

ĐẶC TÍNH CỦA EXOPOLYSACCHARIDES (EPS) SINH TỔNG HỢP BỞI VI KHUẨN LACTIC TỪ THỰC PHẨM LÊN MEN TRUYỀN THỐNG VIỆT NAM

Nguyễn Thành Trung^{1*}, Dương Văn Hoàn², Trần Thị Đào², Nguyễn Thị Thu²

¹*Trung tâm Công nghệ Sinh học Dược, Trường Y - Dược, Đại học Duy Tân*

²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: trungnt@duytan.edu.vn

Ngày nhận bài: 17.01.2025

Ngày chấp nhận đăng: 18.04.2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tập trung vào việc phân lập và tối ưu hóa quá trình thu nhận exopolysaccharide (EPS) từ vi khuẩn lactic (LAB) phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống Việt Nam. Từ 33 chủng LAB phân lập, 21 chủng có khả năng sinh tổng hợp EPS đã được xác định. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp EPS là 30°C và pH 6,5. Axit trichloroacetic (TCA) và ethanol được sử dụng để loại bỏ protein và kết tủa EPS. Chủng L4.1 cho thấy khả năng sinh tổng hợp EPS cao nhất. Nồng độ TCA tối ưu là 25%, tỷ lệ dịch nuôi cấy : ethanol là 1:1,5 và thời gian tủa tối ưu là 24 giờ. EPS thu được có khả năng hòa tan trong nước (30,04%) và khả năng bắt gốc tự do (65,87% ở 1 mg/ml). Nghiên cứu này đã xác định các điều kiện tối ưu để cải thiện hiệu suất thu nhận EPS từ LAB, mở ra tiềm năng ứng dụng trong tương lai.

Từ khoá: Exopolysaccharides, LAB, polysaccharides.

Characteristics of Exopolysaccharides (EPS) Synthesized by Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Vietnamese Foods

ABSTRACT

This study focused on isolating and optimizing the exopolysaccharide (EPS) recovery process from lactic acid bacteria (LAB) isolated from Vietnamese traditional fermented foods. Out of 33 isolated LAB strains, 21 showed EPS-producing ability. The optimal culture conditions for EPS biosynthesis were determined to be 30°C and pH 6.5. Trichloroacetic acid (TCA) and ethanol were used for protein removal and EPS precipitation. Strain L4.1 exhibited the highest EPS production. The optimal TCA concentration was 25%, the optimal culture broth : ethanol ratio was 1:1.5, and the optimal precipitation time for EPS recovery was 24 hours. The obtained EPS showed water solubility (30.04%) and free radical scavenging activity (65.87% at 1 mg/ml). This research identified optimal conditions for improving EPS recovery efficiency from LAB, opening potential applications in the future.

Keywords: Exopolysaccharides, LAB, polysaccharides.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Biopolymer được định nghĩa là polymer có nguồn gốc sinh học, có khả năng phân huỷ sinh học. Biopolymer được sản xuất bởi các vi sinh vật sống, chẳng hạn như nhiều loại vi khuẩn, nấm men và nấm mốc đã thu hút được sự chú ý đáng kể trong những thập kỷ gần đây do các ứng dụng có thể có của chúng trong công nghiệp (Moradi & cs., 2021). Polysaccharides ngoại bào của vi

khuẩn được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm và cả trong ngành công nghiệp mỹ phẩm và dược phẩm (Korcz & cs., 2018).

Các loại biopolymer hiện nay đang nhận được sự quan tâm nghiên cứu, đặc biệt là các exopolysaccharides (EPS) do vi khuẩn sinh axit lactic (Lactic acid bacteria/LAB) sản xuất. Hầu hết các nhóm vi khuẩn lactic có khả năng tổng hợp nhiều loại EPS khác nhau (Angelin & Kavitha, 2020). EPS đã được chứng minh có

các đặc tính quan trọng trong y học như chống oxy hóa, giảm cholesterol, kháng sự hình thành các khối u, kháng virus và tăng cường chức năng điều hòa miễn dịch (Madhuri & Vidya Prabhakar, 2014). Ngoài ra, gần đây các hoạt tính sinh học khác của EPS như hoạt động probiotic cũng đã được nghiên cứu rộng rãi. EPS có thể bảo vệ thành tế bào khỏi các hợp chất độc hại, chẳng hạn như nisin, lysozyme, chất tẩy rửa (Zannini & cs., 2018). Những tác dụng bảo vệ chọn lọc này của EPS đối với tế bào sinh vật chủ có thể góp phần vào việc biểu hiện các đặc tính của probiotic. Nói cách khác, các đặc tính có lợi của một số vi khuẩn lactic có thể liên quan đến các hoạt động sinh học của EPS.

EPS hình thành bởi LAB cung cấp một giải pháp thay thế tự nhiên cho các chất phụ gia thực phẩm thương mại vì các đặc tính lý hóa của chúng. Việc ứng dụng EPS có nguồn gốc từ LAB vào thực phẩm có thể làm giảm hoặc hạn chế sử dụng các chất phụ gia, điều này không chỉ tối ưu hóa sản xuất mà còn có thể đáp ứng nhu cầu của khách hàng. EPS là một loại chất làm đặc sinh học thay thế được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm và đã được chứng minh là cung cấp nhiều đặc tính kỹ thuật, chức năng khác nhau. Mặc dù EPS từ vi khuẩn mang lại nhiều đóng góp quan trọng trong lĩnh vực công nghiệp và y học, nhưng còn tồn tại một hạn chế là năng suất thu nhận thấp. Các nghiên cứu hiện nay chỉ tập chung vào quá trình phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp EPS và đánh giá các hoạt tính sẵn có của EPS. Việc thu nhận EPS vẫn đang được thực hiện theo các phương pháp kết tủa truyền thống dựa trên các dung môi hữu cơ. Ngày nay, nghiên cứu xác định các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp và thu nhận EPS từ vi khuẩn lactic là điều cần thiết đã và đang được thực hiện trên toàn thế giới. Do đó, nghiên cứu xác định các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp EPS của các chủng vi khuẩn bản địa tại Việt Nam được thực hiện nhằm mục tiêu xác định các điều kiện tối ưu giúp nâng cao hiệu quả trong quá trình thu nhận EPS từ vi khuẩn lactic.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu thực phẩm lên men gồm: dưa muối, cà muối, sung muối, nhút, tôm chua, nem chua, được thu nhận từ các chợ đầu mối trên địa bàn thị trấn Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội được chọn để phân lập vi khuẩn lactic.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn lactic có khả năng sinh EPS

Các chủng vi khuẩn LAB sinh tổng hợp EPS được phân lập từ các mẫu thực phẩm lên men theo mô tả của Yang & cs. (2018). Các mẫu được pha loãng bằng nước cất vô trùng đến độ pha loãng thích hợp, sau đó cấy trải trên bề mặt môi trường Man-Rogosa-Sharpe (MRS) cải tiến (thay thế glucose bằng 50 g/l sucrose, có bổ sung thêm 0,5% CaCO₃). Các mẫu sau khi phân lập được ủ ở 30°C trong vòng 48 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, các chủng LAB có khả năng hòa tan CaCO₃ trong môi trường thạch MRS và có khuẩn lạc nhầy, nhót được lựa chọn để nghiên cứu tiếp.

2.2.2. Phương pháp tách chiết EPS được tổng hợp bởi vi khuẩn lactic

EPS được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn lactic được tách chiết theo phương pháp mô tả bởi Bajpai & cs. (2016) có chỉnh sửa (sử dụng nồng độ 15% TCA để kết tủa protein). Khuẩn lạc đơn của chủng vi khuẩn đã xác định có khả năng sinh tổng hợp EPS được nuôi cấy trên môi trường MRS lỏng (30°C, 160 vòng/phút, 24 giờ), sau đó ly tâm thu dịch nổi. Dịch nổi được xử lý với 15% TCA (30°C, 90 vòng/phút, 30-40 phút), ly tâm loại bỏ protein và tế bào. EPS trong dịch nổi được kết tủa bằng ethanol tuyệt đối (tỷ lệ 1:2, 4°C, 24 giờ), thu bằng ly tâm. Kết tủa hòa tan trong nước cất và định lượng bằng phương pháp phenol-sulfuric (Dubois & cs., 1956).

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp EPS

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp EPS của các

chủng LAB tuyển chọn được thực hiện theo phương pháp của Oleksy-Sobczak & cs. (2020) có sửa đổi. Cụ thể, các chủng LAB được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng ở các mức nhiệt độ khác nhau là 20, 25, 30, 35, 40°C. Sau 24 giờ nuôi, dịch nuôi cấy được tách chiết và thu nhận EPS với các yếu tố tối ưu và xác định hàm lượng bằng phương pháp phenol - sulfuric (Dubois & cs., 1956).

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh tổng hợp EPS

Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh tổng hợp EPS của các chủng LAB tuyển chọn được thực hiện theo mô tả bởi Oleksy-Sobczak & cs. (2020). Các chủng vi khuẩn LAB được nuôi cấy trong môi trường với pH ban đầu nuôi cấy chủng vi khuẩn LAB là 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 tại nhiệt độ tối ưu đã được khảo sát trước đó. Sau 24 giờ nuôi cấy, EPS sinh tổng hợp từ các chủng LAB tuyển chọn được tách chiết, thu nhận và xác định hàm lượng bằng phương pháp phenol-sulfuric. Sử dụng HCl 2N và NaOH 2N để điều chỉnh pH môi trường.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ TCA đến khả năng loại bỏ protein

Ảnh hưởng của nồng độ TCA đến khả năng loại bỏ protein trong dịch nuôi cấy được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Huang & cs. (2010). Dịch nuôi cấy sau 24 giờ của các chủng có hàm lượng EPS sinh tổng hợp cao được bổ sung TCA ở các nồng độ 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% và 40%. Protein sau khi kết tủa được tách khỏi dịch nổi bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Hàm lượng protein còn lại trong dịch nổi được xác định bằng phương pháp Bradford (Kielkopf & cs., 2020).

2.2.6. Ảnh hưởng của thời gian tủa ethanol đến khả năng thu nhận EPS

Ảnh hưởng của thời gian tủa ethanol đến khả năng thu nhận EPS được tiến hành dựa trên phương pháp mô tả bởi Trần Bảo Khánh (2019) có sự chỉnh sửa đối với các mức thời gian khảo sát là: 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 56 giờ.

Lượng EPS kết tủa thu được sau khi ly tâm được hoà tan bằng nước cất vô trùng, xác định hàm lượng EPS bằng phương pháp phenol-sulfuric (Dubois & cs., 1956).

2.2.7. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol đến khả năng thu nhận EPS

Để khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol (EtOH) đến khả năng thu nhận EPS, thí nghiệm được tiến hành dựa trên phương pháp mô tả bởi Trần Bảo Khánh (2019). Cụ thể, dịch nổi thu được sau khi ly tâm loại bỏ protein với nồng độ TCA đã được khảo sát trước đó sẽ được kết tủa bằng ethanol tuyệt đối với các tỉ lệ khác nhau. Tỷ lệ dịch nuôi cấy : EtOH khảo sát lần lượt ở giá trị 1:0,5; 1:1,0; 1:1,5; 1:2,0 và 1:2,5. Hỗn hợp được để ở 4°C trong 24 giờ sau đó ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C nhằm thu các EPS kết tủa, hàm lượng EPS sau đó được xác định bằng phương pháp phenol - sulfuric (Dubois & cs., 1956).

2.2.8. Khảo sát khả năng hòa tan trong nước của EPS

Khả năng hòa tan trong nước của các mẫu EPS được tiến hành theo mô tả của Ahmed & cs. (2013). Cụ thể, 50mg EPS thu nhận sau khi tách chiết được hòa tan trong 1ml nước và khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ để tạo thành huyền phù đồng nhất. Sau đó, dung dịch được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để tách EPS không tan; 0,2ml dịch nổi được xác định hàm lượng EPS hòa tan trong nước bằng phương pháp phenol - sulfuric (Dubois & cs., 1956). Khả năng hoà tan (%) = (Khối lượng EPS trong dịch nổi) × 5 / (Khối lượng mẫu EPS) × 100.

2.2.9. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của EPS

Hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng loại bỏ gốc hydroxyl (OH⁻) được đánh giá theo phương pháp mô tả bởi Hu & cs. (2019). Trong phản ứng Fenton, chất chống oxy hóa có thể khử Fe₃⁺ thành Fe₂⁺ phản ứng với 1,10-phenanthroline tạo thành hợp chất nacarat Fe₂⁺ - phenanthroline có độ hấp thụ cực đại

ở bước sóng 536nm. Cụ thể, 1ml 1,10-phenanthroline (0,75mm), 1ml FeSO₄.7H₂O (0,75mm) được thêm vào 2ml dung dịch đệm PBS (pH 7,4), 1ml dung dịch mẫu ở các nồng độ, 1ml H₂O₂ (0,01% v/v). Hỗn hợp dung dịch được trộn đều trong ống nghiệm, ủ ở 37°C trong 60 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 536 nm. Khả năng loại bỏ gốc hydroxyl (%) = $[(A_s - A_b)/(A_0 - A_b)] \times 100$. Trong đó: A_s: độ hấp thụ của mẫu, A_b: độ hấp thụ của dung dịch đối chứng khi không có mẫu và A₀: độ hấp thụ của dung dịch trắng không có H₂O₂.

2.2.10. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý sơ bộ bằng phần mềm Excel (version 16.95). Phần mềm GraphPad Prism (version 9.0.2) được sử dụng để dựng biểu đồ và xử lý thống kê. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được thực hiện bằng phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA), sử dụng phần mềm Sirichai Statistics 6.0 và kiểm định Duncan được sử dụng để so sánh từng cặp giá trị trung bình với độ tin cậy P < 0,05 bằng phần mềm Minitab (version 21.4.0).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và xác định khả năng sinh tổng hợp EPS

Tổng cộng 21 chủng được phân lập từ 6 loại thực phẩm lên men truyền thống (dưa muối, cà muối, sung muối, nhút, tôm chua, nem chua). Tất cả các chủng đều là Gram dương và catalase âm tính, được coi là các chủng LAB. Trong số các chủng được sàng lọc, 5 chủng LAB có tế bào hình que và 16 chủng LAB có tế bào hình cầu, khuẩn lạc có kích thước nhỏ, tâm lõm, viền tròn đều, khuẩn lạc dạng nhầy trên thạch MRS. Lượng EPS do các chủng này tạo ra trong môi trường nuôi cấy MRS được liệt kê trong hình 1.

Kết quả hình 1 cho thấy, trong cùng một điều kiện, hầu hết tất cả các chủng vi khuẩn lactic được phân lập đều có khả năng sinh tổng hợp EPS nhưng với các mức độ khác nhau và có ý nghĩa thống kê. Trong đó, chủng có khả năng sinh tổng hợp EPS cao nhất được xác định trong

nghiên cứu là chủng L4.1 với hàm lượng EPS thu nhận được là 230,64 µg/ml. Tiếp theo, hàm lượng EPS thu được trong môi trường nuôi cấy của hai chủng L4.17 và chủng L1.7 tương đối cao, lần lượt là 224,36 µg/ml và 226,67 µg/ml. Các chủng còn lại có khả năng sinh tổng hợp EPS thấp hơn dao động trong khoảng 126,41-220,64 µg/ml. Chủng L4.1 sinh tổng hợp EPS cao nhất được lựa chọn để tiến hành khảo sát ảnh hưởng của một số nhân tố đến khả năng thu nhận EPS.

Kết quả này tương đối phù hợp với nghiên cứu đã được công bố của Luyen & cs. (2016) khi khảo sát khả năng sinh tổng hợp EPS của một số chủng *Lb. fermentum* phân lập từ tôm chua, trong đó, khả năng sinh tổng hợp EPS của chủng TC21 là 177,151 µg/ml và chủng TC16 là 116,74 µg/ml. Còn nghiên cứu của Hu & cs. (2021) đã chỉ ra rằng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 có khả năng sinh tổng hợp EPS với hàm lượng đạt 220 µg/ml.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH môi trường đến khả năng thu nhận EPS

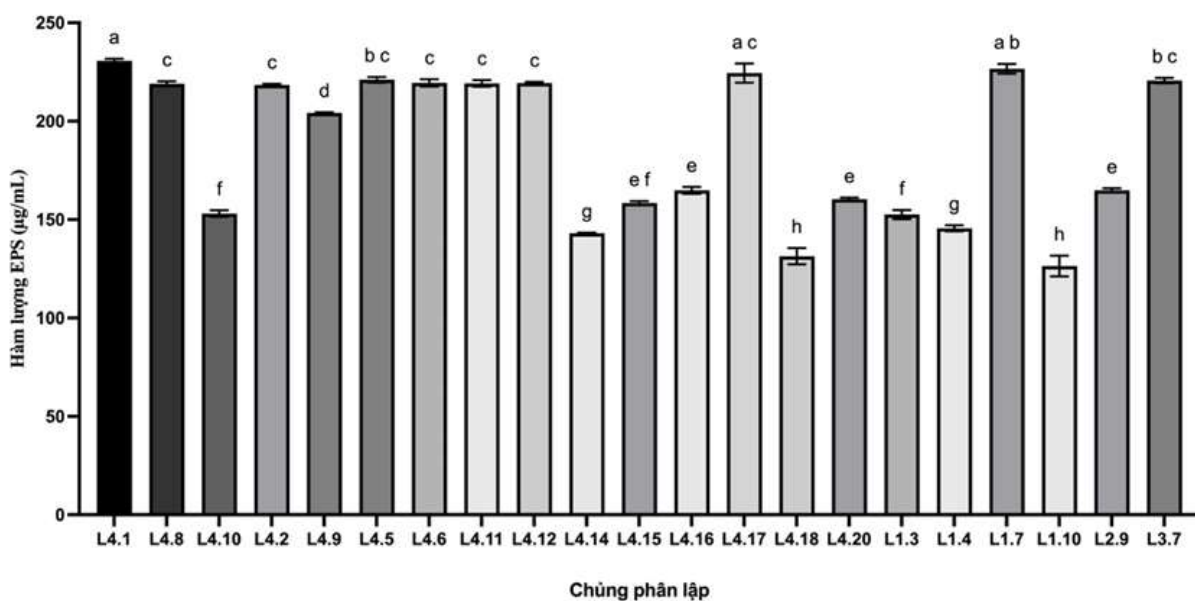
Không giống như các sinh vật khác, nhiệt độ của môi trường có ảnh hưởng rất lớn đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật. Mỗi loài vi sinh vật đều có một khoảng nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng và phát triển. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp EPS của chủng vi khuẩn lactic L4.1 đã được khảo sát ở các mức nhiệt độ 20, 25, 30, 35 và 40°C. Kết quả cho thấy, hàm lượng EPS sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn L4.1 tăng dần khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên và thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nhiệt độ thích hợp nhất cho khả năng sinh tổng hợp EPS của chủng L4.1 nằm trong khoảng từ 25-35°C và có xu hướng giảm nhẹ khi nhiệt độ nuôi cấy ở mức nhiệt là 40°C. Trong đó, 30°C là nhiệt độ tốt nhất cho sinh tổng hợp EPS của chủng vi khuẩn L4.1 (236,32 µg/ml) (Hình 2B).

Ảnh hưởng của độ pH môi trường đến khả năng sinh EPS là khác nhau ở các loài vi sinh vật khác nhau. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc kiểm soát độ pH trong quá trình lên men có thể làm tăng đáng kể năng suất EPS. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát các giá trị

pH ban đầu của môi trường nuôi cấy trong khoảng từ 3,0-7,0 với nhiệt độ thích hợp đã được xác định. Kết quả cho thấy, hàm lượng EPS sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn L4.1 không thay đổi đáng kể ở dải pH từ 3,0-5,5. Ở pH 6,5 hàm lượng EPS sinh tổng hợp bởi chủng L4.1 đạt cao nhất với giá trị là 261,15 µg/ml (Hình 2A). Ở điều kiện pH 7,0 hàm lượng EPS sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn này giảm 15,25% so với mức pH 6,5 (221,36 µg/ml).

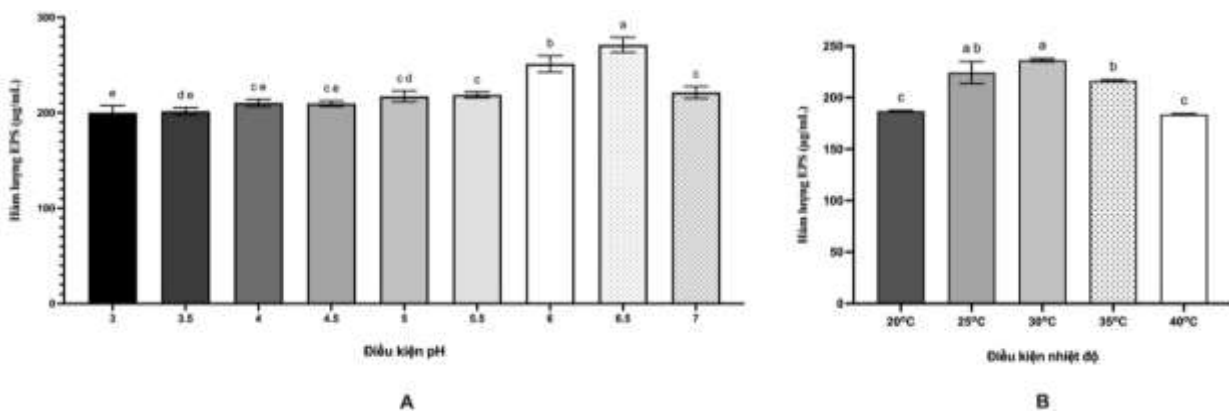
Khoảng pH tối ưu để sinh tổng hợp EPS của các chủng LAB là rất khác nhau. Trong một số

báo cáo trước đây của các tác giả như Fukuda & cs. (2010) thông báo loài *Lactobacillus fermentum* TDS030603 tổng hợp EPS cao nhất ở giá trị pH 6,5; Zhang & cs. (2023) đã báo cáo rằng nồng độ EPS cao nhất của *Lactiplantibacillus plantarum* YT013 là 630 µg/ml khi pH ban đầu của môi trường nuôi cấy là 6,0. Tuy nhiên, Torino & cs. (2005) lại nhận thấy rằng khả năng tổng hợp EPS của *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 đạt cao nhất ở giá trị pH 4,5 so với các mức pH khác được khảo sát trong nghiên cứu.



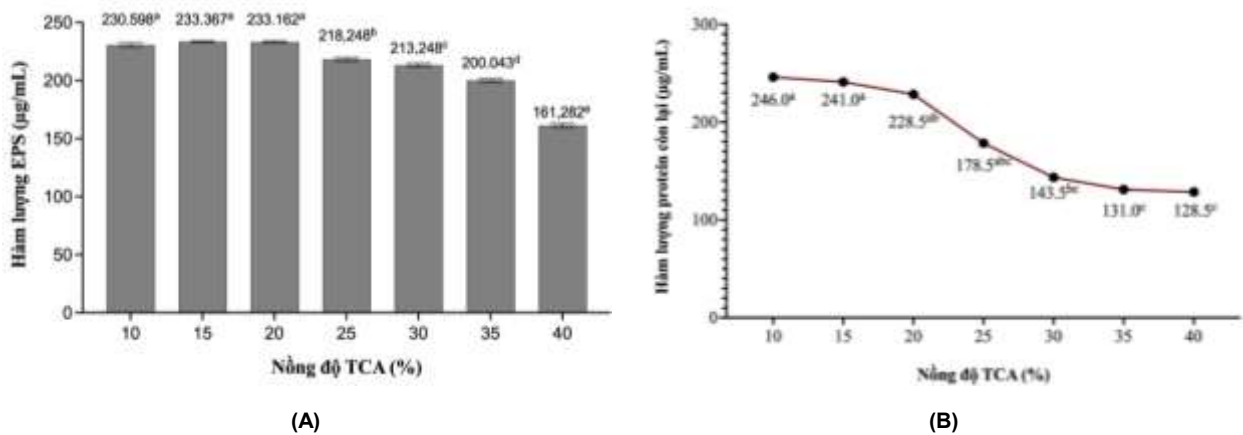
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 1. Khả năng sinh tổng hợp EPS của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ các loại thực phẩm lên men truyền thống



Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Hình 2. Ảnh hưởng của pH (A), nhiệt độ (B) môi trường đến khả năng sinh tổng hợp EPS



Ghi chú: Các con số thể hiện các giá trị trung bình. Các giá trị trung bình có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ TCA đến hàm lượng EPS (A) và khả năng loại bỏ protein (B) trong dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn L4.1

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ TCA đến khả năng loại bỏ protein

Protein trong môi trường nuôi cấy có thể bị đồng kết tủa bởi các hợp chất được dùng để kết tủa EPS trong quy trình tách chiết EPS, ảnh hưởng đến độ tinh sạch của EPS thu được, do đó, protein phải được loại bỏ trước khi kết tủa EPS. Các nghiên cứu trước đó đã chỉ ra rằng TCA có thể được sử dụng để loại bỏ protein hoặc peptide khỏi môi trường nuôi cấy (Garcia-Garibay & Marshall, 1991). Để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ TCA đến khả năng loại bỏ protein từ dịch nuôi cấy của các chủng vi khuẩn lactic, tiến hành bổ sung TCA với nồng độ trong khoảng 10-40%.

Dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn L4.1 sau khi xử lý bằng TCA ở các nồng độ khác nhau từ 10% đến 40% cho kết quả khác biệt rõ rệt về hàm lượng protein còn lại và EPS (Hình 3). Hàm lượng protein giảm từ 246 µg/ml xuống 128,5 µg/ml khi tăng nồng độ TCA từ 10% lên 40%. Lượng protein bị loại bỏ không có sự sai khác về mặt thống kê khi xử lý với TCA có nồng độ từ 10-25%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ TCA lên 30%, lượng protein bị loại bỏ tăng lên, và ở nồng độ TCA từ 35-40% cho hiệu quả loại bỏ protein là cao nhất. Điều này cũng tương tự khi kiểm tra hàm lượng EPS thu nhận được sau khi

đã loại bỏ protein bằng TCA. Lượng EPS thu nhận được ở mức cực đại được xác định sau khi xử lý với TCA ở nồng độ 20%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ TCA lên trên 20% thì hàm lượng EPS thu được lại có xu hướng giảm dần. Điều này có thể là do TCA ở nồng độ cao có thể khiến cho EPS bị phân hủy.

Kết quả này có sự tương đồng với nghiên cứu của Seesuriyachan & cs. (2011), khi nhóm tác giả sử dụng TCA ở nồng độ 30% và thu được lượng EPS từ *L. confusus* TIISTR 1498 ở mức 210 µg/ml, đồng thời loại bỏ lượng protein đáng kể trong dịch nuôi cấy. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Yang & cs. (2018) khi sử dụng TCA với nồng độ thấp hơn (10%), hàm lượng EPS thu được từ *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 chỉ đạt 180 µg/ml. Điều đó cho thấy nồng độ TCA thấp hơn không đủ để tối ưu hóa quá trình loại bỏ protein và thu nhận EPS. Ngược lại, nghiên cứu của Hu & cs. (2021) báo cáo rằng chỉ cần 4% TCA đã đủ để thu được EPS từ *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 với hàm lượng EPS đạt 220 µg/ml.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian tủa đến khả năng thu nhận EPS

Để khảo sát ảnh hưởng của thời gian tủa đến khả năng thu nhận EPS từ chủng L4.1, dịch

nuôi cấy sau khi đã loại bỏ protein được bổ sung thêm ethanol và tiến hành tủa trong các khoảng thời gian khác nhau bao gồm 12, 24, 48 và 56 giờ ở 4°C nhằm mục đích xác định thời gian tủa để thu nhận lượng EPS cao nhất.

Kết quả trong bảng 1 cho thấy, không có sự chênh lệch đáng kể về lượng EPS tủa của chủng L4.1 trong các khoảng thời gian tủa từ 24 giờ đến 56 giờ. Tuy nhiên, nếu thời gian tủa chỉ là 12 giờ thì lượng EPS thu được lại thấp hơn đáng kể. Kết quả này cũng cho thấy, việc kéo dài thời gian tủa quá 24 giờ hầu như không tác động nhiều đến lượng EPS thu nhận được. Như vậy, thời gian tủa tối ưu được xác định là 24 giờ.

Khoảng thời gian tủa 24 giờ cũng là thông số mà hầu hết các tác giả đã sử dụng trong quá trình nghiên cứu thu nhận EPS, cũng như dùng để xác định một số đặc tính lý hóa và cấu trúc của chúng. Yang & cs. (2019) nghiên cứu trên vi khuẩn *Leuconostoc citreum* N21 cũng đã đưa ra kết luận thời điểm 24 giờ là thời gian tối ưu cho quá trình kết tủa thu nhận EPS.

3.5. Ảnh hưởng của tỉ lệ ethanol đến khả năng thu nhận EPS

Tỉ lệ ethanol dùng để tủa ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất thu nhận EPS. Các nghiên cứu trước đây đều cho thấy rằng tỉ lệ ethanol quá thấp sẽ không đủ để kết tủa hoàn toàn EPS, trong khi tỉ lệ quá cao có thể làm kết tủa các chất không mong muốn như protein và các tạp chất khác còn sót lại trong dịch nuôi cấy. Kết quả khảo sát cho thấy, hàm lượng EPS thu được đạt cực đại với giá trị tương ứng là

257,051 µg/ml khi tỷ lệ dịch nổi : ethanol là 1:1,5. Khi tiếp tục tăng tỷ lệ ethanol lên, lượng EPS thu được lại giảm (Hình 4).

So với các công trình đã được công bố trước đây, tỷ lệ của ethanol dùng để kết tủa EPS cũng có nhiều sự khác biệt. Báo cáo của tác giả Wang & cs. (2010) đã sử dụng tỷ lệ dịch nổi : ethanol là 1:1 để tiến hành thu nhận EPS sinh tổng hợp bởi *Lactobacillus plantarum* KF5. Nghiên cứu của Ma'unatin & cs. (2020) thu nhận EPS sinh tổng hợp bởi các chủng LAB phân lập từ nhựa cây cọ Lontar sử dụng ethanol với tỷ lệ 2:1 so với dịch nổi. Zhang & cs. (2021) lại sử dụng tỷ lệ 3:1 nhằm thu nhận EPS sinh tổng hợp bởi *Lactobacillus kimchi* SR8. Sự khác biệt về tỷ lệ tối ưu ethanol so với dịch nổi có thể liên quan đến cấu trúc của EPS mà mỗi chủng vi khuẩn sản xuất, cũng như độ tan của chúng trong dung môi ethanol.

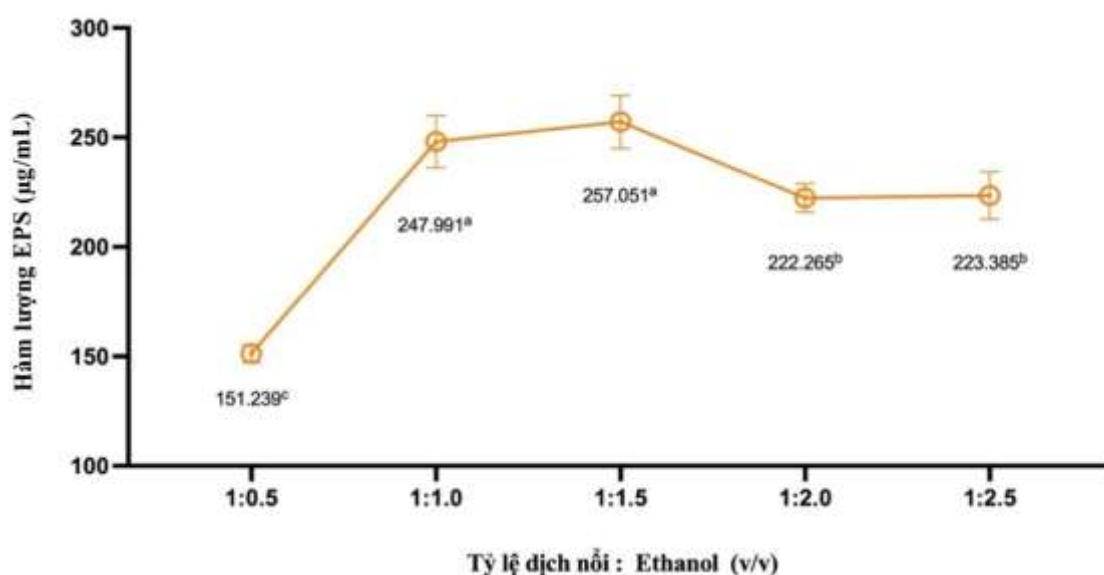
3.6. Khả năng hòa tan trong nước của các EPS thu nhận

EPS hòa tan trong nước phân tán dễ dàng và đồng đều trong dung dịch, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biến đổi như khả năng tạo gel, khả năng ổn định. Khi EPS phân tán đồng đều trong khối thực phẩm, EPS có khả năng ổn định cấu trúc, trạng thái của một số thực phẩm, hạn chế hiện tượng tách nước trong các sản phẩm như sữa hay nước trái cây (Luyen & cs., 2016). Kết quả thí nghiệm cho thấy, EPS sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn tuyển chọn có khả năng hòa tan trong nước đạt 30,04%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian tủa đến khả năng thu nhận EPS sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn L4.1

Thời gian tủa	Hàm lượng EPS thu nhận (µg/ml)
12 giờ	121,538 ^b ± 0,44
24 giờ	244,744 ^a ± 0,71
48 giờ	245,385 ^a ± 0,51
56 giờ	246,410 ^a ± 0,78

Ghi chú: Hàm lượng EPS được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SD; Các giá trị trung bình có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Ghi chú: Hàm lượng EPS được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình \pm SD. Các giá trị trung bình có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch nổi : ethanol đến khả năng thu nhận EPS từ chủng vi khuẩn lactic L4.1

Bảng 2. Hoạt tính chống oxy hóa của các EPS thu nhận được từ chủng vi khuẩn L4.1

Nồng độ EPS (mg/ml)	Hoạt tính chống oxy hóa trung bình (%)
1	65,87 ^a \pm 0,79
0,8	62,69 ^{ab} \pm 1,37
0,6	57,41 ^b \pm 2,00
0,4	28,84 ^c \pm 3,91
0,2	12,96 ^d \pm 0,45

Ghi chú: Hoạt tính chống oxy hóa được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình \pm SD. Các giá trị trung bình có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Nghiên cứu của Ahmed & cs. (2013) đã công bố khả năng hòa tan trong nước của EPS sinh tổng hợp bởi vi khuẩn *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 đạt 14,2%. Trong khi đó Karadayi & cs. (2021) đã báo cáo rằng vi khuẩn *Anoxybacillus gonensis* YK25 sinh tổng hợp EPS đạt độ hòa tan tốt nhất nằm trong khoảng 19-62% ở các nồng độ khác nhau. Các nghiên cứu trước đó đã nhận định rằng độ hòa tan của polysaccharide được xác định bởi cấu trúc phân tử của chúng. Các đặc điểm cấu trúc như cấu trúc phân nhánh, nhóm tích điện (nhóm carboxylate, nhóm sulfate hay nhóm phosphate)

và khối lượng phân tử thấp dẫn đến độ hòa tan cao (Karadayi & cs., 2021).

3.7. Hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng loại bỏ gốc hydroxyl của các EPS

Trong số các loại oxy phản ứng, gốc hydroxyl là gốc dễ phản ứng nhất và có thể gây ra tổn thương oxy hóa cho các phân tử sinh học như DNA và protein dẫn đến bệnh viêm, ung thư, lão hoá, đột quỵ. Trong phản ứng Fenton, chất chống oxy hóa có thể khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} phản ứng với 1,10-phenanthroline tạo thành

hợp chất nacarat Fe^{2+} phenanthroline có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 536 nm (Hu & cs., 2019).

Kết quả đánh giá khả năng trung hoà gốc hydroxyl cho thấy các EPS thể hiện hoạt tính chống oxy hóa ở mức trung bình và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nồng độ EPS khác nhau. Chủng L4.1 có khả năng chống oxy hóa nằm trong khoảng từ 12,96-65,87% và tăng dần theo nồng độ từ 0,2 đến 1 mg/ml. Khả năng chống oxy hoá tăng mạnh khi nồng độ EPS sử dụng tăng từ 0,2 đến 0,6 mg/ml. Tỷ lệ bắt gốc tự do thay đổi không đáng kể khi nồng độ EPS sử dụng trong khoảng 0,6 đến 0,8 mg/ml. Ở nồng độ 1 mg/ml khả năng bắt gốc tự do đạt 65,87% (Bảng 2). Khả năng chống oxy hóa của các EPS có thể liên quan trực tiếp đến mối liên kết trong phân tử EPS với các ion có gốc oxy hóa tạo nên các gốc ổn định, chính vì thế mà nó ngăn chặn được chuỗi tác nhân phản ứng. Thêm vào đó, sự có mặt của một lượng lớn các nhóm hydroxyl trong phân tử EPS cũng có thể tạo ra những phản ứng mà chính sự kết hợp của chúng với nhau để tạo thành những sản phẩm vô hại thông qua việc cung cấp các nguyên tử hydro kết hợp với các gốc hydroxyl để tạo thành nước và những gốc tự do C bị oxy hóa tiếp nhằm tạo nên các gốc peroxy.

Kết quả này tương tự với các nghiên cứu của các tác giả trước đó về khả năng chống oxy hoá của EPS sinh tổng hợp bởi vi khuẩn lactic. Zhang & cs. (2021) nghiên cứu EPS của *Lactobacillus kimchi* SR8 đạt 71,39% ở nồng độ 1 mg/ml. Xiao & cs. (2020) báo cáo rằng *Lactobacillus helveticus* MB2-1 sinh tổng hợp EPS có khả năng chống oxy hóa thông qua khả năng bắt gốc hydroxyl đạt 56,3% ở nồng độ 1 mg/ml.

4. KẾT LUẬN

Từ 6 mẫu thực phẩm lên men tại Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội, 21 chủng LAB sinh tổng hợp EPS đã được phân lập, chủng L4.1 có khả năng cao nhất (230,64 μ g/ml). Điều kiện tối ưu cho sinh tổng hợp EPS là 30°C và pH 6,5. Thu nhận EPS tối ưu từ chủng này đạt được khi xử lý bằng TCA 25% (hiệu quả loại bỏ protein cao nhất), kết tủa bằng ethanol tỷ lệ 1:1,0-1:1,5

trong 24 giờ. EPS thu được có độ hòa tan trong nước 30,04% và khả năng bắt gốc tự do 65,87% (ở 1 mg/ml).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed Z., Wang Y., Anjum N., Ahmad A. & Khan S.T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. Food Hydrocolloids. 30(1): 343-350.
- Angelin J. & Kavitha M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. International Journal of Biological Macromolecules. 162: 853-865.
- Bajpai V.K., Majumder R., Rather I.A. & Kim K. (2016). Extraction, isolation and purification of exopolysaccharide from lactic acid bacteria using ethanol precipitation method. Bangladesh Journal of Pharmacology. 11(3): 573-576.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.T. & Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28(3): 350-356.
- Fukuda K., Shi T., Nagami K., Leo F., Nakamura T., Yasuda K., Senda A., Motoshima H. & Urashima T. (2010). Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium. Carbohydrate Polymers. 79(4): 1040-1045.
- Garcia-Garibay M. & Marshall V. (1991). Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus. Journal of Applied Microbiology. 70(4): 325-328.
- Hu S.-M., Zhou J.-M., Zhou Q.-Q., Li P., Xie Y.-Y., Zhou T. & Gu Q. (2021). Purification, characterization and biological activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 isolated from milk. LWT. 147: 111561.
- Hu X., Pang X., Wang P. G. & Chen M. (2019). Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles. Carbohydrate Polymers. 204: 9-16.
- Huang G., Yang Q. & Wang Z. B. (2010). Extraction and deproteinization of mannan oligosaccharides. Zeitschrift für Naturforschung C. 65(5-6): 387-390.
- Karadayi Y. I., Aykutoglu G., Arslan N. P., Baltaci M. O., Adiguzel A. & Taskin M. (2021). Production of water-soluble sulfated exopolysaccharide with anticancer activity from *Anoxybacillus gonensis* YK25. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 96(5): 1258-1266.

- Trần Bảo Khánh (2019). Nghiên cứu điều kiện thu nhận, xác định tính chất và thành phần Monosaccharide của Exopolysaccharide từ một số chủng thuộc loài *Lactobacillus plantarum*. Luận án tiến sĩ hóa học, Đại học Huế.
- Kielkopf C.L., Bauer W. & Urbatsch I.L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. Cold Spring Harbor Protocols. (4): 102269.
- Korcz E., Kerényi Z. & Varga L. (2018). Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. Food & Function. 9(6): 3057-3068.
- Luyen T.T.A., Thuy Đ.T.B., Khanh T.B. & Khanh N.Q. (2016). Effect of some factors on exopolysaccharide production of *Lactobacillus fermentum* TC21 isolated from 'tom chua' in Hue, VietNam. Hue University Journal of Science. 116: 10.
- Madhuri K. & Vidya Prabhakar K. (2014). Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. Oriental Journal of Chemistry. 30(3): 1401-1410.
- Ma'unatin A., Harijono H., Zubaidah E. & Rifa'i M. (2020). The isolation of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from lontar (*Borassus flabellifer* L.) sap. Iranian Journal of Microbiology. 12(5): 437-444.
- Moradi M., Guimarães J.T. & Sahin S. (2021). Current applications of exopolysaccharides from lactic acid bacteria in the development of food active edible packaging. Current Opinion in Food Science. 40: 33-39.
- Oleksy-Sobczak M., Klewicka E. & Piekarska-Radzik L. (2020). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains - Optimization of synthesis and extraction conditions. LWT. 122: 109055.
- Seesuriyachan P., Kuntiya A., Hanmoungjai P. & Techapun C. (2011). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. Songklanakarin Journal of Science & Technology. 33(4): 379-387.
- Torino M.I. Mozzi F. & Font De Valdez G. (2005). Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. Applied Microbiology and Biotechnology. 68(2): 259-265.
- Wang Y., Li C., Liu P., Ahmed Z., Xiao P. & Bai X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. Carbohydrate Polymers. 82(3): 895-903.
- Xiao L., Han S., Zhou J., Xu Q., Dong M., Fan X., Rui X., Chen X., Zhang Q. & Li W. (2020). Preparation, characterization and antioxidant activities of derivatives of exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. International Journal of Biological Macromolecules. 145: 1008-1017.
- Yang Y., Feng F., Zhou Q., Zhao F., Du R., Zhou Z. & Han Y. (2018). Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. International Journal of Biological Macromolecules. 114: 529-535.
- Yang Y., Feng F., Zhou Q., Zhao F., Du R., Zhou Z. & Han Y. (2019). Isolation, purification, and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc citreum* N21 from dried milk cake. Transactions of Tianjin University. 25: 161-168.
- Zannini E., Jeske S., Lynch K.M. & Arendt E.K. (2018). Development of novel quinoa-based yoghurt fermented with dextran producer *Weissella cibaria* MG1. International Journal of Food Microbiology. 268: 19-26.
- Zhang Y., Chen X., Hu P., Liao Q., Luo Y., Li J., Feng D., Zhang J., Wu Z. & Xu H. (2021). Extraction, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus kimchi* SR8 from sour meat *in vitro* and *in vivo*. CyTA - Journal of Food. 19: 228-237.
- Zhang R., Zhou Z., Ma Y., Du K., Sun M., Zhang H., Tu H., Jiang X., Lu J., Tu L., Niu Y. & Chen P. (2023). Production of the exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* YT013 under different growth conditions: optimum parameters and mathematical analysis. International Journal of Food Properties. 26(1): 1941-1952.