

## Phân lập và xác định đặc tính của các vi khuẩn acetic trong trà Kombucha

Đinh Thị Ngọc Mai<sup>1</sup>, Nguyễn Hà Vân<sup>2</sup>, Trần Hữu Phong<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thành Trung<sup>3</sup>, Nguyễn Kim Nữ Thảo<sup>2</sup>, Nguyễn Hồng Minh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Vi sinh và Biến đổi gen, Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia,  
Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 18/08/2022; Ngày chấp nhận đăng: 20/9/2022)

### Tóm tắt

Trà Kombucha là một loại đồ uống lên men tự nhiên được tiêu thụ trên toàn cầu. Kombucha được sản xuất bằng cách lên men trà, đường sucrose cùng với tổ hợp vi sinh vật gồm nấm men và vi khuẩn acetic. Hiểu biết về thành phần vi sinh vật trong Kombucha sẽ góp phần kiểm soát tốt hơn quá trình lên men. Do vậy, nghiên cứu này tập trung phân tích đặc điểm của vi khuẩn acetic chiếm ưu thế trong trà Kombucha. Các chủng vi khuẩn acetic được phân lập trên môi trường glucose-ethanol và được phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rARN. Kết quả cho thấy có 14/20 chủng phân lập thuộc nhóm vi khuẩn acetic. Các loài vi khuẩn acetic ưu thế được xác định là *Komagataeibacter saccharivorans* chiếm 92,9% và *Komagataeibacter rhaeticus* chiếm 7,1%. Các chủng này đều có khả năng tạo biofilm, trong đó các chủng KCB05, KCB07, KCB24, KCB28 có khả năng tạo màng tốt nhất. Hoạt tính kháng 5 chủng vi khuẩn gây bệnh bao gồm *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Samonella enterica* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579 của các chủng vi khuẩn acetic phân lập cũng được xác định Trong đó, số lượng chủng vi khuẩn acetic có hoạt tính kháng *Escherichia coli* ATCC 25922 đạt 27,8%, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 là 22,2%, *Samonella enterica* ATCC 13076 là 33% và cao nhất là *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 đạt 50%.

**Từ khóa:** Vi khuẩn acetic, kombucha, hoạt tính kháng khuẩn, biofilm.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nhiều thế kỷ qua, con người đã dựa vào quá trình lên men để bảo quản thực phẩm và đồ uống, đồng thời đa dạng hóa sản phẩm với các đặc tính cảm quan hấp dẫn và giá trị dinh dưỡng cao, có lợi cho sức khỏe. Kombucha là một thức uống lên men từ trà có

\* Điện thoại: +84919341956

Email: [minh.nguyenhong@phenikaa-uni.edu.vn](mailto:minh.nguyenhong@phenikaa-uni.edu.vn)

nguồn gốc từ Trung Quốc cách đây khoảng 5000 năm [1]. Sau đó, loại thức uống này nhanh chóng phổ biến ở Nhật Bản, Nga, các nước Trung Đông và hiện tại chúng được tiêu thụ trên khắp thế giới. Trà Kombucha có vị cồn và acid nhẹ, tương tự như rượu táo. Vị của nó có thể thay đổi từ vị trái cây, chua nhẹ và có ga đến giống như giấm tùy thuộc vào điều kiện lên men. Sử dụng trà Kombucha thường xuyên có thể mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe bao gồm các tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn và bảo vệ gan [2].

Trà Kombucha thường được lên men bởi nhóm vi sinh vật cộng sinh gồm vi khuẩn acetic và nấm men với nguyên liệu là nước trà đường ở nhiệt độ thường từ 8-15 ngày trong điều kiện hiếu khí và tĩnh [3]. Thành phần nấm men và vi khuẩn trong Kombucha có thể khác nhau đáng kể tùy thuộc vào giống khởi động và các điều kiện lên men. Các loại nấm men phổ biến nhất bao gồm *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces* và *Zygosaccharomyces*. Nấm men phân cắt sucrose thành glucose và fructose và sau đó chuyển hóa chúng thành ethanol và CO<sub>2</sub>. Phần lớn vi khuẩn trong Kombucha là các vi khuẩn acetic như *Acetobacter*, *Gluconobacter* và *Komagataeibacter* chuyển hóa glucose hoặc ethanol thành acid acetic [2]. Vi khuẩn acetic cũng chuyển hóa glucose thành acid gluconic, sau đó thành acid glucuronic. Acid glucuronic được ghi nhận là liên quan đến tác dụng bảo vệ gan của Kombucha. Thêm vào đó, vi khuẩn acetic cần oxy cho lên men, sử dụng đường làm nguồn cacbon và năng lượng để tạo ra màng sinh học chứa cellulose. Thành phần cellulose trong màng có đường kính nhỏ hơn, độ tinh khiết cao hơn, cấu trúc chặt chẽ hơn so với cellulose thực vật và là nguyên liệu tuyệt vời với nhiều ứng dụng trong y học, vật liệu nano, thực phẩm [4].

Đối với các sản phẩm lên men tự nhiên, quá trình lên men phụ thuộc hoàn toàn vào hệ vi sinh vật bản địa. Các nghiên cứu về hệ vi sinh vật liên quan đến quá trình lên men được quan tâm đặc biệt vì nó giúp lựa chọn giống khởi động tốt và điều khiển quá trình lên men để tạo ra sản phẩm với các đặc tính mong muốn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập, định danh các chủng vi khuẩn acetic chiếm ưu thế trong trà Kombucha, sau đó xác định một số đặc điểm sinh hóa, hoạt tính kháng khuẩn và khả năng hình thành biofilm của các chủng phân lập được. Kết quả nghiên cứu thu được góp phần tiếp cận, bảo tồn và khai thác sự đa dạng của nhóm vi khuẩn acetic, định hướng ứng dụng trong sản xuất trà Kombucha và cellulose chất lượng cao.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng/vật liệu nghiên cứu

Mẫu men gốc Kombucha có thu thập từ cộng hòa liên bang Đức. Mẫu được chuyển về Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, Đại học Phenikaa và bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích.

Các chủng vi khuẩn kiểm định được sử dụng bao gồm *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579. Các chủng vi khuẩn kiểm định

được lưu giữ trong glycerol 15% ở -80°C tại Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, Đại học Phenikaa.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phân lập vi khuẩn acetic

Phân lập vi khuẩn acetic từ trà Kombucha lên men được thực hiện bằng phương pháp cấy trải trên đĩa thạch chứa môi trường glucose-ethanol gồm các thành phần: glucose 15 g/L, ethanol 0,5%, peptone 3 g/L và cao nấm men 3 g/L, agar 15 g/L, ủ 30°C trong 48 giờ [5]. Các khuẩn lạc đại diện được chọn lọc và làm thuần bằng cách cấy chuyển lặp lại trên môi trường glucose - ethanol mới. Các chủng thuần thiết sau đó được bảo quản lâu dài trong glycerol 15% ở -80°C hoặc bảo quản ở 4°C trên ống thạch nghiêng và cấy chuyển hàng tháng cho đến khi sử dụng.

### 2.2.2. Xác định đặc điểm kiểu hình của các chủng vi khuẩn acetic phân lập

Các chủng vi khuẩn acetic thuần khiết phân lập từ trà Kombucha được nhuộm Gram và hình thái tế bào được kiểm tra dưới kính hiển vi quang học Olympus CX21 (Nhật Bản) với vật kính dầu 100X. Sự oxi hóa ethanol thành acid acetic và oxi hóa quá mức của ethanol thành CO<sub>2</sub> và nước bởi các vi khuẩn acetic được xác định bằng cách nuôi cấy trên môi trường Carr chứa các thành phần gồm cao nấm men 30 g/L, bromocresol green 0,02 g/L, agar 20 g/L, ethanol 2% và ủ ở 30°C trong 5 ngày [5]. Sự thay đổi màu trên đĩa môi trường Carr được quan sát và ghi nhận sau mỗi 24 giờ. Hoạt tính catalase của chủng vi khuẩn được xác định bằng cách nhỏ vài giọt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lên khuẩn lạc phát triển trên bề mặt thạch. Nếu có bọt khí xuất hiện thì chủng vi khuẩn có catalase dương tính, ngược lại nếu không có bọt khí xuất hiện thì chủng vi khuẩn có catalase âm tính.

### 2.2.3. Phân tích trình tự gen 16S rARN

DNA tổng số được tách chiết bằng cách sử dụng EZ-10 spin column Genomic DNA MiniPreps Kit (Biobasic, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp theo, gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') theo phương pháp được mô tả bởi Yuan và cộng sự (2013) [6]. Kết quả giải trình tự được so sánh với ngân hàng gen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) và cây phát sinh chủng loại được vẽ bằng phần mềm MEGA 7 theo phương pháp Neighbor - Joining, giá trị bootstrap với số lặp lại (replicate) là 1000 lần.

### 2.2.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn acetic

Các chủng vi khuẩn acetic được nuôi cấy trên môi trường MRS (Himedia, Ấn Độ) ở 30°C, 24 giờ, sau đó ly tâm ở 10000 v/p trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Dịch nuôi cấy sau ly tâm được chỉnh pH đến 6,0 - 6,5 bằng NaOH 3N được sử dụng để thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo mô tả của Yue và cộng sự năm 2013 [7]. Các chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng (cao nấm men 5 g/L, pepton 10 g/L, NaCl 10 g/L) ở 37°C, , lắc ở 160 vòng/phút trong 24 giờ. Hút bỏ sung 50 µl mỗi chủng kiểm định vào môi trường LB thạch 1,5% agar đã khử trùng, để nguội đến

40 - 45°C, trộn đều và đổ ra đĩa petri. Mỗi vi khuẩn kiểm định được thực hiện trên 1 đĩa nuôi cấy khác nhau. Sau đó dùng dụng cụ khoan lỗ thạch tạo các giếng đường kính 5 mm trên các đĩa thạch kiểm định và dịch nuôi cấy sau khi ly tâm của các vi khuẩn acetic được nhỏ vào các giếng này. Đĩa thử hoạt tính được giữ ở 4°C trong 4 giờ, sau đó ủ ở 37°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng đường kính của vòng kháng khuẩn trên đĩa thạch.

#### 2.2.5. Xác định khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn acetic

Khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn acetic được xác định theo phương pháp của O'Toole và cộng sự (1999) [8] và Nguyen và cộng sự (2020) [9]. Vi khuẩn acetic nuôi cấy trên môi trường MRS trong 24 giờ được pha loãng trong môi trường mới đến OD660 = 0,01. Dịch pha loãng chứa tế bào (175 µL) được cấy vào đĩa 96 giếng, được làm bằng polystyrene (Biologix). Sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C, dịch nuôi cấy chứa tế bào phù du không tham gia tạo biofilm được loại khỏi giếng và tế bào bám bề mặt giếng được nhuộm với 175 µL dung dịch tím tinh thể 1%, sau đó rửa 5 lần với nước. Giếng được làm khô ở nhiệt độ phòng trong 2 h. Tím tinh thể bám vào tế bào trên giếng được hòa tan bằng 175 µL dung dịch acetone: ethanol (80 : 20, v/v). Chất nhuộm được thu từ 4 giếng trong cùng một điều kiện được đo mật độ quang học ở 570 nm bằng máy đọc ELISA (Benchmark Plus, Bio-Rad, Nhật Bản).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đặc điểm hình thái và phân loại của các chủng vi khuẩn acetic ưu thế trong trà Kombucha

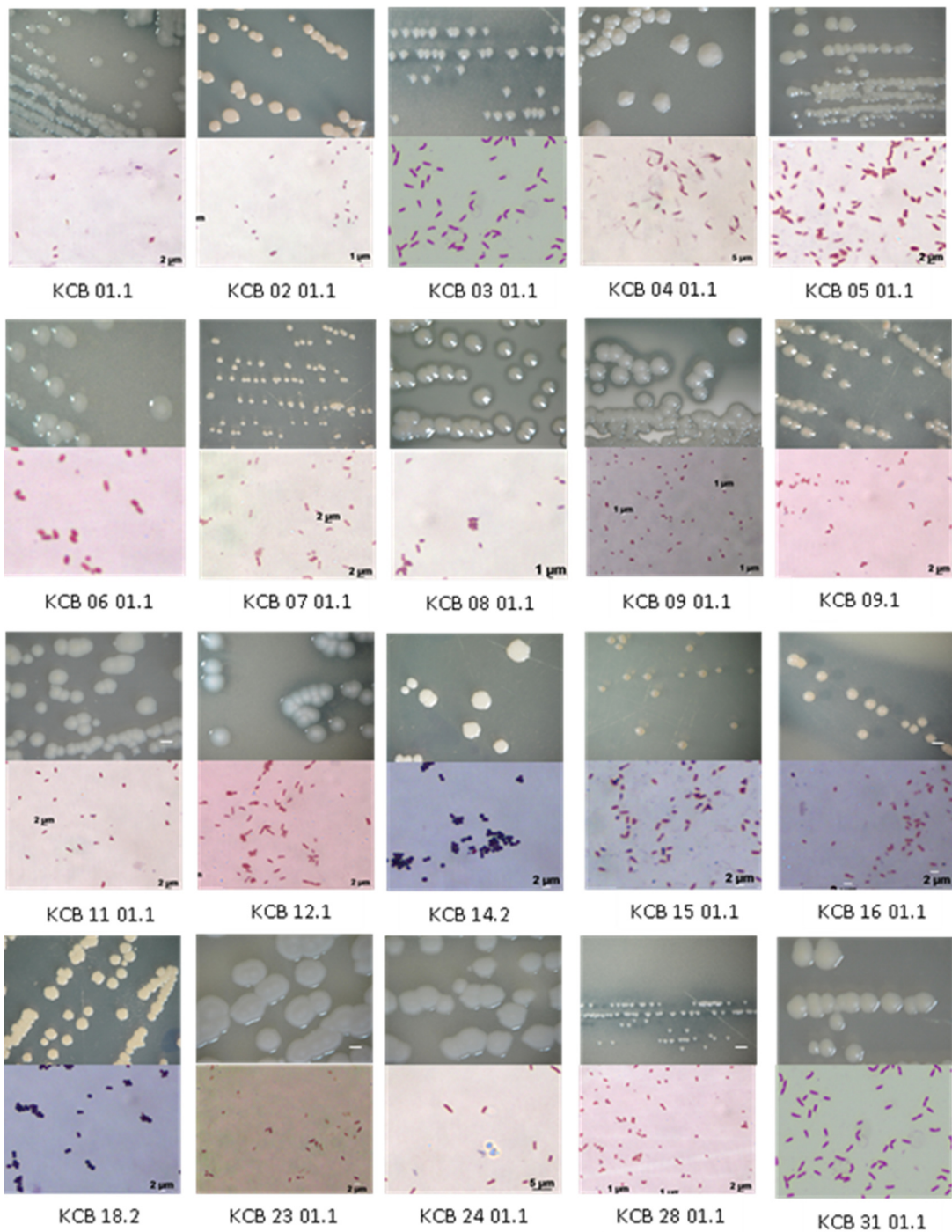
Trong nghiên cứu này, 20 chủng vi khuẩn phân lập từ trà Kombucha được nhuộm Gram và soi dưới kính hiển vi để xác định hình thái tế bào. Kết quả chỉ ra trên Bảng 1 cho thấy có 16/20 chủng vi khuẩn có Gram âm và hình que ngắn với chiều dài tương tự nhau khoảng 1 µm, còn lại là các chủng Gram dương hình cầu hoặc Gram âm, hình que dài. Hình 1 là ảnh khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn phân lập được.

Trong quá trình lên men Kombucha, nấm men thủy phân sucrose thành glucose và fructose nhờ enzym invertase. Nấm men chuyển hóa các loại đường để tạo ra ethanol. Vi khuẩn acetic oxy hóa ethanol thành acid acetic và cuối cùng thành CO<sub>2</sub> và nước [2]. 14/20 chủng vi khuẩn phân lập khi nuôi cấy trên môi trường Carr có sự thay đổi màu môi trường từ màu xanh (màu của bromocresol green trong môi trường Carr) sang màu vàng do xảy ra quá trình lên men acid acetic. Thêm vào đó, sự đảo ngược sang màu xanh sau 120 giờ ủ của 14 chủng này chứng tỏ sự oxy hóa quá mức của acid acetic thành CO<sub>2</sub> (Bảng 1). Kết quả xác định hoạt tính catalase cũng cho thấy, các chủng vi khuẩn phân lập có catalase dương tính (Bảng 1). Dựa trên kết quả đánh giá khả năng chuyển màu môi trường Carr kết hợp với đặc điểm hình thái hình que ngắn và gram âm là những đặc điểm đặc trưng của vi khuẩn acetic, 14/20 chủng vi khuẩn chúng tôi phân lập được có thể thuộc nhóm vi khuẩn acetic. Ảnh hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của một số chủng phân lập được thể hiện trên Hình 1.

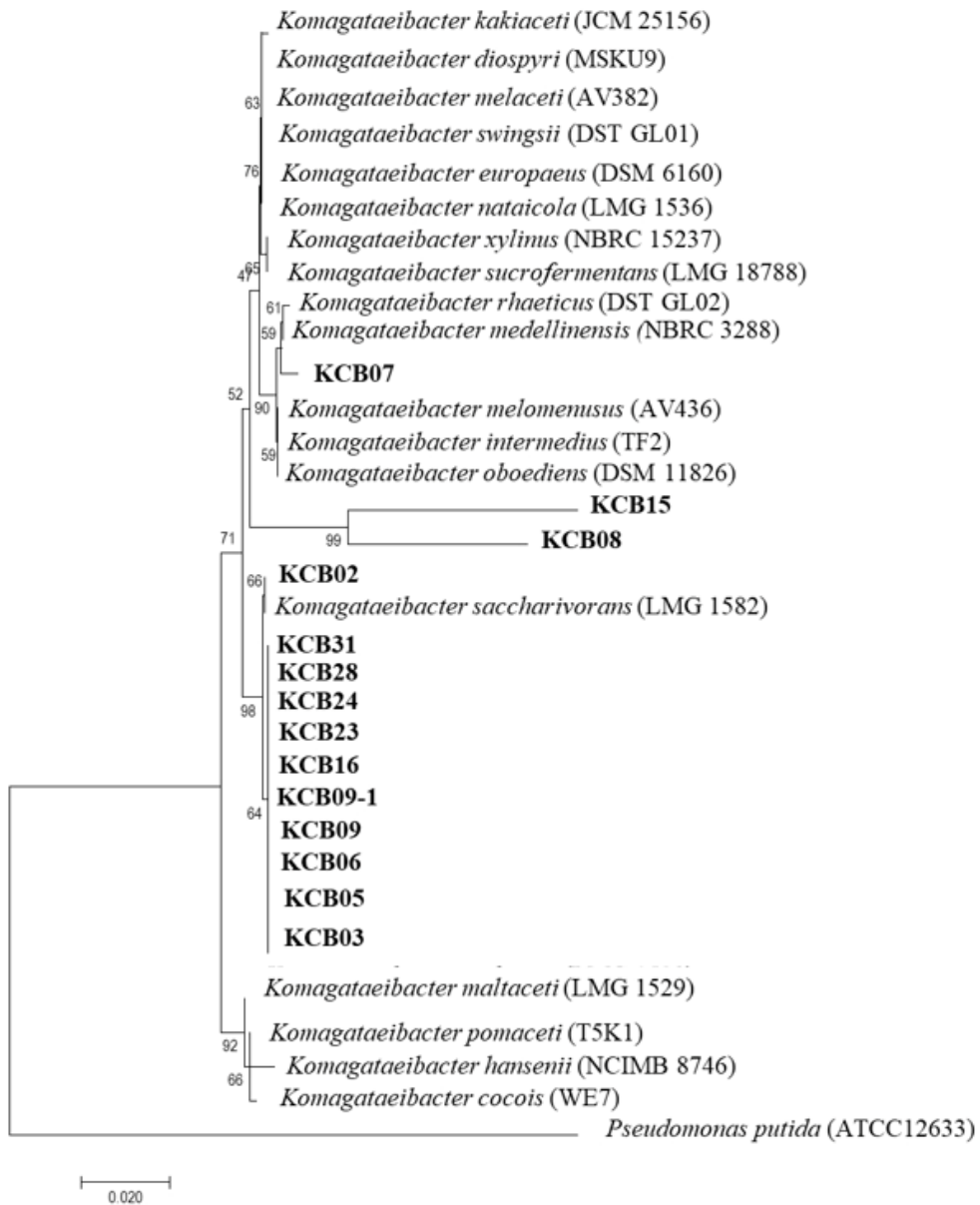
**Bảng 1.** Đặc điểm kiểu hình của các chủng vi khuẩn phân lập từ trà Kombucha

<i>TT</i>	<i>Tên chủng</i>	<i>Gram</i>	<i>Hình thái tế bào</i>	<i>Màu môi trường chuyển từ xanh sang vàng</i>	<i>Màu môi trường chuyển ngược sang xanh</i>	<i>Catalase</i>
1	KCB01.1	-	Hình que ngắn	-	-	+
2	KCB02	-	Hình que ngắn	+	+	+
3	KCB03	-	Hình que ngắn	+	+	+
4	KCB04	-	Hình que dài	-	-	+
5	KCB05	-	Hình que ngắn	+	+	+
6	KCB06	-	Hình que ngắn	+	+	+
7	KCB07	-	Hình que ngắn	+	+	+
8	KCB08	-	Hình que ngắn	+	+	+
9	KCB09	-	Hình que ngắn	+	+	+
10	KCB09.1	-	Hình que ngắn	+	+	+
11	KCB11	-	Hình que ngắn	-	-	+
12	KCB12.1	-	Hình que dài	-	-	+
13	KCB14.2	+	Hình cầu	-	-	+
14	KCB15	-	Hình que ngắn	+	+	+
15	KCB16	-	Hình que ngắn	+	+	+
16	KCB18.2	+	Hình cầu	-	-	+
17	KCB23	-	Hình que ngắn	+	+	+
18	KCB24	-	Hình que ngắn	+	+	+
19	KCB28	-	Hình que ngắn	+	+	+
20	KCB31	-	Hình que ngắn	+	+	+

14 chủng vi khuẩn acetic được tiếp tục tách ADN tổng số và phân lập cũng như giải trình tự đoạn gen 16S rARN. Kết quả phân tích trình tự 16S rRNA của 14 chủng vi khuẩn được thể hiện trên cây phát sinh chủng loại Hình 2. Trong đó, chủng KCB07 có độ tương đồng 99,85% với loài *Komagataeibacter rhaeticus* DST GL02 và được định danh là *Komagataeibacter rhaeticus*. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA của các chủng KCB02, KCB 03, KCB05, KCB06, KCB08, KCB08, KCB09, KCB09.1, KCB15, KCB16, KCB23, KCB24, KCB28 và KCB31 cho thấy có độ tương đồng cao với chủng *Komagataeibacter saccharivorans* LMG 1582 với tỷ lệ tương đồng tương ứng là 99,86%, 99,90%, 99,90%, 99,90%, 99,88%, 99,90%, 99,89%, 99,88%, 99,89%, 99,91%, 99,90%, 99,90% và 99,91%. Dựa trên kết quả này, các chủng KCB02, KCB03, KCB05, KCB06, KCB08, KCB09, KCB09.1, KCB15, KCB16, KCB23, KCB24, KCB28, KCB31 đều được định danh thuộc loài *Komagataeibacter saccharivorans*.



*Hình 1. Ảnh hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn phân lập*

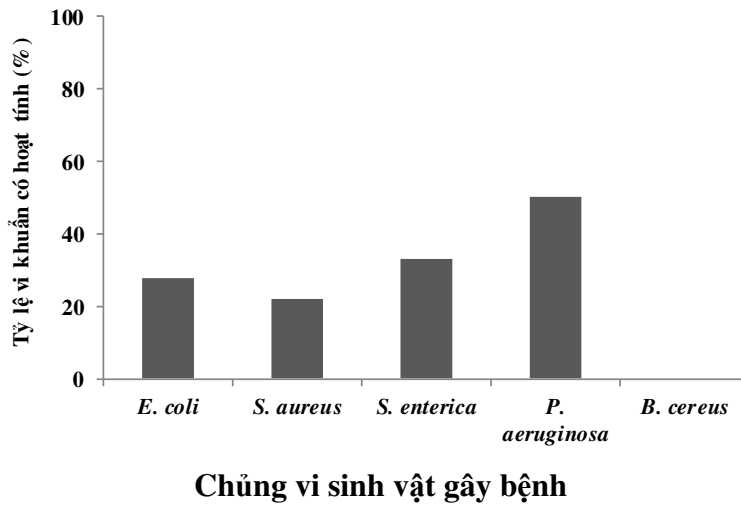


**Hình 2.** Cây phát sinh chủng loại dựa trên so sánh trình tự 16S rARN

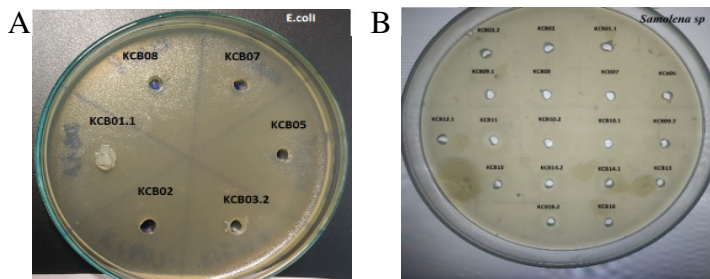
Kết quả phân tích trình tự gen thể hệ mới 16S microbiome của nhóm tác giả Subbiahdoss và cộng sự (2022) cho thấy mẫu Kombucha nghiên cứu có 5 nhóm vi khuẩn bao gồm *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* và *Proteobacteria*, trong đó 95,9% thuộc chi *Komagataeibacter* [5]. Các loài chiếm ưu thế trong chi *Komagataeibacter* là *K. sucrofermentans* (49,4%), *K. rhaeticus* (27,2%) và *K. hansenii* (18,8%). Trong nghiên cứu của chúng tôi, dựa vào giải trình tự 16S rARN, vi khuẩn acetic phân lập được đều thuộc chi *Komagataeibacter*, trong đó *K. rhaeticus* chiếm 7,1 % và *K. saccharivorans* chiếm 92,9 %. Nhìn chung, *Komagataeibacter* được biết đến là chi vi khuẩn chiếm ưu thế trong Kombucha và là chủng sản xuất cellulose rất tốt.

### 3.2. Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn acetic

Khả ức chế của Kombucha đối với các vi khuẩn gây bệnh được biết có thể là các protein phân tử lớn hoặc các chất có hoạt tính sinh học được tổng hợp trong quá trình lên men như acid hữu cơ (acetic...), các peptide, bacteriocin và polyphenol... Trong nghiên cứu này, hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn acetic phân lập từ mẫu Kombucha với 5 chủng vi khuẩn gây bệnh được trình bày trên Hình 3. Ảnh minh họa đĩa thử hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện trên Hình 4 và Hình 5



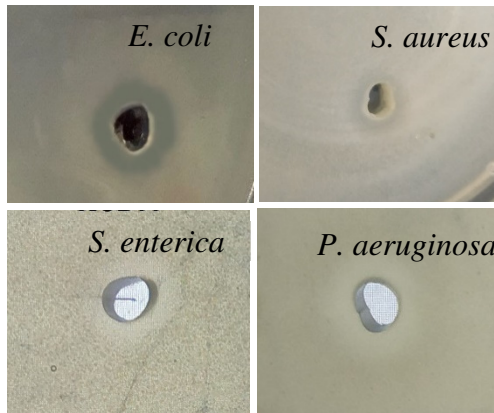
**Hình 3.** Tỷ lệ vi khuẩn acetic có hoạt tính kháng 5 chủng vi khuẩn gây bệnh



**Hình 4.** Ảnh minh họa hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn gây bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập (A: *E. coli*, B: *S. enterica*)

Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng chủng vi khuẩn acetic có hoạt tính kháng *Escherichia coli* ATCC 25922 đạt 27,8%, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 là 22,2%, *Samonella enterica* ATCC 13076 là 33% và cao nhất là *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 đạt 50%. Tuy nhiên, trong số 14 chủng vi khuẩn acetic phân lập được, không có chủng nào có khả năng kháng *Bacillus cereus* ATCC 14579. Trong nghiên cứu của Tu và cộng sự (2020), mẫu trà Kombucha có hoạt tính kháng tốt với cả hai chủng vi khuẩn gây bệnh là *E. coli* K12 và *S. aureus* ATCC 6538 [10].

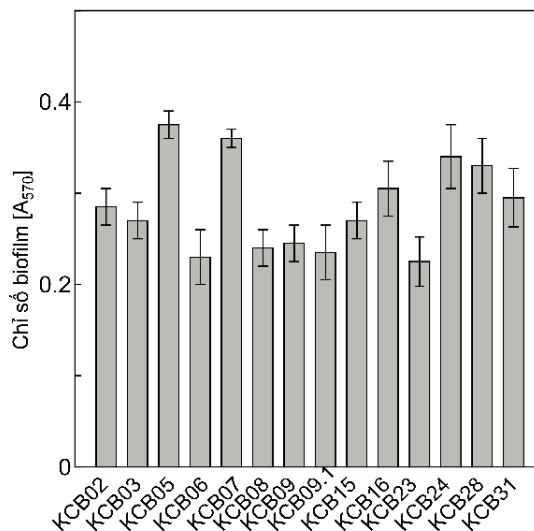




**Hình 5.** Ảnh minh họa hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn gây bệnh của chủng KCB 09.1

### 3.3. Khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn acetic

Trong quá trình lên men Kombucha, vi sinh vật sử dụng sucrose làm nguồn carbon chính, dịch chiết trà cung cấp nguồn nitơ và với sự có mặt của oxi, vi khuẩn acetic tạo ra acid hữu cơ, CO<sub>2</sub> và một lớp biofilm trôi nổi chứa cellulose. Lớp biofilm dày dần lên trong quá trình lên men, thường hình thành nhiều lớp giống như bánh kếp. Chức năng của lớp màng này là bảo vệ các vi sinh vật trong Kombucha chống lại các sinh vật tạp nhiễm và thành phần cellulose trong màng có thể được thu hồi với nhiều ứng dụng trong y sinh và thực phẩm [4]. Khả năng hình thành biofilm của các chủng vi khuẩn acetic phân lập được trình bày trong Hình 6. Như vậy, KCB05, KCB07, KCB24, KCB28 thuộc nhóm các chủng có khả năng tạo biofilm tốt nhất với chỉ số A<sub>570</sub> nằm trong khoảng từ 0,33 - 0,38, tiếp theo là các chủng KCB02, KCB03, KCB15, KCB16, KCB31 với chỉ số A<sub>570</sub> nằm trong khoảng 0,27 - 0,3 và thấp nhất là các chủng KCB06, KCB08, KCB09, KCB09.1, KCB23 với chỉ số A<sub>570</sub> nằm trong khoảng 0,22 - 0,24.



**Hình 6.** Khả năng tạo biofilm các chủng vi khuẩn acetic phân lập từ trà Kombucha

#### 4. KẾT LUẬN

Vi khuẩn acetic chiếm ưu thế phân lập từ trà Kombucha được xác định thuộc chi *Komagataeibacter*, trong đó loài *K. saccharivorans* chiếm đa số, còn lại thuộc loài *K. rhaeticus*. Các chủng vi khuẩn acetic đều có khả năng tạo biofilm. Thêm vào đó, 50% các chủng có khả năng kháng *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và tỷ lệ các chủng vi khuẩn acetic kháng *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Samonella enterica* ATCC 14579 dao động từ 20 - 30%. Các hiểu biết về thành phần vi sinh trong Kombucha có thể giúp xây dựng chiến lược để kiểm soát tốt hơn quá trình lên men cũng như đảm bảo sự an toàn, duy trì chất lượng và kéo dài thời hạn sử dụng của trà Kombucha.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Phenikaa cho đề tài mã số 2-04.2021.01.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. Dufresne, E. Farnworth, "Tea, Kombucha, and health: a review," *Food Research International*, vol. 33, pp. 409-421, 2000.
- [2]. B. Wang, K. Rhtherfurd-Markwick, X. X. Zhang, A. N. Mutukumira, "Isolation and characterization of dominant acetic acid bacteria and yeast isolated from Kombucha samples at point of sale in New Zealand," *Current Research in Food Science*, vol. 5, pp. 835-844, 2022.
- [3]. R. Jayabalan, R. V. Malbasa, E. S. Loncar, J. S. Vitas, M. Sathishkumar, "A Review on Kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 13, pp. 538-550, 2014.
- [4]. Y. A. Ramirez Tapias, M. Victoria Di Monte, M. A. Peltzer, A. G. Salvay, "Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions," *Food Chemistry*, vol. 372, 131346, 2022.
- [5]. G. Subbiahdoss, S. Osmen, E. Reimhult, "Cellulosic biofilm formation of *Komagataeibacter* in Kombucha at oil-water interfaces," *Biofilm*, vol. 4, 100071, 2022.
- [6]. Y. Yuan, F. Feng, L. Chen, Q. Yao, K. Chen, "Directional isolation of ethanol tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar," *European Food Research and Technology*, vol. 236, pp. 573-578, 2013.
- [7]. T. L. Yue, J. J. Pei, & Y. H. Yuan, "Purification and characterization of anti - Alicyclobacillus bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus*," *Journal of Food Protection*, vo. 76, pp. 1575-1581, 2013.

- [8]. G. A. O'Toole, L. A. Pratt, P. I. Watnick, D. K. Newman, V. B. Weaver, R. Kolter, "Genetic approaches to study of biofilms," *Methods in Enzymology*, vol. 310, pp. 91-109, 1999.
- [9]. T. K. N. Nguyen, H. V. Duong, T. T. Nguyen, M. T. N. Dinh, M. H. Nguyen, "Characteristic of co-culture biofilm formed by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*, and antagonistic effects of this biofilm on pathogen growth," *Japan Journal of Food Engineering*, vol. 21, no. 2, pp. 81-87, 2020.
- [10]. C. Tu, W. Hu, S. Tang, L. Meng, Z. Huang, X. Xu, X. Xia, F. Azi, M. Dong, "Isolation and identification of *Starmerella davenportii* strain Do18 and its application in black tea beverage fermentation," *Food Science and Human Wellnes*, vol. 9, pp. 355-362, 2020.

## Isolation and characterization of dominant acetic acid bacteria isolated from Kombucha tea

Đinh Thi Ngọc Mai<sup>1</sup>, Nguyễn Hà Vân<sup>2</sup>, Trần Hữu Phong<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thanh Trung<sup>3</sup>, Nguyễn Kim Nu Thảo<sup>2</sup>, Nguyễn Hồng Minh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bioresource Research Center, Phenikaa University, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup> Faculty of Biology, Hanoi University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup> Laboratory of food microbiology and genetically modified food,  
National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

### Abstract

Kombucha beverage is a traditional and popular natural fermented beverage consumed across the globe. Kombucha beverage is produced by fermenting sweetened black tea, sucrose with consortium of acetic acid bacteria and yeasts. It is important to understand the microbial composition in Kombucha to facilitate better control of the fermentation process. Therefore, this study characterized the dominant acetic acid bacteria in Kombucha sample. Acetic acid bacteria isolated from the Kombucha using glucose-ethanol medium. Based on morphological, biochemical characterization, and 16S rRNA gene, 14 isolated strains belong to 2 species and were identified as *Komagataeibacter saccharivorans* and *Komagataeibacter rhaeticus*. These strains showed good biofilm forming abilities. Furthermore, the antimicrobial activity against five pathogenic bacteria including *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579 of isolated acetic acid bacteria strains was also determined.

**Keywords:** Acetic acid bacteria, Kombucha, antimicrobial activity, biofilm