

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ACETIC VÀ LACTIC TRONG TRÀ KOMBUCHA

ISOLATING AND SELECTING ACETIC AND LACTIC ACID BACTERIA FROM KOMBUCHA

NGUYỄN TRẦN TUẤN KIẾT, NGUYỄN TRÍ YẾN CHI^a, TRẦN QUANG NHỎ
Khoa Khoa Học Sinh Học Ứng Dụng, Trường Đại Học Sư Phạm Kỹ Thuật Vĩnh Long
^aTác giả liên hệ: chinty@vlute.edu.vn

Phản biện (Reviewed): 25/11/2025; Chấp nhận (Accepted): 24/12/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích phân lập và xác định khả năng sinh acid của một số chủng vi khuẩn acetic và lactic có trong Kombucha, từ đó chọn lọc chủng vi khuẩn thích hợp cho lên men Kombucha. Từ 5 mẫu trà Kombucha đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn trên môi trường YPGD và 7 chủng vi khuẩn trên môi trường MRS. Kết quả kiểm tra đặc điểm hình thái và sinh hóa cho thấy 11 chủng vi khuẩn phân lập trên YPGD có sự tương đồng với vi khuẩn acetic, trong đó chủng A2-5 có khả năng sinh acid cao nhất ở 24, 30 và 36 giờ nuôi cấy. Bảy chủng vi khuẩn phân lập trên MRS có đặc điểm khác với các loài vi khuẩn lactic có lợi. Kết quả giải trình tự và kiểm tra độ tương đồng vùng gen 16S rRNA của chủng A2-5 cho thấy mức tương đồng 100% với chủng vi khuẩn acetic *Komagataeibacter saccharivorans*.

Từ khóa: *Kombucha, vi khuẩn acetic, vi khuẩn lactic*

ABSTRACT

*This study aimed to isolate and evaluate the acid-producing abilities of acetic and lactic acid bacteria strains from Kombucha for selecting strains suitable for fermentation. From 5 Kombucha samples, 22 strains were isolated on the YPGD medium and 7 strains on the MRS medium. Morphological and biochemical analysis indicated that 11 YPGD-isolated strains were similar to acetic acid bacteria, with strain A2-5 showing the highest acid production at 24, 30, and 36 hours. The strains isolated on the MRS medium displayed characteristics that differed from beneficial lactic acid bacteria. 16S rRNA gene sequence analysis showed that strain A2-5 is 100% identical to the acetic acid bacterium *Komagataeibacter saccharivorans*.*

Keywords: *Acetic acid bacteria, lactic acid bacteria, Kombucha*

1. GIỚI THIỆU

Kombucha là một loại đồ uống lên men được làm từ nước trà và đường, đã được sử dụng hàng thế kỷ ở nhiều nước trên thế giới như một loại đồ uống bổ dưỡng. Trong những năm gần đây, Kombucha ngày càng được chú ý nhờ có nhiều tác dụng có lợi

cho sức khỏe như kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống ung thư, chống tiểu đường, điều trị loét dạ dày và cholesterol cao [1]. Quá trình lên men trà Kombucha được coi là một quá trình lên men tự nhiên và có thể thực hiện bằng cách sử dụng một lượng nhất định của mẻ ủ Kombucha trước đó

để lên men. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy nhóm vi sinh vật quan trọng nhất trong lên men Kombucha là vi khuẩn acetic và nấm men, ngoài ra còn có một số loại vi khuẩn lactic cũng tham gia vào quá trình lên men [1, 2].

Hiện nay, trà Kombucha thường được lên men thủ công theo quy mô hộ gia đình, khó đảm bảo sự ổn định về chất lượng sản phẩm do nguồn giống không ổn định và nguy cơ tạp nhiễm các vi sinh vật có hại, tiềm ẩn nhiều rủi ro cho sức khỏe người dùng [3]. Việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần vi sinh vật trong trà Kombucha sẽ giúp chủ động lựa chọn các chủng vi sinh vật có lợi cho quá trình lên men, nâng cao chất lượng sản phẩm và tạo điều kiện thuận lợi cho việc sản xuất ở quy mô công nghiệp. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và xác định đặc tính của một số chủng vi khuẩn acetic và vi khuẩn lactic có trong trà Kombucha, từ đó chọn lựa chủng vi khuẩn thích hợp cho quá trình lên men trà Kombucha.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Năm mẫu trà Kombucha được mua trên sàn thương mại điện tử Shopee bao gồm Jun Kombucha, Elyo Kombucha, Nana Kombucha, Thêm Chút Ngò và Gianhangcuanhu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các chủng vi khuẩn có trong trà Kombucha

Các chủng vi khuẩn có trong trà Kombucha được phân lập bằng phương pháp cấy trải trên đĩa thạch có chứa môi trường YPGD (yeast extract 0,5%; glucose 0,5%; glycerol 0,5%; peptone 0,5%; ethanol 4%; agar 2%) để phân lập vi khuẩn acetic và môi trường MRS (yeast extract 0,5%; HM extract 1%; glucose 2%; peptone 1%; CH_3COONa 0,5%; $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$

0,2%; K_2HPO_4 0,01%; MgSO_4 0,005%; MnSO_4 0,02%; tween 80 0,1%; agar 2%) để phân lập vi khuẩn lactic [4]. Giồng trà được pha loãng đến 10^{-3} với nước cất vô trùng. Hút 100 μL dịch pha loãng cho vào đĩa thạch môi trường và dùng que cấy trải dàn đều dung dịch lên bề mặt môi trường và để khô tự nhiên, sau đó ủ các đĩa thạch ở 30°C trong 36 giờ và tiến hành quan sát các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch.

2.2.2. Khảo sát một số đặc tính hình thái và sinh hóa

Xác định khả năng phân giải CaCO_3

Sử dụng que cấy để lấy khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch phân lập và cấy chuyển trên đĩa thạch chứa môi trường YPGD hoặc MRS có bổ sung CaCO_3 0,5%, sau đó đem ủ ở 30°C trong 36 giờ để quan sát sự xuất hiện của vòng Halo. Các khuẩn lạc có vòng Halo được tiếp tục cấy chuyển nhiều lần đến khi khuẩn lạc đạt độ thuần nhất.

Quan sát hình thái khuẩn lạc

Các chủng vi khuẩn đã phân lập được cấy ria trên đĩa thạch chứa môi trường YPGD hoặc MRS và ủ ở 30°C trong 36 giờ và quan sát các đặc điểm hình thái bao gồm màu sắc, bề mặt, hình dạng của khuẩn lạc.

Quan sát hình thái tế bào trên bản nhuộm Gram

Nhuộm Gram được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit nhuộm Gram kèm theo hướng dẫn sử dụng đi kèm (công ty Nam Khoa, Việt Nam) nhằm xác định vi khuẩn Gram (-), vi khuẩn Gram (+) và quan sát hình thái tế bào vi khuẩn. Trong đó, vi khuẩn acetic là Gram (-), vi khuẩn lactic là Gram (+)

Xác định hoạt tính oxidase

Để xác định hoạt tính oxidase của các chủng phân lập, dùng que cấy lấy khuẩn lạc của vi khuẩn phết lên đĩa giấy sinh hóa oxidase thương mại (Công ty TNHH Dịch Vụ Thương Mại Nam Khoa) và để

yên trong 15 giây. Nếu vết phết khuẩn lạc chuyển sang màu tím thì cho kết quả dương tính, nếu vết phết khuẩn lạc không thấy xuất hiện màu tím thì cho kết quả âm tính.

Xác định hoạt tính catalase

Dùng que cấy lấy khuẩn lạc vi khuẩn phết lên mặt lam kính sau đó sử dụng thuốc thử H_2O_2 30% nhỏ lên bề mặt khuẩn lạc của vi khuẩn. Quan sát sự xuất hiện bọt khí bằng mắt thường. Nếu có xuất hiện bọt khí thì kết quả dương tính, ngược lại không có bọt khí là phản ứng catalase âm tính.

2.2.3. Khảo sát khả năng lên men acid

Các chủng vi khuẩn phân lập được tăng sinh trong môi trường YPGD lỏng, nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Sử dụng phương pháp đo độ đục trên máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 600nm để xác định mật độ vi khuẩn trong dịch tăng sinh nhằm đạt mật độ 10^8 tế bào/mL. Sau đó, dịch tăng sinh vi khuẩn được cấy vào môi trường lỏng với tỷ lệ giống 10% (v/v). Tiến hành nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút và đo lượng acid sinh ra ở các thời điểm 24, 30 và 36 giờ.

Lượng acid sinh ra trong dịch nuôi cấy được xác định theo phương pháp chuẩn độ Therner [5]. Dịch nuôi cấy được đem đi ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 5 phút sau đó thu phần dịch nổi. Lấy 10mL dịch nuôi cấy đã ly tâm cho vào ống nghiệm, thêm vào 20mL nước cất và 1-2 giọt phenolphthalein (nồng độ 1% trong cồn 90°). Chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Ghi nhận thể tích NaOH đã dùng để chuẩn độ.

Công thức tính độ acid:

$$m = k \times 1000 \times v$$

Trong đó: k: Số gram acid /mL NaOH ($k_{\text{acetic}} = 0,006$; $k_{\text{lactic}} = 0,009$)

m: Hàm lượng acid (mg/mL)

V: Thể tích NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ (mL)

2.2.4. Định danh chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn có khả năng sinh acid cao được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử thông qua kỹ thuật khuếch đại và giải trình tự gen 16S rRNA.

Ly trích DNA vi khuẩn: Chủng vi khuẩn được nuôi lắc trong môi trường lỏng với tốc độ 100 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng trong 36 giờ. Sau đó, tiến hành ly trích DNA vi khuẩn theo phương pháp của Trần Nhân Dũng (2011) có hiệu chỉnh [6]. Hút 2mL dịch tăng sinh vi khuẩn cho vào ống Eppendorf 2,2mL và ly tâm 13000 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Loại bỏ phần dịch nổi, cho vào 200 μ L dung dịch lysis buffer (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5mM, NaCl 5M, SDS 0,1%, pH = 8,0) và 1 viên bi sắt vào ống sau đó lắc mạnh bằng máy lắc. Tiếp tục cho vào ống eppendorf thêm 800 μ L lysis buffer, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong thời gian 5 phút, lấy khoảng 700 μ L dung dịch chuyển sang ống eppendorf mới. Cho lượng tương đương ethanol 95% và ly tâm 13000 vòng/phút trong thời gian 5 phút, bỏ phần dịch nổi và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Rửa kết tủa bằng 500 μ L ethanol 70%, ly tâm 13000 vòng/phút trong thời gian 5 phút, bỏ phần dịch nổi. Sấy khô trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Hòa tan DNA trong 100 μ L BiH_2O (nước cất 2 lần). DNA vi khuẩn sau khi trích xong sẽ được đo Optical Density (OD) ở bước sóng 260 và 280nm để xác định độ tinh khiết và nồng độ của DNA ly trích.

DNA sau khi ly trích được khuếch đại vùng 16S rRNA thông qua phản ứng PCR bởi cặp mồi 27F và 1492R theo Baker và cộng sự (2003) [7]. Trình tự mồi xuôi là 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'. Trình tự mồi ngược 1492R là: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'. Thành phần của một phản ứng PCR với

tổng thể tích 20 μ L như sau: 10 μ L Mytaq Mix, 0,25 μ L mỗi xuôi (10 μ M), 0,25 μ L mỗi ngược (10 μ M), 7,5 μ L BiH₂O và 2 μ L DNA tinh sạch. Phản ứng PCR gồm 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính như sau: bước 1 là giai đoạn biến tính (nhiệt độ 95°C trong thời gian 40 giây); bước 2 là giai đoạn gắn mồi (nhiệt độ 55°C trong thời gian 30 giây); bước 3 là giai đoạn kéo dài (nhiệt độ 72°C trong thời gian 45 giây), sau đó là giai đoạn nhiệt độ 72°C được thực hiện trong 10 phút. Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5%; chụp hình bằng máy chụp hình gel Analytik-Jena và được gửi giải trình tự ở công ty Macrogen (Hàn Quốc). Sau đó trình tự được kiểm tra độ tương đồng bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen NCBI để xác định loài vi khuẩn.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Bảng 1. Một số đặc điểm hình thái và sinh hóa của vi khuẩn phân lập trên YPGD

| Nguồn phân lập | Ký hiệu | Hình thái khuẩn lạc | Đặc điểm tế bào | Vòng Halo | Gram | Oxidase | Catalase |
|----------------|---------|--|--|-----------|------|---------|----------|
| Jun Kombucha | A1-1 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| | A1-3 | Tròn, căng bóng, màu sữa nhạt | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| | A1-5 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục, kích thước nhỏ | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| Elyo Kombucha | A2-1 | Tròn, căng bóng, màu vàng đục | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| | A2-2 | Tròn, căng bóng, màu vàng nhạt | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| | A2-4 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục, kích thước nhỏ | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| | A2-5 | Tròn, căng bóng màu, màu vàng nhạt | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| | A3-2 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục tâm hơi vàng | Hình bầu dục, 2 hoặc 3 tế bào nối với nhau | + | - | - | + |
| | A3-5 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục tâm hơi vàng | Hình bầu dục | + | - | - | + |

Tất cả thí nghiệm được thực hiện 3 lần để lấy số liệu phân tích thống kê. Các giá trị trung bình được xử lý trên phần mềm Excel, phân tích phương sai một nhân tố ANOVA và so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp LSD với mức ý nghĩa 5% trên phần mềm thống kê STATGRAPHICS Centurion XV, SPSS 20.

2.3. Kết quả và thảo luận

2.3.1. Kết quả phân lập và xác định một số đặc điểm hình thái và sinh hóa

Từ 5 mẫu giống trà Kombucha, đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn trên môi trường YPDA và 7 chủng vi khuẩn trên môi trường MRS. Trong đó, giống trà của Jun Kombucha không ghi nhận sự xuất hiện của vi khuẩn trên môi trường MRS, 4 giống trà còn lại đều có sự xuất hiện của vi khuẩn trên cả hai loại môi trường phân lập (Bảng 1, 2).

| | | | | | | | |
|------------------|------|--|--------------|---|---|---|---|
| Thêm Chút Ngò | A4-1 | Tròn, căng bóng, màu vàng nhạt | Hình bầu dục | + | - | - | + |
| | A4-3 | Tròn, căng bóng, màu vàng đục | Hình bầu dục | + | - | - | - |
| | A5-3 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục kích thước nhỏ | Hình bầu dục | + | - | - | + |

Ghi chú: (+) Dương tính, (-) Âm tính

Kết quả trên Bảng 1 cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường YPGD đều có khuẩn lạc hình tròn, căng bóng và tế bào hình bầu dục. Màu sắc của khuẩn lạc có ba màu chính là trắng đục, vàng nhạt, vàng đục và một vài chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng đục, tâm vàng. Các chủng phân lập này có đặc điểm hình thái tương tự với mô tả về vi khuẩn acetic trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Phương và cộng sự (2018) [4]. Tất cả 22 chủng phân lập trên môi trường YPGD đều có khả năng tạo vòng phân giải CaCO_3 , trong đó có 10 chủng là vi khuẩn Gram dương, 12 chủng là vi khuẩn Gram âm. Kết quả xác định hoạt tính oxidase và catalase cho thấy có 20 chủng âm tính với oxidase và 20 chủng cho kết quả dương tính với catalase. Hầu hết các vi khuẩn acetic ứng dụng trong công nghệ thực phẩm là vi khuẩn Gram âm, oxidase âm tính và catalase dương tính [8]. Do đó, trong 22 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường YPGD, 12 chủng có các đặc điểm hình thái và sinh hóa phù hợp với vi khuẩn acetic được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm

tiếp theo, bao gồm các chủng A1-1, A1-3, A1-5, A2-1, A2-2, A2-4, A2-5, A3-2, A3-5, A4-1, A4-3, A5-3.

Các chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường MRS đều có khuẩn lạc hình tròn, căng bóng, màu trắng đục hoặc vàng nhạt đến vàng đục, tế bào có dạng hình cầu hoặc bầu dục và tạo ra vòng Halo trên môi trường có bổ sung CaCO_3 . Trong 7 chủng vi khuẩn có 4 chủng Gram dương và 3 chủng Gram âm. Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường MRS đều có oxidase âm tính và catalase dương tính (Bảng 2). Phần lớn các chủng vi khuẩn lactic có lợi, sử dụng trong thực phẩm đều là vi khuẩn Gram dương, catalase âm tính [9]. Theo nghiên cứu của Kaban và Kaya (2008), trong 123 chủng vi khuẩn lactic phân lập có catalase dương tính có tới 122 chủng thuộc chi *Staphylococcus*, đây là chi vi khuẩn chứa nhiều loài có khả năng gây bệnh cho người và động vật [10, 11]. Vì vậy, các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường MRS trong nghiên cứu này không được chọn lựa để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Một số đặc điểm hình thái và sinh hóa của vi khuẩn phân lập trên MRS

| Nguồn phân lập | Kí hiệu | Mô tả khuẩn lạc | Đặc điểm tế bào | Vòng Halo | Gram | Oxidase | Catalase |
|----------------|---------|--------------------------------|-------------------------|-----------|------|---------|----------|
| Elyo Kombucha | L2-1 | Tròn, căng bóng, màu vàng đục | Hình cầu | + | - | - | + |
| Nana Kombucha | L3-1 | Tròn, căng bóng, màu vàng nhạt | Hình cầu, tạo thành cặp | + | + | - | + |
| | L3-2 | Tròn, nổi mô, màu vàng đục | Hình bầu dục | + | - | - | + |

| | | | | | | | |
|----------------|------|--|--------------|---|---|---|---|
| Thêm Chút Ngò | L4-1 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục | Hình cầu | + | - | - | + |
| | L4-2 | Tròn, căng bóng, màu vàng nhạt | Hình cầu | + | + | - | + |
| Gianhangcuanhu | L5-1 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục | Hình cầu | + | + | - | + |
| | L5-2 | Tròn, căng bóng, màu trắng đục, kích thước nhỏ | Hình bầu dục | + | + | - | + |

Ghi chú: (+) Dương tính, (-) Âm tính

2.3.2. Kết quả khảo sát khả năng sinh acid của các chủng vi khuẩn phân lập

Kết quả khảo sát khả năng sinh acid của vi khuẩn được trình bày trong Bảng 3. Nhìn chung, hàm lượng acid tăng lên khi kéo dài thời gian nuôi cấy. Ở thời điểm 24 giờ, 3 chủng vi khuẩn A1-3, A2-5 và A4-1 có hàm lượng acid trong dịch nuôi cấy cao nhất, đạt các giá trị lần lượt là 11,0; 11,4 và 11,4mg/mL. Hai chủng vi khuẩn A1-5 và A4-3 có hàm lượng acid sinh ra trong 24 giờ thấp nhất (7,2mg/mL). Sau 30 giờ nuôi cấy, các chủng A1-1, A2-2, A2-5 có

hàm lượng acid cao nhất, lần lượt là 11,6; 12,0 và 12,4mg/mL. Trong khi đó, chủng vi khuẩn cho hàm lượng acid thấp nhất là A4-3 (8,6mg/mL). Kết quả đo hàm lượng acid ở thời điểm 36 giờ cho thấy hai chủng A2-5 và A3-5 cho hàm lượng acid cao nhất, lần lượt là 13,0mg/mL và 12,8mg/mL; đồng thời chủng vi khuẩn A4-1 cho hàm lượng acid thấp nhất (10,0mg/mL). Như vậy, trong 12 chủng vi khuẩn phân lập, chủng A2-5 có hàm lượng acid sinh ra cao nhất ở cả 3 thời điểm 24, 30 và 36 giờ nuôi cấy nên được lựa chọn để tiến hành định danh vi sinh vật.

Bảng 3. Hàm lượng acid trong dịch nuôi cấy của các chủng vi khuẩn

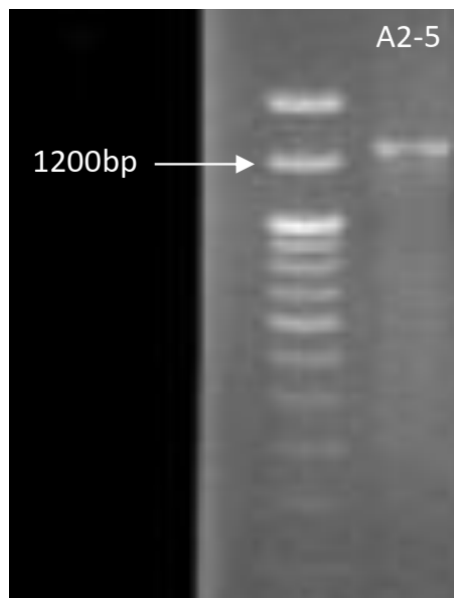
| Chủng vi khuẩn | Hàm lượng acid tính theo acid acetic (mg/mL) | | |
|----------------|--|----------------------------|----------------------------|
| | 24 giờ | 30 giờ | 36 giờ |
| A1-1 | 9,4 ^b ± 0,35 | 11,6 ^a ± 0,92 | 11,0 ^{bc} ± 0,69 |
| A1-3 | 11,0 ^a ± 0,35 | 10,6 ^{abc} ± 0,92 | 10,6 ^{bc} ± 0,35 |
| A1-5 | 7,2 ^c ± 0,6 | 9,8 ^{bc} ± 1,25 | 10,8 ^{bc} ± 0,6 |
| A2-1 | 8,6 ^{bc} ± 0,35 | 10,0 ^{bc} ± 0,35 | 11,4 ^{abc} ± 0,6 |
| A2-2 | 9,0 ^{bc} ± 0,6 | 12,0 ^a ± 2,16 | 12,2 ^{ab} ± 1,93 |
| A2-4 | 8,8 ^{bc} ± 0,35 | 10,2 ^{abc} ± 1,03 | 11,0 ^{bc} ± 0,35 |
| A2-5 | 11,4 ^a ± 0,6 | 12,4 ^a ± 0,92 | 12,8 ^a ± 0,92 |
| A3-5 | 8,4 ^{bc} ± 0,6 | 10,8 ^{abc} ± 1,2 | 13,0 ^a ± 1,25 |
| A4-1 | 11,4 ^a ± 0,6 | 10,2 ^{abc} ± 1,8 | 10,0 ^c ± 0,35 |
| A4-3 | 7,2 ^c ± 0,6 | 8,6 ^c ± 0,35 | 10,8 ^{bc} ± 0,6 |
| A5-3 | 8,6 ^{bc} ± 0,35 | 9,8 ^{bc} ± 0,35 | 11,6 ^{abc} ± 0,35 |

Ghi chú: Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê qua kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%

2.3.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn acetic A2-5 phân lập từ mẫu trà Kombucha của Elyo Kombucha được tiến hành ly trích để thu nhận DNA. Mẫu DNA vi khuẩn sau khi ly trích được khuếch đại vùng 16S rRNA thông qua phản ứng PCR. Kết quả cho thấy sản phẩm thu được có chất lượng tốt với một band rõ duy nhất và có kích thước khoảng 1200- 1300bp so với thang DNA chuẩn khi điện di trên gel

argarose 1,5% (Hình 1). Sau khi giải trình tự, vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn acetic được kiểm tra độ tương đồng bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen NCBI (Hình 2). Kết quả cho thấy trình tự vùng gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn A2-5 có mức tương đồng 100% với vi khuẩn *Komagataeibacter saccharivorans*, đây là loài vi khuẩn acetic chiếm ưu thế trong hệ cộng sinh vi sinh vật của Kombucha trong các nghiên cứu trước đây [12].



Hình 1. Sản phẩm PCR điện di trên gel argarose 1,5%

Descriptions | Graphic Summary

Sequences producing significant alignments | Download | Manage Columns | Show 100

select all | 0 sequences selected | GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

| Description | Scientific Name | Common Name | Taxid | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|--|-----------------|-------------|---------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|------------|
| <input type="checkbox"/> Komagataeibacter saccharivorans strain JH1 chromosome, complete genome | Komaga...NA | | 265959 | 1424 | 7124 | 100% | 0.0 | 100.00% | 3105849 | CP036404.1 |
| <input type="checkbox"/> Komagataeibacter saccharivorans strain CV1 chromosome, complete genome | Komaga...NA | | 265959 | 1424 | 7124 | 100% | 0.0 | 100.00% | 3192540 | CP023036.1 |
| <input type="checkbox"/> Komagataeibacter xylinus strain XJL-02-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Komaga...NA | | 28448 | 1424 | 1424 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1357 | MH511551.1 |
| <input type="checkbox"/> Komagataeibacter xylinus strain XJL-06-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Komaga...NA | | 28448 | 1424 | 1424 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1355 | MH447173.1 |
| <input type="checkbox"/> Komagataeibacter sp. strain XJL-BC-06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Komaga...NA | | 1965312 | 1424 | 1424 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1349 | MH443376.1 |

Hình 2. Kết quả so sánh độ tương đồng của trình tự vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn A2-5 trên ngân hàng NCBI

3. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 12 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái và sinh hóa phù hợp với vi khuẩn acetic trên môi trường YPGD từ 5 mẫu trà Kombucha. Qua khảo sát về các đặc điểm hình thái, sinh hóa và khả năng sinh acid đã lựa chọn

được chủng vi khuẩn A2-5 có hàm lượng acid là 12,4mg/mL sau 30 giờ nuôi cấy. So sánh trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng vi khuẩn A2-5 được phân lập từ mẫu trà Kombucha của Elyo Kombucha có mức tương đồng 100% với chủng vi khuẩn acetic *Komagataeibacter saccharivorans*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] de Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M.,... Lima, A. R. (2022). *Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties*. Journal of food science, 87(2), 503-527.
- [2] De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). *Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation*. Food microbiology, 73, 11-16.
- [3] Nyhan, L. M., Lynch, K. M., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2022). *Advances in kombucha tea fermentation: A review*. Applied Microbiology, 2(1), 73-103.
- [4] Nguyễn Thị Phương & Nguyễn Thúy Hương (2018). *Phân lập và tuyển chọn hệ cộng sinh giữa nấm men và vi khuẩn trong lên men trà thủy sâm (Kombucha) nhằm nâng cao hàm lượng acid glucuronic*. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 54(1), 13-19.
- [5] Vamanu, E., Vamanu, A., Popa, O., & Câmpeanu, G. (2005). *Isolation of a Lactobacillus plantarum strain used for obtaining a product for the preservation of fodders*. African Journal of Biotechnology, 4(5), 403-408.
- [6] Trần Nhân Dũng (2011). *Sổ tay thực hành sinh học phân tử: Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ*.
- [7] Baker, G., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). *Review and re-analysis of domain-specific 16S primers*. Journal of microbiological methods, 55(3), 541-555.
- [8] Yassunaka Hata, N. N., Surek, M., Sartori, D., Vassoler Serrato, R., & Aparecida Spinosa, W. (2023). *Role of acetic acid bacteria in food and beverages*. Food technology biotechnology, 61(1), 85-103.
- [9] Mokoena, M. P., Omatola, C. A., & Olaniran, A. O. (2021). *Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens*. Molecules, 26(22), 7055.
- [10] Kaban, G., & Kaya, M. (2008). *Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk)*. Journal of food science, 73(8), 385-388.
- [11] Foster, T. (1996). *Staphylococcus*. Medical Microbiology. 4th edition.
- [12] Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L.,... Coton, E. (2017). *Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods*. FEMS microbiology ecology, 93(5).