

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có đặc tính probiotic từ sữa lên men tự nhiên

Trần Văn Chí^{1*}, Nguyễn Mạnh Tuấn²

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, phường Quyết Thắng, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

²Viện Khoa học Sự sống, Đại học Thái Nguyên, phường Quyết Thắng, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/1/2026; ngày chuyển phản biện 22/1/2026; ngày nhận phản biện 2/2/2026; ngày chấp nhận đăng 13/2/2026

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm phân lập và đánh giá các chủng vi khuẩn lactic (LAB) có đặc tính probiotic từ sữa bò lên men tự nhiên tại Thái Nguyên. Từ năm mẫu sữa thu thập, năm chủng LAB đã được phân lập và kiểm tra đặc tính sinh học. Tất cả đều có khả năng sinh lactic acid trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Trong đó, chủng LAB-TNSC-29 nổi bật với mức sinh lactic acid cao (2,96 mg/100 ml), khả năng tồn tại trong môi trường pH thấp (3,23 log CFU/ml), đồng thời thể hiện nhiều đặc tính probiotic, bao gồm khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh (*Escherichia coli*, *Streptococcus gallinarum*, *Staphylococcus aureus*) và khả năng đồng bám dính với *E. coli* đạt 48,35%. Phân tích trình tự gen 16S rRNA (1483 bp) cho thấy, chủng này có độ tương đồng 99,39% với *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T. Đồng thời, sơ đồ phả hệ cho thấy chủng LAB-TNSC-29 thuộc nhóm chi *Lactobacillus* và cùng nhánh đơn với *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T. Do đó, chủng LAB-TNSC-29 được xác định là *Lactobacillus acidophilus* LAB-TNSC-29, có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm probiotic.

Từ khóa: *Lactobacillus*, probiotic, tuyển chọn, vi khuẩn lactic (LAB).

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Isolation and selection of probiotic lactic acid bacteria from naturally fermented milk

Van Chi Tran^{1*}, Manh Tuan Nguyen²

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University, Quyet Thang Ward, Thai Nguyen Province, Vietnam

²Institute of Life Sciences, Thai Nguyen University, Quyet Thang Ward, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 21 January 2026; revised 2 February 2026; accepted 13 February 2026

Abstract:

This study aimed to isolate and evaluate probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains from naturally fermented cow's milk in Thai Nguyen. From five collected milk samples, five LAB strains were isolated and had their biological characteristics evaluated. All strains were capable of producing lactic acid under *in vitro* culture conditions. Among them, strain LAB-TNSC-29 showcased outstanding performance, with high lactic acid production (2.96 mg/100 ml), strong survival under low-pH conditions (3.23 log CFU/ml), and notable probiotic properties, including inhibition of pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Streptococcus gallinarum*, and *Staphylococcus aureus*) and co-aggregation with *E. coli* at 48.35%. Analysis of the 16S rRNA gene sequence (1483 bp) revealed that this strain shared 99.39% sequence similarity with *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T. Simultaneously, the phylogenetic tree revealed that strain LAB-TNSC-29 belongs to the genus of *Lactobacillus* and forms a monophyletic clade with *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T. Therefore, LAB-TNSC-29 was identified as *Lactobacillus acidophilus* LAB-TNSC-29, holding strong potential for application in the production of probiotic formulations.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus*, probiotic, selection.

Classification numbers: 1.6, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: tranvanchi@tuaf.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Sữa là nguồn thực phẩm giàu dinh dưỡng và chứa hệ vi sinh vật phong phú, trong đó có nhóm vi khuẩn lactic (LAB) không sinh độc tố [1]. Vi khuẩn lactic đóng vai trò quan trọng trong quá trình lên men thực phẩm, tạo hương vị và bảo quản sản phẩm. LAB được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thực phẩm lên men, đặc biệt là các sản phẩm từ sữa như sữa chua, phô mát, đồng thời còn được ứng dụng trong chế biến các sản phẩm thịt, bánh mì, rượu vang [2] và những thực phẩm cần quá trình acid hóa nhằm ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây hư hỏng [3]. Trong quá trình lên men, LAB tạo ra lactic acid có khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh thông qua việc thẩm thấu qua màng tế bào, làm giảm pH nội bào hoặc gây rối loạn hoạt động trao đổi chất, dẫn đến sự chết của các tế bào nhạy cảm [4]; ngoài ra, LAB còn sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn như diacetyl và bacteriocin, góp phần tăng cường hiệu quả ức chế vi sinh vật gây hại [5] với tính kháng khuẩn mạnh mẽ. Nhờ khả năng bám dính và đồng bám dính, các chủng LAB có thể hình thành hàng rào sinh học trong hệ tiêu hóa, giúp ngăn cản sự xâm nhập của vi sinh vật gây bệnh [6]. Trong một số trường hợp, có thể tận dụng vi khuẩn LAB có sẵn trong các nguyên liệu, bằng cách tạo điều kiện cho chúng phát triển chiếm ưu thế để tạo ra rất nhiều loại thức ăn chua có hương vị thơm ngon, dễ tiêu hóa hơn và giữ được lâu hơn [7]. Bên cạnh vai trò trong công nghệ thực phẩm, LAB còn mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe như hỗ trợ phòng ngừa các bệnh đường ruột nhờ đặc tính kháng khuẩn, giảm nguy cơ nhiễm trùng đường tiết niệu [8], giảm cholesterol trong máu [9] và có tiềm năng hỗ trợ chống dị ứng và hỗ trợ phòng ngừa ung thư [10]. Trong sản xuất công nghiệp luôn cần tìm kiếm những chủng mới từ nhiều nguồn khác nhau, đảm bảo có hoạt tính probiotic mạnh để định hướng ứng dụng trong sản xuất.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất sử dụng

Nguồn mẫu gồm 5 mẫu sữa bò lên men tự nhiên, thu thập tại các hộ gia đình nuôi bò sữa trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên. Các vi khuẩn kiểm định: *E. coli* ATCC 10798, *S. gallinarum* ATCC 49573, *S. aureus* ATCC 6538.

Môi trường nuôi cấy: sử dụng môi trường là MRS (de Man, Rogosa and Sharpes) [11] với thành phần tiêu chuẩn: pepton: 10 g; cao thịt: 10 g; cao nấm men: 5 g; glucose: 20 g; tween 80: 1 ml; CH_3COONa : 5 g; triamonium citrate: 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,05 g; CaCO_3 : 2 g; K_2HPO_4 : 2 g; agar: 15 g; nước cất: 1.000 ml; pH: 6,2-6,4.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn lactic: 1 ml mẫu được làm giàu trong môi trường MRS (99 ml), đồng nhất và nuôi ở 37°C trong 24 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Các ống có độ đục được chọn và tiếp tục cấy vào đĩa thạch MRS, ủ 24-72 giờ ở 37°C. Khuẩn lạc trắng và kem giả định là vi khuẩn lactic, được tinh sạch qua ba lần chuyển trên môi trường MRS. Xác định đặc điểm sinh học gồm nhuộm Gram, hình thái tế bào, phản ứng catalase và phân giải CaCO_3 . Chủng Gram dương, phân giải CaCO_3 , không có hoạt tính catalase được coi là vi khuẩn lactic và bảo quản ở -20°C trong môi trường MRS có bổ sung 30% glycerol [12, 13].

Định lượng lactic acid: Lấy 10 ml dịch lên men ly tâm ở tốc độ và thời gian là: 8.000 vòng/phút và 10 phút, tách cặn, thêm 20 ml nước cất và nhỏ 2-3 giọt phenolphthalein (1% trong cồn 90°), chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N, khi nào xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại [14].

Độ axit được tính như sau: Độ Therner ($^{\circ}\text{T}$) = $V_{\text{NaOH}} \times 10$; % lactic acid = $^{\circ}\text{T} \times 0,009$ (1 ml dung dịch NaOH tương đương 0,009 g lactic acid).

Đánh giá khả năng chống chịu với môi trường pH thấp: Các chủng được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS dịch thể ở 37°C trong 48 giờ; thu lấy sinh khối bằng cách ly tâm khoảng 10 phút ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 5.000 vòng/phút. Cặn được rửa bằng 1,5 ml nước cất vô trùng và tạo dịch huyền phù để bơm vào ống nghiệm có sẵn môi trường MRS đã chỉnh pH 2,5 và pH 3,0 ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm sống [15, 16].

Xác định hoạt tính kháng khuẩn: Nuôi cấy chủng tuyển chọn trong môi trường MRS dịch thể ở 37°C. Sau 48 giờ, ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút và thu dịch trong. Nhỏ 0,5 ml dịch trong vào các khoanh giấy thấm trên đĩa đã cấy sẵn vi khuẩn kiểm định, nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Đo đường kính vòng vô khuẩn xung quanh khoanh giấy thấm: D-d, mm. Trong đó D là đường kính vòng vô khuẩn (mm), d là đường kính khoanh giấy thấm (mm) [17].

Đánh giá khả năng đồng bám dính của vi khuẩn tuyển chọn: Nuôi riêng biệt chủng tuyển chọn và chủng kiểm định (*E. coli*) trong môi trường MRS dịch thể ở 37°C trong 48 giờ, lấy 10 ml dịch sau nuôi mỗi loại chuẩn mật độ tế bào về khoảng 2×10^8 CFU/ml, hút 4 ml mẫu ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C thu sinh khối và tái huyền phù riêng biệt vào 2 ml dung dịch đệm sodium phosphate 0,1 M (pH 7). Trộn lẫn hai huyền phù với cùng thể tích và ủ ở 37°C trong 5 giờ. Phần dịch huyền phù

riêng biệt còn lại lấy làm mẫu đối chứng. Sau mỗi giờ ủ, lấy 100 μ l trộn với 3,9 ml dịch đệm tương tự và đo độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm [18]. Tỷ lệ đồng bám dính (Ca%) được tính theo công thức:

$$\text{Ca\%} = \frac{(Ax + Ay)/2 - A(x + y)}{(Ax + Ay)/2} \times 100$$

trong đó: Ax là OD₆₀₀ của vi khuẩn tuyển chọn; Ay là OD₆₀₀ của *E. coli*; A(x + y) là OD₆₀₀ vi khuẩn tuyển chọn và *E. coli*.

Tách chiết DNA tổng số vi khuẩn tuyển chọn: Nuôi vi khuẩn đã chọn trong môi trường MRS lỏng trong 36 giờ ở 37°C, nuôi lắc ở 130 vòng/phút. Thu sinh khối tế bào bằng ly tâm, DNA tổng số được tách chiết theo mô tả của J. Sambrook và cs (2001) [19]. Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn được khuếch đại bằng cặp mồi 27F và 1492R với thành phần và điều kiện phản ứng polymerase chain reaction (PCR) theo mô tả của A. Klindworth và cs (2013) [20]. Sản phẩm PCR được giải trình tự tại đơn vị làm dịch vụ.

Phân loại chủng tuyển chọn: Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn được so sánh với cơ sở dữ liệu các loài chuẩn công bố trên EzBioCloud [21], với giới hạn phân loại về mức độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA theo mô tả của H.P. Browne và cs (2016) [22]. Sơ đồ phả hệ của chủng vi khuẩn cũng được xây dựng để xác định vị trí phân loại thông qua phần mềm MEGA v.12 [23].

Xử lý số liệu: Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần, tổng hợp số liệu trên phần mềm Microsoft Office 2015 và xử lý thống kê trên phần mềm JASP 0.19.3.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập vi khuẩn lactic từ nguồn sữa tự nhiên

Từ 5 mẫu sữa tươi thu thập trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên, 5 chủng vi khuẩn đã được phân lập, thông qua

việc quan sát vòng phân giải CaCO₃ có thể kết luận chúng có khả năng sinh acid hữu cơ. Đặc điểm của các chủng được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào các chủng mới phân lập.

TT	Nguồn mẫu	Ký hiệu chủng	Hình dạng khuẩn lạc	Gram	Hình dạng tế bào	Catalase
1	Phú Lương	LAB-PL-23	Hình tròn, trắng sữa, hơi dẹt, bề mặt nhẵn, không rìa	+	Hình cầu	-
2	Đại Từ	LAB-DT-9	Hình tròn, trắng sữa, hơi dẹt, bề mặt nhẵn, không rìa	+	Hình cầu	-
3	Phổ Yên	LAB-PY-1	Hình tròn, trắng sữa, lồi, trơn bóng, không rìa	+	Hình que	-
4	Sông Công	LAB-TNSC-29	Hình tròn, trắng ngà, lồi, trơn bóng, không rìa	+	Hình que	-
5	Đồng Hỷ	LAB-DH-3	Hình tròn, trắng ngà, lồi, trơn bóng, không rìa	+	Hình que	-

Kết quả bảng 1 cho thấy, việc phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng sinh acid hữu cơ từ sữa lên men tự nhiên đạt hiệu quả cao. Trong nghiên cứu này, từ các mẫu sữa khác nhau đã phân lập được những chủng có đặc điểm khuẩn lạc khác nhau, nhưng chúng đều có dạng hình tròn và không tạo rìa. 3/5 chủng có màu trắng sữa, 2/5 chủng màu trắng ngà; 3/5 chủng khuẩn lạc lồi và trơn bóng, trong khi đó 2/5 chủng khuẩn lạc dạng dẹt và nhẵn. Cả 5 chủng đều là vi khuẩn Gram dương, không có hoạt tính sinh catalase, tế bào có 2 dạng là hình cầu và hình que. Theo H.T.A. Phuong và cs (2024) [12], những chủng Gram dương, phân giải CaCO₃, không có hoạt tính catalase có thể là vi khuẩn lactic, nên 5 chủng vi khuẩn mới phân lập được đều phù hợp với nhận định này và chúng sẽ được sử dụng để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



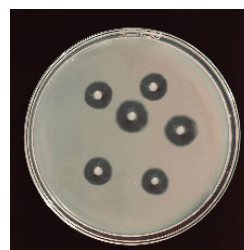
LAB-PL-23



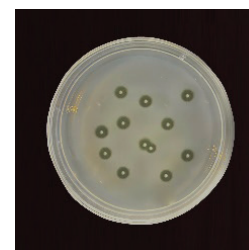
LAB-DT-9



LAB-PY-1



LAB-TNSC-29



LAB-DH-3

Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của 5 chủng vi khuẩn LAB mới phân lập.

3.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh lactic mạnh từ nguồn đã phân lập

3.2.1. Hoạt tính sinh lactic acid của các chủng vi khuẩn phân lập

Chỉ tiêu được lựa chọn làm yếu tố cơ bản để tuyển chọn vi khuẩn trong nghiên cứu này là khả năng sinh lactic acid và độ chua tạo ra bởi chúng trong dịch nuôi cấy. Kết quả được thể hiện tại bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh lactic acid và tạo độ chua của các chủng mới phân lập (n=3).

Ký hiệu chủng	Chỉ tiêu đánh giá	
	Độ chua Therner (°T)	% lactic acid (mg/100 ml)
LAB-PL-23	215,35 ^b ±0,377	2,72 ^a ±0,231
LAB-DT-9	204,43 ^c ±0,411	2,44 ^{ab} ±0,262
LAB-PY-1	165,65 ^e ±0,377	1,45 ^c ±0,278
LAB-TNSC-29	223,36 ^a ±0,053	2,96 ^a ±0,295
LAB-DH-3	181,69 ^d ±0,115	1,69 ^{bc} ±0,344

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức khảo sát ở mức ý nghĩa 5% (p<0,05).

Kết quả bảng 2 cho thấy, cả 5 chủng đều có khả năng tạo lactic acid. Trong đó, chủng LAB-PY-1 thấp nhất (1,45 mg/100 ml), mức trung bình là chủng LAB-DH-3 (1,69 mg/100 ml), 3 chủng còn lại (LAB-PL-23, LAB-DT-9 và LAB-TNSC-29) có khả năng tạo lactic acid cao tương đương nhau ở mức sai khác không có ý nghĩa thống kê, lần lượt đạt 2,72; 2,44 và 2,96 mg/100 ml. Tuy nhiên, độ chua mà các chủng tạo ra trong dịch lên men đều khác biệt và sai khác về ý nghĩa thống kê, LAB-PY-1 là chủng có khả năng tạo độ chua thấp nhất (165,65°T) và LAB-TNSC-29 là chủng tạo độ chua trong dịch nuôi cấy cao nhất (đạt 223,36°T).

3.2.2. Ảnh hưởng của pH thấp đến khả năng sinh trưởng của các chủng mới phân lập

Khả năng chịu pH thấp của vi khuẩn với định hướng sử dụng chúng làm probiotic là chỉ tiêu quan trọng, theo X. Zhou và cs (2007) [24] giá trị pH trong khoảng 2-3 được xem là ngưỡng quyết định trong quá trình sàng lọc các chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotic. Kết quả thử nghiệm với 5 chủng mới phân lập được cho thấy, 5/5 chủng chịu được pH 3,0 và 3/5 chủng có khả năng sống sót trong môi trường pH 2,5 sau 24 giờ, chi tiết kết quả được thể hiện tại bảng 3.

Bảng 3. Khả năng chịu pH thấp của các chủng vi khuẩn mới phân lập.

Ký hiệu chủng	Chỉ tiêu đánh giá	
	Mật độ vi khuẩn sống sót ở pH 3,0 sau 24 giờ (log CFU/ml)	Mật độ vi khuẩn sống sót ở pH 2,5 sau 24 giờ (log CFU/ml)
LAB-PL-23	6,42 ^{ab} ±0,159	2,91 ^b ±0,115
LAB-DT-9	6,12 ^b ±0,131	2,38 ^c ±0,171
LAB-PY-1	3,38 ^d ±0,171	-
LAB-TNSC-29	6,59 ^a ±0,185	3,23 ^a ±0,147
LAB-DH-3	4,24 ^c ±0,164	-

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức khảo sát ở mức ý nghĩa 5% (p<0,05).

Ở pH 3,0 chủng có khả năng sống sót thấp nhất là LAB-PY-1 (3,38 log CFU/ml), cao nhất là 2 chủng LAB-PL-23 và LAB-TNSC-29 (6,42 và 6,59 log CFU/ml) ở mức không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05). Ở pH 2,5 chỉ có các chủng LAB-PL-23, LAB-DT-9 và LAB-TNSC-29 sống sót sau 24 giờ. Trong đó mật độ tế bào lớn nhất là chủng LAB-TNSC-29 (3,23 log CFU/ml) và thấp nhất là chủng LAB-DT-9 (2,38 log CFU/ml). Kết quả này cho thấy, cả 5 chủng phân lập được đều có thời gian sống sót cao hơn so với công bố của P. Shokryazdan và cs (2014) [10] khi phân lập được 9 chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* từ sữa mẹ, phân trẻ sơ sinh và thực phẩm lên men, tất cả đều có khả năng chịu pH 3,0 trong 3 giờ. Bên cạnh đó, nghiên cứu của N.P. Hien và cs (2014) [25] cho thấy, 6/7 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được phân lập từ sữa dê và chế phẩm sinh học cũng có khả năng chống chịu với môi trường pH 3,0 trong 3 giờ. Công bố của H.N.T. Tam và cs (2019) [15] cho thấy 7 chủng vi khuẩn LAB phân lập từ cây môn ngọt có khả năng sống sót trong môi trường pH 2,5 trong vòng 24 giờ. Như vậy, từ kết quả thử nghiệm hai chỉ tiêu quan trọng đối với chủng tiềm năng làm probiotic là pH thấp và khả năng sinh lactic acid như đã được trình bày ở trên, chủng LAB-TNSC-29 được tuyển chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của chủng tuyển chọn

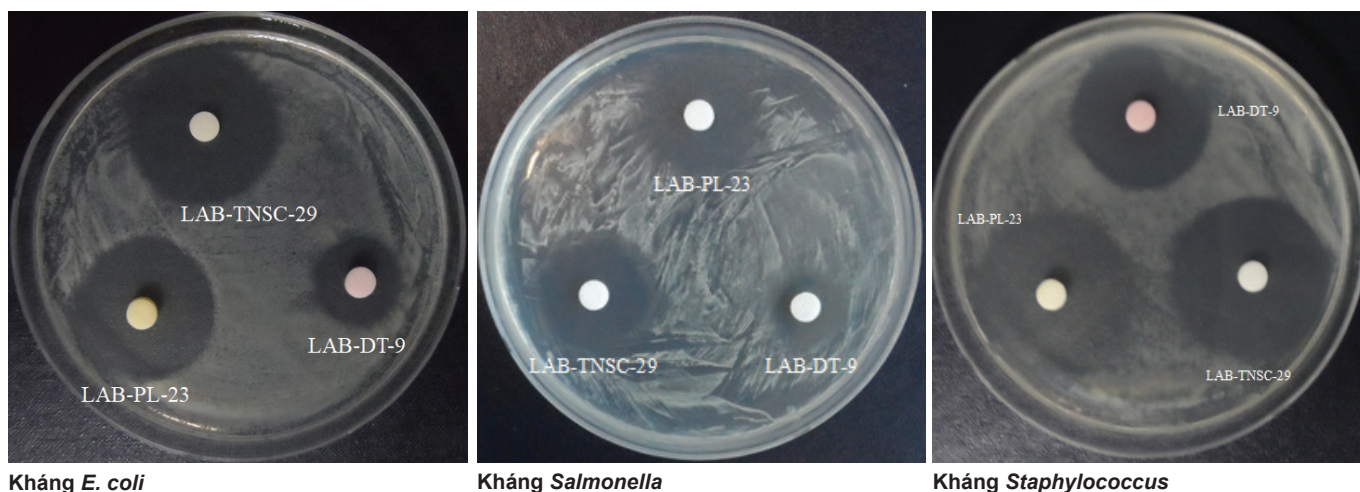
LAB có khả năng hạn chế sự phát triển của nhiều vi sinh vật khác, bao gồm cả các vi khuẩn gây bệnh, thông qua việc sản sinh các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn như acid hữu cơ, diacetyl và bacteriocin [5]. Các chất bảo quản nguồn gốc tự nhiên và có hoạt tính kháng khuẩn sinh học đang rất được quan tâm để thay thế phương pháp bảo quản bằng chất hóa học nhằm bảo vệ sức khỏe con người [26]. Kết quả khảo sát khả năng kháng các

vi khuẩn kiểm định (*E. coli* ATCC 10798, *S. gallinarum* ATCC 49573, *S. aureus* ATCC 6538) của dịch nuôi chủng LAB-TNSC-29 được thể hiện ở bảng 4 và hình 2.

Bảng 4. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy chủng LAB-TNSC-29 (n=3).

Chủng vi khuẩn kiểm định	Hoạt tính kháng khuẩn (D-d, cm)
<i>E. coli</i>	2,52 ^a ±0,08
<i>S. gallinarum</i>	1,63 ^b ±0,12
<i>S. aureus</i>	2,47 ^a ±0,07

hóa [27]. Thông qua cơ chế bám dính, các chủng LAB có thể hình thành một hàng rào sinh học, từ đó hạn chế sự xâm nhập và phát triển của vi sinh vật gây bệnh [6]. Việc bám dính trực tiếp với các vi sinh vật gây bệnh còn giúp các chủng LAB tạo ra các hợp chất kháng khuẩn ở khoảng cách gần, góp phần ức chế sự sinh trưởng của các tác nhân gây bệnh trong hệ tiêu hóa [28]. Kết quả đánh giá khả năng đồng bám dính giữa chủng LAB-TNSC-29 được tuyển chọn và chủng vi khuẩn kiểm định *E. coli* được trình bày trong hình 3.



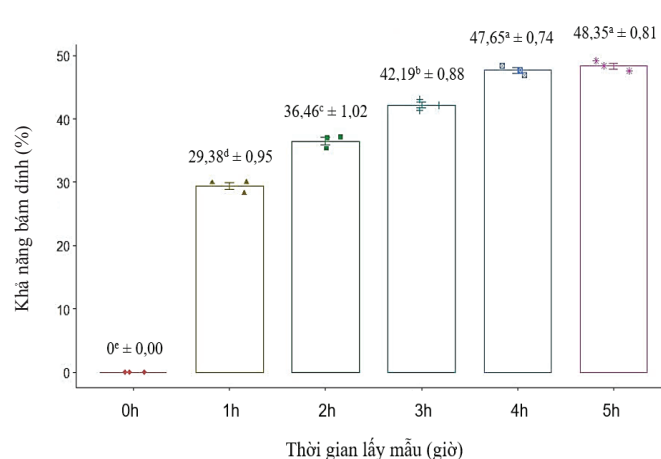
Hình 2. Hoạt tính ức chế vi khuẩn kiểm định của chủng LAB-TNSC-29.

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả trình bày tại bảng 4 và hình 2 cho thấy, LAB-TNSC-29 có khả năng ức chế cả ba chủng vi khuẩn kiểm định, trong đó vòng kháng *S. gallinarum* thấp nhất (1,63 cm), vòng kháng *E. coli* và *S. aureus* tương đương nhau ở mức sai khác không có ý nghĩa thống kê. Vòng kháng vi khuẩn kiểm định của chủng LAB-TNSC-29 trong nghiên cứu này cao gấp 1,7 đến 2,0 lần so với chủng LAB1 và LAB2 được công bố bởi V.N. Chi và cs (2021) [26]. Riêng với khả năng kháng *E. coli*, chủng LAB-TNSC-29 thể hiện vòng ức chế cao hơn 4,0-10,0 lần so với các chủng *Lactobacillus* được phân lập bởi H.N.T. Tam và cs (2019) [15], tương đương với chủng ND5 được N.T.M. Hang và cs (2013) [17] tuyển chọn từ 7 chủng vi khuẩn sinh lactic acid.

3.4. Khả năng đồng bám dính của vi khuẩn tuyển chọn

Khả năng đồng bám dính có ý nghĩa quan trọng trong việc loại bỏ vi sinh vật gây bệnh khỏi đường tiêu

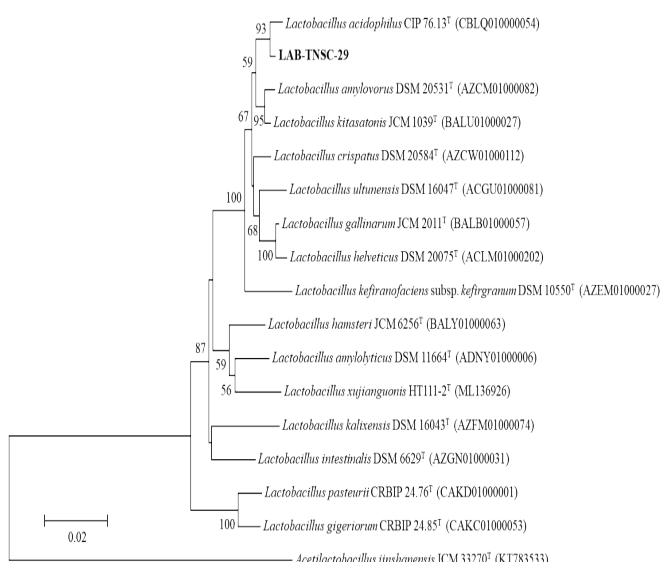


Hình 3. Khả năng đồng bám dính của LAB-TNSC-29 với *E. coli* (Mean±SD, n=3).

Kết quả tại hình 3 cho thấy, khả năng đồng bám dính của chủng LAB-TNSC-29 với *E. coli* đạt giá trị cao nhất sau 4-5 giờ nuôi cấy (47,65-48,35%). Kết quả này cao gấp 1,5 lần so với công bố của Y. Tuo và cs (2013) [29] khi nghiên cứu khả năng đồng bám dính của 22 chủng *Lactobacillus* với *E. coli* O157, dao động từ 21,36 đến 32,16%.

Bảng 5. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng LAB-TNSC-29 với các loài gần nhất của chi *Lactobacillus*.

Loài gần nhất	Tổng điểm	Sự tương đồng (%)	Số nucleotide sai khác	Độ che phủ (%)	Nguồn tham khảo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CIP 76.13 ^T (CBLQ010000054)	2689	99,39	9/1483	100,0	[30]
<i>Lactobacillus kitasatonis</i> JCM 1039 ^T (BALU01000027)	2671	99,26	11/1482	100,0	[31]
<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T (AZCM01000082)	2651	98,92	16/1483	100,0	[32]
<i>Lactobacillus crispatus</i> DSM 20584 ^T (AZCW01000112)	2617	98,52	22/1483	100,0	[33]
<i>Lactobacillus gallinarum</i> JCM 2011 ^T (BALB01000057)	2593	98,38	24/1481	100,0	[34]
<i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 20075 ^T (ACLM01000202)	2595	98,25	26/1483	100,0	[35]
<i>Lactobacillus ultunensis</i> DSM 16047 ^T (ACGU01000081)	2567	97,91	31/1483	100,0	[36]
<i>Lactobacillus kefirifaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> DSM 10550 ^T (AZEM01000027)	2518	97,30	40/1483	100,0	[37]
<i>Lactobacillus hamsteri</i> JCM 6256 ^T (BALY01000063)	2488	96,96	45/1481	100,0	[38]
<i>Lactobacillus amyolyticus</i> DSM 11664 ^T (ADNY01000006)	2495	96,70	49/1483	100,0	[39]
<i>Lactobacillus intestinalis</i> DSM 6629 ^T (AZGN01000031)	2466	96,49	52/1483	100,0	[40]
<i>Lactobacillus xujianguonis</i> HT111-2 ^T (ML136926)	2440	96,02	59/1483	100,0	[41]
<i>Lactobacillus kalixensis</i> DSM 16043 ^T (AZFM01000074)	2412	95,62	65/1483	100,0	[36]
<i>Lactobacillus pasteurii</i> CRBIP 24.76 ^T (CAKD01000001)	2351	95,21	71/1482	100,0	[42]
<i>Lactobacillus gigeriorum</i> CRBIP 24.85 ^T (CAKC01000053)	2326	95,04	71/1432	98,6	[43]



Hình 4. Cây phân loại của chủng LAB-TNSC-29.

3.5. Nhận diện vi khuẩn tuyến chọn bằng sinh học phân tử

Thông qua so sánh với dữ liệu EzBioCloud, trình tự gen 16S rRNA của LAB-TNSC-29 có kích thước 1483 bp bộc lộ sự tương đồng 99,39% (trong đó có 9 nucleotide sai khác) với *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T (CBLQ010000054), 99,26% (11 nucleotide sai khác) với *Lactobacillus kitasatonis* JCM 1039^T (BALU01000027), 98,92% (16 nucleotide sai khác) với *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T (AZCM01000082), và

95,04-98,52% với các loài chuẩn khác thuộc chi *Lactobacillus* (bảng 5). Sự tương đồng cao nhất của chủng LAB-TNSC-29 với *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T là 99,39%, giá trị này cao hơn 98,7% (ngưỡng chặn) về loài đã được công bố bởi H.P. Browne và cs (2016) [22].

Vị trí phân loại của chủng LAB-TNSC-29 với các loài gần nhất cũng được xác định thông qua sơ đồ tiến hóa (hình 4), cho thấy chủng LAB-TNSC-29 cùng nhánh với loài *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T (CBLQ010000054) với độ tin cậy về giá trị tần số xuất hiện (bootstrap) 93%. Đồng thời, chủng LAB-TNSC-29 sắp xếp thuộc chi *Lactobacillus*, khác biệt hoàn toàn với loài chủng đối chứng (ngoài chi *Lactobacillus*) - *Acetilactobacillus jinshanensis* JCM 33270^T (KT783533). Từ dữ liệu so sánh, phân tích trình tự gen 16S rRNA (bảng 5) và sơ đồ tiến hóa (hình 4), chủng LAB-TNSC-29 được xác định là thành viên của chi *Lactobacillus*, với tên gọi là *Lactobacillus acidophilus* LAB-TNSC-29.

4. Kết luận

Từ 5 mẫu sữa bò lên men tự nhiên, 5 chủng LAB đã được phân lập, trong đó chủng LAB-TNSC-29 thể hiện khả năng sinh lactic acid cao (2,96 mg/100 ml), sống sót tốt trong điều kiện pH thấp (pH 2,5). Bên cạnh đó, chủng LAB-TNSC-29 còn thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh, bám dính tương đối cao trong điều kiện khảo sát. Dựa trên phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng LAB-TNSC-29 có mức độ tương đồng 99,39% so với *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13^T (CBLQ010000054).

Do đó, chủng LAB-TNSC-29 được định danh với danh pháp khoa học là *Lactobacillus acidophilus* LAB-TNSC-29. Những kết quả bước đầu đạt được trong nghiên cứu này cho thấy, *Lactobacillus acidophilus* LAB-TNSC-29 là ứng viên tiềm năng cho phát triển các sản phẩm probiotic trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở mã số T2026-24.GV. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.V. Chi, L.T. Ninh, N.D. Tuan, et al. (2024), *Instructional Textbook: Food Microbiological Control*, Polytechnic Publishing House, 165pp (in Vietnamese).
- [2] P. Powthong, P. Suntornthi (2015), "Isolation, identification and analysis of probiotic properties of lactic acid bacteria from selective various traditional Thai fermented food and kefir", *Pakistan Journal of Nutrition*, **14**(2), pp.67-74, DOI: 10.3923/pjn.2015.67.74.
- [3] N.D. Luong (2006), *Industrial Microorganisms*, Vietnam National University - Ho Chi Minh City Publishing House, **2**, 371pp (in Vietnamese).
- [4] M.D. Linh, D.M. Phuong, P.T. Tuyet, et al. (2008), "Biological characteristics of lactic acid bacterial strains isolated in Hanoi", *Journal of Science, Vietnam National University-Hanoi*, **24**, pp.221-226 (in Vietnamese).
- [5] K. Pilasombut, K. Rumjuankiat, N. Ngamyeesoon, et al. (2015), "In vitro characterisation of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from Nem Chua, a traditional Vietnamese fermented pork", *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **35**(4), pp.473-478, DOI: 10.5851/kosfa.2015.35.4.473.
- [6] C.L. Ferreira, L. Grześkowiak, M.C. Collado, et al. (2011), "In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens", *Journal of Food Protection*, **74**(9), pp.1482-1487, DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-074.
- [7] T.V. Chi, L.H. Son, P.T.T. Mai, et al. (2022), "Study on isolation and selection of heat-resistant lactic bacteria from the natural fermented resources", *TNU Journal of Science and Technology*, **227**(10), pp.268-275, DOI: 10.34238/tnu-jst.6160.
- [8] S.J. Allen, E.G. Martinez, G.V. Gregorio, et al. (2011), "Probiotics for treating acute infectious diarrhoea", *Sao Paulo Medical Journal*, **129**(3), DOI: 10.1590/S1516-31802011000300012.
- [9] R. Fuller (1997), *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects*, Springer, 221pp.
- [10] P. Shokryazdan, C.C. Sieo, R. Kalavathy, et al. (2014), "Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains", *BioMed. Res. Int.*, **2014**, DOI: 10.1155/2014/927268.
- [11] H.Q. Khanh, P.T.L. Thanh (2011), "Isolation, identification, and characterization of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from humans", *VNUHCM Journal of Science and Technology Development*, **14**(6), pp.62-76 (in Vietnamese).
- [12] H.T.A. Phuong, P.V. Hai, L.T.K. Giang, et al. (2024), "Isolation and selection of potential *Lactobacillus* probiotic strains against Gram-negative bacteria causing diarrhea in chickens", *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, **133**(3C), pp.117-134, DOI: 10.26459/hueunijard.v133i3C.7611 (in Vietnamese).
- [13] M. Zareian, A. Ebrahimpour, A.B. Fatimah, et al. (2012), "A glutamic acid-producing lactic acid bacteria isolated from Malaysian fermented foods", *International Journal of Molecular Sciences*, **13**(5), pp.5482-5497, DOI: 10.3390/ijms13055482.
- [14] T.L. Thuoc (2007), *Microbiological Analysis of Water, Food, and Cosmetics*, Education Publishing House, 233pp (in Vietnamese).
- [15] H.N.T. Tam, N.L.H. Diep, P.T.T. Suong (2019), "Isolation and selection of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from sweet taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott)", *Can Tho University Journal of Science*, **55**(1B), pp.15-23, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2019.017 (in Vietnamese).
- [16] H.J. Hoben, P. Somasegaran (1982), "Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat", *Applied and Environmental Microbiology*, **44**(5), pp.1246-1247, DOI: 10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982.
- [17] N.T.M. Hang, N.M. Thu (2013), "Isolation and selection of amylase and bacteriocin - producing lactic acid bacteria", *Journal of Forestry Science and Technology*, **3**(1), pp.3-10 (in Vietnamese).
- [18] V.D. Valeriano, M.M. Parungao-Balolong, D.K. Kang (2014), "In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1", *Journal of Applied Microbiology*, **117**(2), pp.485-497, DOI: 10.1111/jam.12539.
- [19] J. Sambrook, D.W. Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 170pp.
- [20] A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer (2013), "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies", *Nucleic Acids Res.*, **41**(1), pp.1-11, DOI: 10.1093/nar/gks808.
- [21] J. Chun, J.H. Lee, Y. Jung, et al. (2007), "EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**(10), pp.2259-2261, DOI: 10.1099/ijms.0.64915-0.

- [22] H.P. Browne, S.C. Forster, B.O. Anonye (2016), "Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation", *Nature*, **533(7604)**, pp.543-546, DOI: 10.1038/nature17645.
- [23] S. Kumar, G. Stecher, M. Suleski, et al. (2024), "MEGA12: Molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing", *Molecular Biology and Evolution*, **41(12)**, DOI: 10.1093/molbev/msae263.
- [24] X. Zhou, Y. Pan, Y. Wang, et al. (2007), "In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*", *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **8(9)**, pp.686-692, DOI: 10.1631/jzus.2007.B0686.
- [25] N.P. Hien, L.D. Thuy, T.T. My, et al. (2014), "Investigation of low-pH tolerance and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from goat milk and probiotic preparations", *Can Tho University Journal of Science*, **34**, pp.8-17 (in Vietnamese).
- [26] V.N. Chi, N.T. Phuong, N.T.A. Tuyet, et al. (2021), "Evaluation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria strains isolated from nem chua Thu Duc", *The Journal of Agriculture and Development*, **20(2)**, pp.62-68 (in Vietnamese).
- [27] S.D. Todorov, M. Botes, C. Guigas, et al. (2008), "Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria", *Journal of App. Microbiology*, **104(2)**, pp.465-477, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03558.x.
- [28] T.T.P. Thao, L.T.K. Thoa, B.T. Khuyen, et al. (2022), "Antimicrobial activity against *Vibrio* spp. and probiotic potential of *Lactobacillus farciminis* HN12", *Hue University Journal of Science*, **131(2A)**, pp.89-102, DOI: 10.26459/hueunijtt.v131i2A.6779.
- [29] Y. Tuo, H. Yu, L. Ai, et al. (2013), "Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains", *Journal of Dairy Sci.*, **96(7)**, pp.4252-4257, DOI: 10.3168/jds.2013-6547.
- [30] P.A. Hansen, G. Mocquot (1970), "*Lactobacillus acidophilus* (Moro) comb. nov.", *International Journal of Systematic Bacteriology*, **20(3)**, pp.325-327, DOI: 10.1099/00207713-20-3-325.
- [31] T. Mukai, K. Arihara, A. Ikeda, et al. (2003), "*Lactobacillus kitasatonis* sp. nov., from chicken intestine", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, pp.2055-2059, DOI: 10.1099/ijms.0.02815-0.
- [32] L.K. Nakamura (1981), "*Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31(1)**, pp.56-63, DOI: 10.1099/00207713-31-1-56.
- [33] E.P. Cato, W. Moore, J.L. Johnson (1983), "Synonymy of strains of '*Lactobacillus acidophilus*' group A2 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus crispatus* (Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33(2)**, pp.426-428, DOI: 10.1099/00207713-33-2-426.
- [34] T. Fujisawa, Y. Benno, T. Yaeshima, et al. (1992), "Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981)", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42(3)**, pp.487-491, DOI: 10.1099/00207713-42-3-487.
- [35] S.M. Naser, K.E. Hagen, M. Vancanneyt, et al. (2006), "*Lactobacillus suntoryeus* Cachat and Priest 2005 is a later synonym of *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1925 (Approved Lists 1980)", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, pp.355-360, DOI: 10.1099/ijms.0.64001-0.
- [36] S. Roos, L. Engstrand, H. Jonsson (2005), "*Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, pp.77-82, DOI: 10.1099/ijms.0.63083-0.
- [37] M. Vancanneyt, J. Mengaud, I. Cleenwerck, et al. (2004), "Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa et al. 1994 as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa et al. 1988", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, pp.551-556, DOI: 10.1099/ijms.0.02912-0.
- [38] T. Mitsuoka, T. Fujisawa (1987), "*Lactobacillus hamsteri*, a new species from the intestine of hamsters", *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **63**, pp.269-272, DOI: 10.2183/pjab.63.269.
- [39] I. Bohak, W. Back, L. Richter, et al. (1998), "*Lactobacillus amyolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort", *Syst. Appl. Microbiol.*, **21(3)**, pp.360-364, DOI: 10.1016/S0723-2020(98)80045-3.
- [40] T. Fujisawa, K. Itoh, Y. Benno, et al. (1990), "*Lactobacillus intestinalis* (ex Hemme 1974) sp. nov., nom. rev., isolated from the intestines of mice and rats", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40(3)**, pp.302-304, DOI: 10.1099/00207713-40-3-302.
- [41] J. Meng, D. Jin, J. Yang, et al. (2020), "*Lactobacillus xujianguonis* sp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70(1)**, pp.11-15, DOI: 10.1099/ijsem.0.003598.
- [42] S. Cousin, L. Motreff, M.L. Gulat-Okalla, et al. (2013), "*Lactobacillus pasteurii* sp. nov. and *Lactobacillus hominis* sp. nov.", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, pp.53-59, DOI: 10.1099/ijms.0.036665-0.
- [43] S. Cousin, M. L. Gulat-Okalla, L. Motreff, et al. (2012), "*Lactobacillus gigeriorum* sp. nov., isolated from chicken crop", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, pp.330-334, DOI: 10.1099/ijms.0.028217-0.