Vietnam Journal of Food Control

A Scientific Journal of National Institute for Food Control
Journal homepage: https://vjfc.nifc.gov.vn

Research Article

Isolation, selection and identification of lactic bacteria from pickled salt lotus root in Giang Thanh district, Kien Giang province

Huynh Van Quoc Canh*, Le Bich Tuyen, Danh Trung Tinh, Tran Thi Tuyet Nhi, Ho Quoc Viet, Nguyen Van Thuan
Faculty of Food Science and Health, Kien Giang University, Kien Giang, Vietnam

(Received: 16 Apr 2024; Revised: 10 Aug 2024; Accepted: 18 Aug 2024)

Abstract

The study was conducted to isolate, select, and identify the lactic acid bacteria strain with the highest lactic acid fermentation ability from pickled lotus root products in Giang Thanh district, Kien Giang province. From three samples of pickled lotus root collected in Giang Thanh district, 11 lactic acid bacteria strains were isolated and preliminarily identified through colony morphology and some biochemical reactions such as Gram staining and catalase reaction. The results of determining the fermentation type showed that all 11 isolated bacterial strains had a homomorphic fermentation type, the main fermentation product was lactic acid. Of which, strain D15 had the highest lactic acid content, reaching 1.87 mg/mL and had the highest biomass growth ability, with an OD_{600nm} value of 0.947. The 16S rRNA gene sequence of strain D15 was determined with a molecular size of 1469 bp. Comparing the 16S rRNA gene sequence of strain D15 on the gene bank, it has a similarity level of 100% with some lactic acid bacteria strains of the species *Lactobacillus plantarum* and 99.68% when comparing with the 16S rRNA gene sequence of the standard strain *Lactobacillus plantarum.* Constructing a phylogenetic tree and evaluating the genetic relationship of strain D15, the standard strain *Lactobacillus plantarum*, and 9 strains with the highest similarity to strain D15 based on the 16S rRNA gene sequence. The results were classified into 2 large groups with a similarity level of 92%, in which strain D15 is in the same group as the standard strain *Lactobacillus plantarum* and also has a similarity level of 92%.

Keywords*: Lotus root, pickled salt, lactic acid bacteria, probiotic, Lactobacillus plantarum.*

* *Corresponding author: Huynh Van Quoc Canh (E-mail: hvqcanh@vnkgu.edu.vn)*
Doi: https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4366

Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn lactic từ củ sen muối chua tại huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang

Huỳnh Văn Quốc Cảnh*, Lê Bích Tuyền, Danh Trung Tính, Trần Thị Tuyết Nhi, Hồ Quốc Việt và Nguyễn Văn Thuận

Khoa khoa học thực phẩm và sức khỏe, Trường Đại học Kiên Giang, Kiên Giang, Việt Nam

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích phân lập, tuyển chọn và định danh được dòng vi khuẩn lactic có khả năng lên men lactic cao nhất từ sản phẩm củ sen muối chua tại huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang. Từ ba mẫu củ sen muối chua thu thập tại huyện Giang Thành, 11 chủng vi khuẩn lactic đã được phân lập và nhận diện sơ bộ thông qua hình thái khuẩn lạc và một số phản ứng sinh hoá như nhuộm Gram, phản ứng catalase. Kết quả xác định kiểu lên men cho thấy cả 11 chủng vi khuẩn phân lập được đều có kiểu lên men đồng hình, sản phẩm lên men chủ yếu là acid lactic. Trong đó, dòng D15 có hàm lượng acid lactic sinh ra cao nhất, đạt 1,87 mg/mL và có khả năng phát triển sinh khối cao nhất, giá trị OD_{600nm} đạt 0,947. Đã xác định được trình tự gen 16S rRNA của dòng D15 có kích thước phân tử 1469 bp. So sánh trình tự gen 16S rRNA của dòng D15 trên ngân hàng gen có mức độ tương đồng 100% với một số chủng vi khuẩn lactic thuộc loài *Lactobacillus plantarum* và 99,68% khi so sánh cặp với trình tự gen 16S rRNA của chủng chuẩn loài *Lactobacillus plantarum*. Tiến hành xây dựng cây phát sinh loài và đánh giá quan hệ di truyền của dòng D15, chủng chuẩn loài *Lactobacillus plantarum* và 9 chủng có độ tương đồng cao nhất với dòng D15 dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Kết quả phân loại thành 2 nhóm lớn có độ tương đồng 92%, trong đó dòng D15 cùng nhóm với chủng chuẩn loài *Lactobacillus plantarum* và cũng có độ tương đồng 92%.

Từ khóa: *Củ sen, muối chua, vi khuẩn acid lactic, probiotic, Lactobacillus plantarum.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, nhu cầu thực phẩm đối với con người ngày càng được nâng cao. Đặc biệt những loại thực phẩm vừa có giá trị dinh dưỡng, vừa hỗ trợ tốt cho sức khỏe đang được các nhà khoa học và người tiêu dùng quan tâm hàng đầu, đặc biệt là các sản phẩm có chứa probiotic. Vi khuẩn acid lactic là nhóm vi sinh vật được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm probiotic như sữa chua, nem chua, rau củ muối chua ... Những sản phẩm này không chỉ dùng để ăn uống mà còn dùng để hỗ trợ chữa bệnh đường ruột, dạ dày do vi khuẩn lactic có khả năng tạo ra kháng sinh ngăn chặn, tiêu diệt các vi khuẩn và vi trùng gây bệnh [1].

Muối chua rau quả là biện pháp bảo quản truyền thống được sử dụng nhiều ở các nước phương Đông và những nước chưa phát triển trên thế giới, trong đó có Việt Nam [2]. Huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang hiện đang đa dạng hoá các sản phẩm liên quan đến cây sen, trong đó có sản phẩm lên men củ sen muối chua, nhưng hiện tại sản phẩm này chỉ được sản xuất thủ công, quy mô hộ gia đình, quá trình lên men được thực hiện trong điều kiện tự

nhiên, hệ vi sinh vật phức tạp, không thuần chủng nên chất lượng sản phẩm thường không ổn định, các thông số kỹ thuật ảnh hưởng đến quá trình lên men chưa được xác định rõ. Đối với sản phẩm lên men rau củ muối chua, vi khuẩn lactic là một trong những nhân tố quan trọng có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng sản phẩm [3]. Vì vậy, việc phân lập, tuyển chọn và định danh được dòng vi khuẩn lactic thuần chủng có khả năng lên men lactic cao từ sản phẩm củ sen muối chua tại huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang là cần thiết, giúp địa phương tìm ra được nguồn giống vi khuẩn lactic thuần chủng, có hoạt lực lên men cao, nâng cao chất lượng sản phẩm và giúp địa phương chủ động được nguồn giống sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Sản phẩm củ sen muối chua được thu thập tại huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Môi trường được sử dụng là MRS agar và Broth của Ấn Độ. Các hóa chất bao gồm hóa chất nhuộm Gram, H_2O_2, NaOH 0,1N (Việt Nam), phenoltaphlein (Trung Quốc). Cặp mồi cho gene 16S rRNA gồm primer (1492R): 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3' và primer (27F): 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTC-3'.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp lấy mẫu

Sản phẩm củ sen muối chua được thu thập từ 3 hộ gia đình chuyên sản xuất và kinh doanh củ sen muối chua tại huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang. Thu thập từ mỗi hộ gia đình một hộp củ sen muối chua sau 2 tuần lên men (500 g/hộp). Trong quá trình vận chuyển mẫu được giữ trong thùng đá khô và được tiến hành thí nghiệm ngay khi đến phòng thí nghiệm.

2.3.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.3.2.1. Phân lập vi khuẩn lactic

- *Phân lập vi khuẩn lactic*: Lấy 10 mL mẫu nước củ sen muối chua cho vào bình tam giác, thêm 90 mL nước cất vô trùng, lắc đều được dung dịch 10^{-1}, pha loãng đến dung dịch nồng độ 10^{-5}. Hút 100 µL dịch mẫu ở mỗi nồng độ nhỏ lên bề mặt đĩa môi trường MRS agar. Ủ mẫu ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Chọn những khuẩn lạc mọc riêng lẻ có những đặc điểm đặc trưng của vi khuẩn lactic như khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục, nhẵn và có vòng phân giải $CaCO_3$. Tiến hành cấy chuyển những khuẩn lạc này sang đĩa môi trường MRS agar khác theo phương pháp cấy ria. Tiếp tục cấy chuyển các khuẩn lạc cho đến khi thu được các khuẩn lạc mọc tách biệt nhau hoàn toàn. Thu được khuẩn lạc vi khuẩn lactic thuần [4].

- *Nhận diện vi khuẩn lactic*: Vi khuẩn lactic được nhận diện sơ bộ dựa vào hình thái khuẩn lạc, nhuộm Gram, thử hoạt tính catalase, xác định kiểu lên men.

+ Quan sát hình thái khuẩn lạc: Vi khuẩn lactic có khuẩn lạc tròn, màu trắng, nhẵn [4];

+ Nhuộm Gram: Trên lame kính nhỏ một giọt nước cất, dùng que cấy lấy một ít khuẩn lạc (vi khuẩn). Làm vết bôi, đợi đến khi nước cất trên lame khô, nhỏ thêm một giọt cồn để khô tự nhiên hay trên ngọn lửa đèn cồn. Đặt một miếng giấy lọc lên vết bôi. Nhuộm tiêu bản bằng thuốc nhuộm tím kết tinh qua giấy lọc trong 1 phút. Nhuộm Lugol trong 1 phút. Rửa

lại bằng nước cất. Tẩy bằng cồn trong 30 giây. Rửa lại bằng nước. Nhuộm bổ sung bằng Fuchsin từ 30 giây - 1 phút. Rửa lại bằng nước. Làm khô và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi [5].

Kết quả: Nếu tế bào bắt màu xanh tím là vi khuẩn Gram (+), nếu tế bào bắt màu hồng là vi khuẩn Gram (-). Vi khuẩn lactic thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương;

+ Thử hoạt tính catalase: Nhỏ trực tiếp vài giọt H_2O_2 3% lên bề mặt khuẩn lạc vi khuẩn đã được nuôi cấy sau 48 giờ ở 37°C. Quan sát sự xuất hiện bọt khí bằng mắt thường.

Kết quả: nếu có xuất hiện bọt khí là dương tính, ngược lại không xuất hiện bọt khí là phản ứng âm tính. Vi khuẩn lactic không có enzyme catalase (phản ứng catalase âm tính) [6].

+ Xác định kiểu lên men: Xác định kiểu lên men lactic đồng hình và dị hình dựa vào khả năng sinh khí CO_2 trong quá trình lên men glucose của vi khuẩn lactic. Cho ống Durham vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường MRS, hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút ở áp suất 1 atm; cấy các chủng vi khuẩn lactic cần thử vào ống nghiệm, nuôi ở 37°C trong 48 giờ.

Kết quả: nếu ống Durham nổi trên bề mặt môi trường thì chứng tỏ chủng vi khuẩn sinh khí CO_2 (lên men lactic dị hình); nếu ống Durham chìm chứng tỏ chủng vi khuẩn không sinh khí CO_2 (lên men lactic đồng hình).

2.3.2.2. Tuyển chọn vi khuẩn lactic

- *Phương pháp đo mật độ quang (OD)*: Các giống được nuôi tăng sinh trong canh thang MRS. Sau 48 giờ, hút 1 mL tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm trên máy UV-Vis. Giá trị OD càng lớn, thể hiện giá trị sinh khối của vi khuẩn càng cao [1].

- *Định tính acid lactic:* Các giống được nuôi tăng sinh trong canh thang MRS. Sau 48 giờ, hút 3 mL dịch lên men cho vào ống nghiệm, sau đó nhỏ 3 giọt thuốc thử ufenmen vào.

Kết quả: nếu dung dịch có acid lactic thì thuốc thử từ màu xanh tím chuyển sang màu vàng [5].

- *Xác định hàm lượng acid lactic:* Hàm lượng acid sinh ra được xác định theo phương pháp Therner [6].

2.3.2.3. Định danh vi khuẩn lactic

Giải trình tự gene 16S rRNA dòng vi khuẩn lactic có khả năng sinh acid lactic cao nhất. Xác định loài của dòng vi khuẩn đã phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử, sử dụng kỹ thuật giải trình tự 16S rRNA với cặp mồi [7, 8].

+ Primer (1492R): 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'

+ Primer (27F): 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTC-3'

Sản phẩm PCR được tinh sạch và xác định trình tự trên máy đọc trình tự ABI 3500 [9]. Sau khi có kết quả giải trình tự gen 16S rRNA, sử dụng công cụ BLAST để tìm ra những trình tự trong cơ sở dữ liệu Genbank có tỷ lệ tương đồng cao với trình tự truy vấn. Sau đó tiến hành phân tích phát sinh chủng loài, dựa trên sắp hàng nhiều trình tự gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn lactic được tuyển chọn với các trình tự có tỷ lệ tương đồng cao từ Genbank, từ đó xây dựng cây phát sinh loài để xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng đó. Phân tích được thực hiện bằng các công cụ Multiple Align, Phylogeny của phần mềm Mega X [10].

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centrution 16.2. Phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định LSD để kết luận về sự sai khác giữa các nghiệm thức.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn lactic

Từ 3 mẫu sản phẩm củ sen muối chua được thu thập tại huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang đã phân lập được 15 dòng vi khuẩn: D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17. Các dòng vi khuẩn này được quan sát hình thái khuẩn lạc, nhuộm Gram, thử hoạt tính catalase và xác định kiểu lên men. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. *Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và sinh hoá của các dòng vi khuẩn phân lập*

Dòng	Hình thái khuẩn lạc	Gram	Catalase	Kiểu lên men
D3	Trắng sữa, lồi, bề mặt trơn bóng.	+	-	Đồng hình
D4	Trắng ngà, đều, bề mặt trơn.	+	-	Đồng hình
D5	Trắng đục, lồi, bề mặt trơn.	+	-	Đồng hình
D6	Trắng trong, dẹt, đều, không lồi.	-	+	-
D7	Trắng sữa, đều, bề mặt nhẵn.	+	-	Đồng hình
D8	Trắng sữa, lồi, mép phẳng.	+	-	Đồng hình
D9	Trắng sữa, đều, mép răng cưa.	+	-	Đồng hình
D10	Trắng sữa, nhân hơi vàng, tròn, đều.	+	+	-
D11	Vàng nhạt, dẹt, mép răng cưa.	-	+	-
D12	Trắng trong, tròn, lồi, mép nhẵn.	-	+	-
D13	Trắng ngà, lõm, tròn, mép răng cưa.	+	-	Đồng hình
D14	Trắng đục, tròn, đều.	+	-	Đồng hình
D15	Trắng sữa, tròn, lồi, mép nhẵn.	+	-	Đồng hình
D16	Trắng ngà, tròn, đều, mép răng cưa.	+	-	Đồng hình
D17	Trắng ngà, nhân hơi vàng, tròn.	+	-	Đồng hình

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy có 11 dòng được xác định là vi khuẩn lactic: D3, D4, D5, D7, D8, D9, D13, D14, D15, D16, D17 (Gram (+), catalase (-), khuẩn lạc có màu trắng, hình tròn). Hình 1 thể hiện hình ảnh khuẩn lạc đặc trưng của dòng D15. Đặc điểm hình dạng khuẩn lạc tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thanh Huyền và cộng sự [11], Nguyễn Ngọc Thạnh và cộng sự [12], cho thấy đây là các chủng vi khuẩn phân bố rộng rãi trong các sản phẩm lên men lactic, đặc biệt là các sản phẩm lên men lactic từ rau quả. Các dòng vi khuẩn lactic phân lập được là nhóm vi khuẩn Gram dương do bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm crystal violet điều này phù hợp với nghiên cứu của Trương Thị Thúy Quyên và cộng sự [13] cũng phù hợp với nghiên cứu của Dương Thị Hồng Nga và cộng sự [14] khi nhuộm Gram 19 dòng vi khuẩn lactic phân lập từ nem chua. Bên cạnh đó, 11 dòng được xác định là vi khuẩn lactic là những dòng không xảy ra hiện tượng hình thành bọt khí khi kiểm tra với

H_2O_2 3%, kết quả nghiên cứu này phù hợp với Trần Ngọc Được và cộng sự [15] khi thử hoạt tính catalase 65 dòng vi khuẩn lactic phân lập từ cơm mẻ đều âm tính.

Kết quả cũng cho thấy cả 11 dòng vi khuẩn lactic phân lập được đều có kiểu lên men đồng hình, sản phẩm lên men chủ yếu là acid lactic, phù hợp với nghiên cứu của Dương Thị Hồng Nga và cộng sự [14].

Hình 1. *Khuẩn lạc của dòng D15*

3.2. Tuyển chọn vi khuẩn lactic

Mười một dòng vi khuẩn lactic đã phân lập được tuyển chọn thông qua khả năng phát triển sinh khối và sản sinh acid lactic trong canh thang MRS, kết quả được thể hiện ở Bảng 2:

Bảng 2. *Khả năng sinh acid lactic của 11 chủng lactic*

Dòng	Giá trị OD_{600nm}	Định tính acid lactic	Hàm lượng acid lactic (mg/mL)
D3	$0,343^{a}$	+	$0,648^{a}$
D4	$0,659^{c}$	+	$1,584^{c}$
D5	$0,463^{b}$	+	$1,188^{b}$
D7	$0,848^{d}$	+	$1,773^{d}$
D8	$0,866^{e}$	+	$1,791^{d}$
D9	$0,845^{de}$	+	$1,773^{d}$
D13	$0,857^{e}$	+	$1,782^{d}$
D14	$0,836^{de}$	+	$1,794^{d}$
D15	$0,947^{f}$	+	$1,872^{e}$
D16	$0,824^{de}$	+	$1,782^{d}$
D17	$0,793^{de}$	+	$1,785^{d}$

Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột, các chữ cái a, b, c, d, e, f thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%

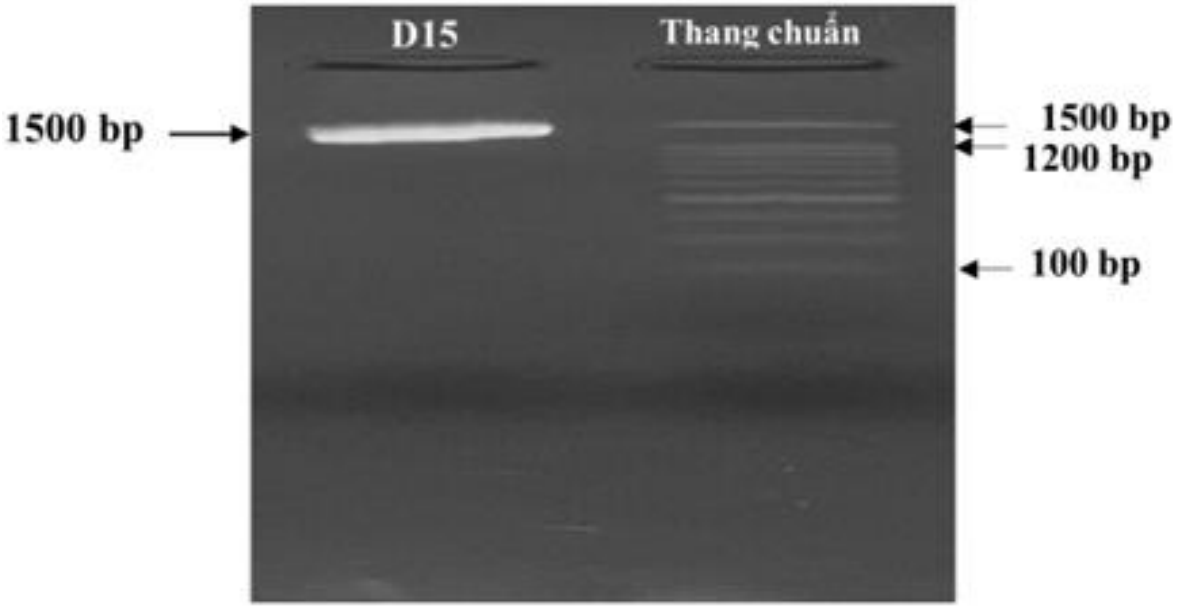
Kết quả định tính acid lactic trong dịch lên men của 11 dòng vi khuẩn lactic phân lập được đều dương tính. Điều này phù hợp với kết quả xác định kiểu lên men của các dòng vi khuẩn trên, đều là kiểu lên men đồng hình, sản phẩm chủ yếu của quá trình lên men là acid

lactic [14]. Hàm lượng acid lactic sinh ra của 11 dòng vi khuẩn lactic tương đồng với các nghiên cứu của Trần Ngọc Được [15], Dương Thị Hồng Nga [14]. Điều đó chứng tỏ vi khuẩn lactic phân lập tại huyện Giang Thành, tỉnh Kiên Giang có hoạt tính lên men lactic tương đồng với các nghiên cứu đã công bố.

Từ kết quả thể hiện ở Bảng 2 cho thấy, dòng D15 có chỉ số OD và hàm lượng acid lactic sinh ra cao nhất tương ứng là 0,947 và 1,872 mg/mL. Kết quả này đối sánh với nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hằng và cộng sự [5] thì tương đồng về phương pháp tiến hành, thời gian kết thúc đo hàm lượng acid lactic sinh ra. Vì vậy dòng D15 thích hợp làm nguồn giống sản xuất củ sen muối chua cho huyện Giang Thành và được chọn để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

3.3. Định danh dòng vi khuẩn lactic bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Trong 11 dòng vi khuẩn lactic phân lập được, dòng D15 có khả năng phát triển sinh khối và lên men acid lactic cao nhất nên được chọn để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Dòng D15 được giải trình tự bằng cặp mồi 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') và 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') tại vùng gen 16S rRNA, với kích thước đoạn gen 1500 bp. Dòng D15 có tổng số nucleotide được giải trình tự là 1469 nucleotide, giải trình tự 2 chiều không có đột biến PCR do sử dụng hotstart Taq của Qiagen nên sai số thấp, không có phát sinh đột biến điểm SNP. Kết quả sản phẩm PCR của dòng D15 cho thấy DNA nằm trong khoảng 1500bp (Hình 2).

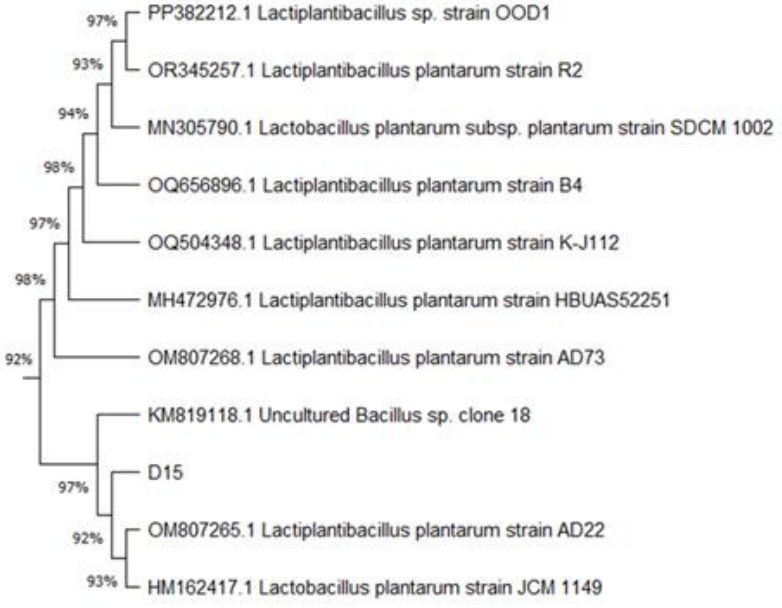


Hình 2. *Phổ điện di sản phẩm khuếch đại gen 16s rRNA của dòng D15*

Kiểm tra sơ bộ bằng công cụ BLAST trên GenBank cho thấy trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng D15 có tỷ lệ tương đồng 100% với một số chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus plantarum* nhưng không phải chủng chuẩn. Khi so sánh cặp trình tự gen 16S rRNA của dòng D15 và chủng chuẩn *Lactobacillus plantarum* có mức độ tương đồng 99,86%. Kết quả thể hiện ở Hình 3.

Hình 3. *Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của dòng D15 trên GenBank*
(a) Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của dòng D15 trên Genbank với các chủng có độ tương đồng từ cao đến thấp; (b) Kết quả so sánh cặp giữa trình tự gen 16S rRNA của dòng D15 và chủng chuẩn của loài Lactobacillus plantarum

Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank nhằm mục đích cho một kết quả tham khảo với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Tuy nhiên, dựa vào kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài. Do đó, qua tham khảo kết quả trên cơ sở dữ liệu GenBank chọn ra 9 chủng nằm trên cùng, và chủng chuẩn (HM162417.1 - *Lactobacillus plantarum strain JCM*_1149) của loài *Lactobacillus plantarum* để so sánh mức độ tương đồng trình tự vùng 16S-rRNA với dòng D15 để xác định mối quan hệ di truyền, xây dựng cây phát sinh loài. Kết quả thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. *Cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rRNA của dòng D15, chủng chuẩn và các chủng vi khuẩn lactic thuộc loài Lactobacillus plantarum*

Dựa vào cây phát sinh loài ở Hình 4 cho thấy 11 chủng được chọn được phân thành 2 nhóm lớn. Nhóm 1 gồm có 4 chủng: HM162417.1 - *Lactobacillus plantarum strain JCM 1149* (chủng chuẩn), OM807265.1 - *Lactiplantibacillus plantarum strain AD22*, dòng D15

và KM819118.1 - *Uncultured Bacillus sp. clone 18*. Trong đó, chủng HM162417.1 có tỷ lệ tương đồng 93% với chủng OM807265.1; dòng D15 có tỷ lệ tương đồng 92% với chủng chuẩn và OM807265.1; KM819118.1 có tỷ lệ tương đồng 97% với chủng chuẩn, dòng D15 và OM807265.1. Giữa dòng D15 và chủng chuẩn của loài *Lactiplantibacillus plantarum* có giá trị bootstrap là 92%, cho thấy có sự tương đồng khá cao, nhưng thấp hơn giữa các nhóm khác, vì vậy chúng vẫn có sự khác biệt di truyền nhất định. Nhóm 2 gồm có 7 chủng: MN305790.1 - *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum strain SDCM 1002*, MH472976.1 - *Lactiplantibacillus plantarum strain HBUAS52251*, PP382212.1 - *Lactiplantibacillus sp. strain OOD1*, OR345257.1 - *Lactiplantibacillus plantarum strain R2*, OQ656896.1 - *Lactiplantibacillus plantarum strain B4*, OQ504348.1 - *Lactiplantibacillus plantarum strain K-J112* và OM807268.1 - *Lactiplantibacillus plantarum strain AD73*. Giữa các chủng trong nhóm 2 cũng có mức độ tương đồng khá cao từ 93-98%. Giữa nhóm 1 và nhóm 2 có độ tương đồng 92%. Tóm lại, các giá trị bootstrap trên 90% thể hiện sự hỗ trợ mạnh mẽ cho các nhánh trong cây phân loại này, cho thấy mức độ tương đồng di truyền cao giữa các chủng được liên kết với nhau. Các nhóm với giá trị bootstrap càng cao thì mức độ tương đồng và độ tin cậy của mối quan hệ di truyền càng lớn [16].

4. KẾT LUẬN

Từ 3 mẫu sản phẩm củ sen muối chua tại Giang Thành, tỉnh Kiên Giang, 11 dòng vi khuẩn lactic đã được phân lập và nhận diện sơ bộ dựa vào hình thái khuẩn lạc và một số phản ứng sinh hóa như nhuộm Gram, thử hoạt tính catalase, xác định kiểu lên men. Trong 11 dòng vi khuẩn lactic đã phân lập được, dòng D15 có khả năng phát triển sinh khối và hoạt lực lên men acid lactic cao nhất, cụ thể sau 48 giờ nuôi trong canh thang MRS chỉ số OD_{600nm} đạt 0,947 và hàm lượng acid lactic sinh ra là 1,872 mg/mL. Dòng D15 được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử, giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của dòng D15 trên ngân hàng gen có tỷ lệ tương đồng 100% với một số chủng thuộc loài *Lactobacillus plantarum* và 99,68% với chủng chuẩn của loài *Lactobacillus plantarum*. Tiến hành xây dựng cây phát sinh loài cho dòng D15, chủng chuẩn của loài *Lactobacillus plantarum* và 9 chủng có độ tương đồng cao nhất trong kết quả so sánh trên Genbank. Kết quả cây phân loại chia thành 2 nhóm lớn có độ tương đồng 92%, trong đó dòng D15 cùng nhóm với chủng chuẩn của loài *Lactobacillus plantarum* và có độ tương đồng 92%. Điều này cho thấy dòng D15 có độ tương đồng khá cao với loài *Lactobacillus plantarum*, tuy nhiên vẫn có sự khác biệt di truyền nhất định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Le Ngoc Tram Anh, Dang Tri Trung, Nguyen Ngoc Thanh, Bui Hoang Dang Long, Ngo Thi Phuong Dung, and Huynh Xuan Phong, "Isolation and selection of lactic acid bacteria applied in papaya juice fermentation," *Dong Thap University Journal of Science*, vol. 21, pp. 90-94, 2016 (in Vietnamese).

[2]. B. D. Arimah, O. P. Ogunlowo, M. A. Adebayo, C. Jesumirhewe, "Identification of lactic acid bacteria isolated from selected Nigerian foods and comparison of their

bacteriocins activities," *International Journal of ChemTech Research*, vol. 6, no. 2, pp. 20-26, 2014.

[3]. Nguyen Van Muoi, Nguyen Ngoc Huynh Tran, and Tran Thanh Truc, "Effects of fruit size and fermented batch weight on lactic acid fermentation of cucumbers," *CTU Journal of Sciences*, vol. 28, pp. 44-51, 2013 (in Vietnamese).

[4]. Ngo Thi Phuong Dung, Huynh Thi Yen Ly, and Huynh Xuan Phong, "Isolation and selection of lactic acid bacteria producing anti-bacterial substances," *CTU Journal of Sciences*, vol. 19a, pp. 176-184, 2011 (in Vietnamese).

[5]. Tran Thanh Thuy, Microbiology Practice Guide, Ho Chi Minh City: Education Publishing House, 1999 (in Vietnamese).

[6]. Nguyen Thi Minh Hang and Nguyen Minh Thu, "Isolation and selection of amylase and bacteriocin-producing lactic acid bacteria," *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 3, pp. 003-010, 2013 (in Vietnamese).

[7]. Huynh Ngoc Tam, Tran Thanh Truc, Nguyen Van Muoi, and Ha Thanh Toan, "Selection of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented small melon (Cucumis melo L.)," *CTU Journal of Sciences*, vol. 1, pp. 18-24, 2016 (in Vietnamese).

[8]. W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane, "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study," *Journal of bacteriology*, vol. 173, no. 2, pp. 697-703, 1991.

[9]. J. Sambrook and D. W. Russell, Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition, vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, pp. 6.4-6.12.

[10]. K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027, 2021.

[11]. Nguyen Thanh Huyen, Le Thi Mai Anh, Nguyen Thi Bich Thuy, Ngo Xuan Nghien., Tran Thi Dao, Phan Thi Thu Trang, Vu Thi Thuy, Nguyen Hoang Anh, Hoang Thi Ha, Do Thi Hanh and Nguyen Xuan Canh." Isolation, selection of lactic bacteria and application in experimental processing of fermented ooty mushroom products," *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol 19, pp 379-388, 2021 (in Vietnamese).

[12]. Nguyen Ngoc Thanh, Huynh Xuan Phong, Nguyen Thi Viet Trinh, Huynh Thi Thu Ba, Bui Hoang Dang Long, and Ngo Thi Phuong Dung, "Isolation and selection of lactic acidaicd bacteria applied in spirulina supplemented yogurt fermentation," *CTU Journal of Sciences*, vol. 40, pp. 8-14, 2015 (in Vietnamese).

[13]. Truong Thi Thuy Nguyen, Le Thi Minh Thu, Tran Ngoc Han, Nguyen Thi My Tien, Mai Hoai Anh, Nguyen Ngoc Thanh, Bui Hoang Dang Long, and Huynh Xuan Phong, "Isolation and selection of lactic acid bacteria and application in fermention of mushroom (Volveriella volvacea)," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no. 01, pp. 3-10, 2020 (in Vietnamese).

[14]. Duong Thi Hong Nga, Mai Thanh Hai, Lu Bao Han, Ly Thi Xuan Mai, and Bui Thi Quynh Hoa, "Isolation and selection of lactic acid bacteria strains present in "nem chua

thit" for use as stater cultures," *CTU Journal of Sciences*, vol. 59, no. 3, pp. 86-93, 2023 (in Vietnamese).

[15]. Tran Ngoc Duoc, Tran Nhanh Dung, Bui Thi Minh Dieu, and Do Tan Khang, "Diversity of lactic acid bacteria isolated from "Com me" collected from different ecological regions in Mekong Delta," *CTU Journal of Sciences*, vol. 25, pp. 58-66, 2013 (in Vietnamese).

[16]. J. Felsenstein, "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap," *Evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783-791, 1985.