy DNA tương đối sạch, không bị gãy, đủ điều kiện và chất lượng cho các nghiên cứu nhân dòng và đọc trình tự. Phản ứng PCR được tiến hành với cặp mồi 9F và 926R, sau khi điện di kiểm tra trên gel 0,8 % agarose, sản phẩm thu

được có kết quả khoảng 917 bp (Hình 1B). Sản phẩm phản ứng PCR sau khi gắn vào vector pJET1.2/blunt và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH10b đã được tách plasmid, và đem cắt kiểm tra bằng cặp enzyme hạn chế *XhoI* và *XbaI*. Sản phẩm có kích thước khoảng 3.000 bp tương ứng với kích thước của vector pJET1.2/blunt, băng còn lại có kích thước khoảng 917 bp tương ứng với đoạn DNA đã chèn vào (Hình 1C).

Plasmid tái tổ hợp mang gen *16S rRNA* mong muốn được tách và tinh sạch để xác định trình tự nucleotide. Đoạn gen *16S rRNA* của chủng NS1, SS3 được xác định trình tự nucleotide trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Sau khi phân tích trình tự và xử lý số liệu trình tự đoạn gen *16S rRNA* có chiều dài 917 bp. So sánh trình tự đoạn gen *16S rRNA* của chủng NS1, SS3 với các chủng đã được công bố trên GenBank cho thấy, chủng NS1 có độ tương đồng trên 99 % với các chủng *Lactobacillus brevis* có mã số tương ứng MG551204.1; PP818888.1; MT538964.1; MN368071.1; ON778685.1; MZ503695.1; MW079974.1; LC654672.1; OP102503.1; PQ303223.1. (Hình 2A). Từ kết quả trên ta thấy chủng NS1 có độ tương đồng 99,7 % với *Levilactobacillus brevis* NWAUFU1533; *Levilactobacillus brevis* KFE2; *Lactobacillus brevis* 8278; *Lactobacillus brevis* MG5288; *Levilactobacillus brevis* TMPC 4G374; *Levilactobacillus brevis* P3 UASWS2545; *Lactobacillus brevis* 11512; tương đồng 99,6 % so với chủng *Levilactobacillus brevis* ASK-1; *Levilactobacillus brevis* MG5059; *Levilactobacillus brevis* DC02. Do vậy ta có thể kết luận đây là một chủng thuộc loài *Lactobacillus brevis*.



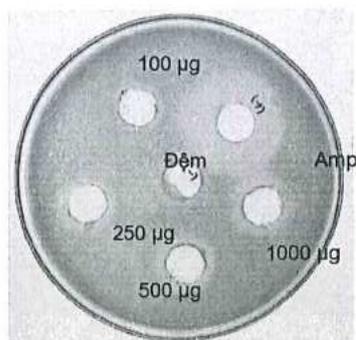
Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của chủng NS1 (A) SS3 (B) và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng NCBI

So sánh trình tự đoạn gen *16S rRNA* của chủng SS3 với trình tự *16S rRNA* của các chủng đã được công bố trên GenBank cho thấy, chủng SS3 có độ tương đồng trên 99 % với các chủng *Lactobacillus plantarum* có mã số tương ứng MH392857.1; MH665782.1; OQ656900.1; MH473193.1; CP166731.1; MH266419.1; PQ683408.1; MN880113.1; CP068767.1; PP989424.1 (Hình 2B). Từ kết quả trên ta thấy chủng SS3 có độ tương đồng 99,8 % với *Lactobacillus plantarum* BH-L1; *Lactobacillus plantarum* PMC67; *Lactobacillus plantarum* RKC66; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus plantarum* Wakasa-SU3 và tương đồng 99,4 % so với chủng *Lactobacillus plantarum* V4S; *Lactobacillus pentosus* HBUAS51093; *Lactobacillus plantarum* HBUAS53269; *Lactiplantibacillus plantarum* S23Y. Do vậy, ta có thể kết luận đây là một chủng thuộc loài *Lactobacillus plantarum*.

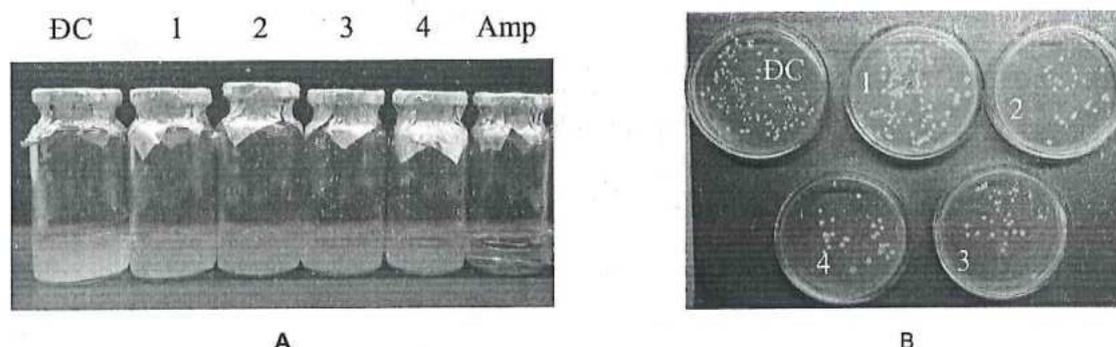
**Tinh sạch sơ bộ và đánh giá một số tính chất của hoạt chất kháng khuẩn.**

Để phân tách sơ bộ các Bacteriocins có khả năng kháng khuẩn, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng Ethanol 70 % để tủa protein và peptide có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất là SS3. 30 mL dịch nuôi cấy được bổ sung 70 mL ethanol, dung dịch sau đó được tủa trong đá lạnh

trong vòng 1 giờ. Tủa thu được sau khi ly tâm 15.000 vòng/phút, làm khô và pha vào dung dịch đệm phosphate pH7. Các protein và peptide còn lại được thử hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả cho thấy, peptide tách chiết được có hoạt tính kháng khuẩn (Hình 3).



**Hình 3.** Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương *S. aureus*. Protein tổng số tương ứng 100-250-500-1.000 µg



**Hình 4.** Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương *S. aureus* ở các nồng độ dịch protein tổng số khác nhau. ĐC: mẫu đối chứng âm, 1- 4: mẫu nuôi cấy *S. aureus* có bổ sung dịch chiết tế bào với nồng độ lần lượt 100-250-500-1.000 µg protein tổng số, Amp: mẫu nuôi cấy *S. aureus* bổ sung 50 µg ampicilin

Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đó về tác dụng kháng khuẩn của peptide kháng khuẩn (AMPs) đối với *S. aureus*. Chẳng hạn, nghiên cứu của Labib et al. (2022) đã cho thấy các AMPs có thể ức chế sự phát triển của *S. aureus* với hiệu quả phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tiếp xúc. Một nghiên cứu khác của Hancock & Sahl (2006) cũng chỉ ra rằng các peptide kháng khuẩn hoạt động chủ yếu bằng cách phá hủy màng tế bào vi khuẩn, gây rò rỉ các thành phần nội bào và dẫn đến chết tế bào. Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Mishra et al. (2011) peptide kháng khuẩn có thể ức chế tới 95 % sự phát triển của *S. aureus* ở nồng độ khoảng 1.000 µg/mL, tương tự với kết quả của chúng tôi. Điều này cho thấy rằng peptide trong nghiên cứu hiện tại có thể có cơ chế tác động tương tự với các AMPs đã được công bố. Tuy nhiên, hiệu quả ức chế của peptide có thể khác nhau tùy thuộc vào loại peptide, điều kiện môi trường nuôi cấy và đặc điểm chủng vi khuẩn. Chẳng hạn, nghiên cứu của Bahar & Ren (2013) cho thấy một số AMPs có thể hoạt động tốt hơn trong môi trường có pH thấp hoặc chứa ion kim loại nhất định. Do đó, cần có thêm nghiên cứu để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố này đến hiệu suất của peptide đang nghiên cứu.

## KẾT LUẬN

Đã phân lập, định danh được 02 chủng *Lactobacillus* từ 30 mẫu nem chua thu thập tại các cơ sở nổi tiếng ở Việt Nam, đã phân lập được 91 chủng vi sinh vật. Trong đó, 12 chủng có khả năng ức chế *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli*. Hai chủng có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất được định danh bằng trình tự gen 16S rRNA gồm: *Lactobacillus plantarum* SS3, *Lactobacillus brevis* NS1 đều có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn. Riêng *L. plantarum* SS3 có khả năng sản sinh bacteriocin, có tác dụng ức chế *S. aureus*, hứa hẹn ứng dụng trong thực phẩm lên men, dược phẩm và bảo quản sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arena M.P. (2018). Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* and its potential applications in food and beverage industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), pp. 569-587.
- Bahar A.A., & Ren D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Carlos L., Jorge C., Quiles J.M., Torrijos R., Vento M., Gormaz M., Mañes J., Meca G., (2021). Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product, *Journal of Functional Foods*, Volume 84, 104599, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104599>.
- Cheruvuri A. & Kammara R. (2025). Bacteriocins future perspectives: Substitutes to antibiotics. *Food Control*, 168, 110834.
- Golneshin A., Gor M.C., Williamson N., Vezina B., Van T.T.H., May B.K., Smith A.T.. Discovery and characterisation of circular bacteriocin plantacyclin B21AG from *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Heliyon*. 2020 Aug 21; 6(8) 04715. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04715. PMID: 32904251; PMCID: PMC7452424.
- Hancock R.E., & Sahl H.G., 2006, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
- Labib B.A. & Chigbu D.I., 2022, Clinical management of herpes simplex virus keratitis. *Diagnostics*, 12, 2368.
- Mishra B., Reiling S., Zarena D., & Wang G., 2011, Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: Design and application strategies, *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3), 512-521.
- Oh S., Kim S.-H., Ko Y., Sim J.-H., Kim K.S., Lee S.-H., Park S., Kim Y.J., 2006, Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria. *Food Chem. Toxicol*, 44, 552-559
- Petrariu O.A., Barbu I.C., Niculescu A.G., Constantin M., Grigore G.A., Cristian R.E., Mihaescu G., Vrancianu C.O., 2024, Role of probiotics in managing various human diseases, from oral pathology to cancer and gastrointestinal diseases. *Front Microbiol*. 5(14):1296447. doi: 10.3389/fmicb.2023.

## IDENTIFICATION LACTOBACILLUS STRAINS IN NEM CHUA AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS

Nguyen Sy Le Thanh<sup>1,2,\*</sup>, Hoang Van Nghia<sup>2</sup>

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

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

\*Email: [nslthanh@ibt.ac.vn](mailto:nslthanh@ibt.ac.vn)

### ABSTRACT

*Nem chua* is a traditional fermented food of Vietnam and a rich source of lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* sp. In addition to improving food quality, the metabolic activities of these bacteria also produce antimicrobial compounds, supporting food preservation and preventing foodborne illnesses. In this study, from 30 *nem chua* samples collected at renowned production sites in Vietnam, 91 microbial strains were isolated, among which three strains were capable of inhibiting pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*, showing potential applications in food preservation and medicine. The two strains with the strongest antimicrobial activity were identified as *Lactobacillus plantarum* SS3 and *Lactobacillus brevis* NS1 through 16S rRNA gene sequence analysis. Notably, *L. plantarum* SS3 not only synthesizes antimicrobial compounds but also produces bacteriocin - a natural antimicrobial peptide capable of inhibiting *S. aureus*. The bacteriocins from this strain were preliminarily purified, confirming their potential for application in safe fermented food production and biological preservation.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, isolation, identification, antimicrobial activity, bacteriocins.

ISBN: 978-604-357-371-8



9 786043 573718

SÁCH KHÔNG BÁN