

KHẢ NĂNG ĐỒNG PHÂN HÓA LINOLEIC ACID CỦA CÁC CHỦNG *Lactobacillus* spp. PHÂN LẬP TỪ HỆ VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT Ở NGƯỜI VIỆT NAM

Trần Xuân Thạch¹, Hà Thị Thu¹, Vũ Thị Hiền¹, Hoàng Thế Hưng⁴, Nguyễn Thị Hoa¹, Lê Thị Thu Hồng¹, Lưu Đàm Ngọc Anh², Bùi Văn Hương², Lã Thị Lan Anh³, Đồng Văn Quyền¹, Nguyễn Thị Tuyết Nhung¹, ✉

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Khoa học Hậu cần Quân sự, Học viện Hậu cần

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nttnhung@gmail.com

Ngày nhận bài: 27.6.2019

Ngày nhận đăng: 03.9.2019

TÓM TẮT

Linoleic acid liên hợp (conjugated linoleic acid - CLA) có nhiều lợi ích cho sức khỏe, bao gồm chống ung thư, chống xơ vữa, chống tiểu đường, chống nhiễm trùng, giảm cholesterol, chống oxy hóa, chống vi khuẩn, điều chế hệ miễn dịch và các đặc tính kích thích tăng trưởng. Ở người, CLA được sản xuất từ Linoleic acid (LA) bởi vi khuẩn đường ruột. Trong nghiên cứu này, mười chín chủng *Lactobacillus* (Lac.) phân lập từ vi khuẩn đường ruột của người đã được xác định khả năng chuyển hóa LA của chúng. Các vi khuẩn được nuôi trong môi trường MRS ở dạng lỏng, yếm khí có bổ sung 0,5 mg/mL LA. Hoạt tính đồng phân hóa LA của vi khuẩn trong môi trường MRS được xác định bằng sắc ký khí. Kết quả cho thấy, 4 trong số 19 chủng, bao gồm các chủng Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16 có khả năng tạo ra khoảng 40-50 µg/mL CLA từ LA. Trong số đó, khả năng tạo CLA cao nhất là chủng Lac.02. Trong quá trình tạo ra CLA từ LA, các enzyme liên quan đến quá trình chuyển hóa này ở *Lactobacillus* đóng vai trò là chất xúc tác cho quá trình thêm vào và loại đi gốc OH (CLA-HY), oxy hóa nhóm OH và khử các nhóm oxo (CLA-DH), di chuyển các liên kết đôi carbon-carbon (CLA-DC) và làm bão hòa của liên kết đôi carbon-carbon (CLA-ER). Các gen *cla-dh*, *cla-dc*, *cla-hy* và *cla-er* mã hóa cho enzyme CLA-DH, CLA-DC và CLA-ER đều được tìm thấy ở 4 chủng Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16. Kết quả sắc ký khí cho thấy 4 chủng này đều tạo ra *cis*-9, *trans*-11 và *trans*-10, *cis*-12 CLA. Trong nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ tối ưu hóa các điều kiện như nồng độ cơ chất, giá trị pH, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy của từng chủng để thu được kết quả tốt nhất.

Từ khóa: *Cis*-9, *trans*-11 CLA, *Lactobacillus*; linoleate isomerase; *trans*-10, *cis*-12 CLA

MỞ ĐẦU

CLA là một hỗn hợp của các đồng phân hình học và vị trí của LA với liên kết đôi liên hợp. Những CLA này có nhiều đặc tính sinh học có liên quan đến sức khỏe như đặc tính chống ung thư, chống xơ vữa động mạch (McCrorie *et al.*, 2011), chống đái tháo đường,

chống béo phì, giảm cholesterol (Fiona *et al.*, 2007, Tatiana *et al.*, 2015), chống oxy hóa, kháng khuẩn (Rafaela *et al.*, 2012), điều hòa miễn dịch và kích thích sinh trưởng (Marianne *et al.*, 2004). CLA được tìm thấy chủ yếu trong thịt và các sản phẩm từ sữa của động vật nhai lại (Sebastiano, 2002). Hoạt tính của CLA phụ thuộc vào vị trí nối đôi trong phân tử. Nghiên

cứu cho thấy, liên kết đôi của CLA được tìm thấy chủ yếu ở vị trí 9 và 11, hay 10 và 12 (Alonso *et al.*, 2003). Trong số các đồng phân được tạo thành từ LA thì *cis*-9, *trans*-11 CLA và *trans*-10, *cis*-12 CLA là 2 đồng phân chính (Akalin *et al.*, 2007, Adamczak *et al.*, 2008, Macouzet *et al.*, 2010) có tác dụng lần lượt trong việc phòng chống ung thư và chống béo phì (Kelley *et al.*, 2007).

Theo Arman và đồng tác giả (2016), *cis*-9, *trans*-11 CLA điều hòa chất sinh ung thư bằng cách tác động lên các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển ung thư như giai đoạn khởi phát, tăng trưởng, tiến triển, thoái hóa (Arman *et al.*, 2016). Bổ sung 1% CLA ức chế sự tăng sinh của khối u (Ip *et al.*, 1991). Ở các tế bào đại trực tràng của chuột, *cis*-9, *trans*-11 CLA hoạt hóa gen tổng hợp caspase 3 và caspase 9, qua đó kích thích tế bào kích hoạt sự chết theo chương trình - apoptosis (Ewaschuk *et al.*, 2006). Bên cạnh đó, đồng phân *trans*-10, *cis*-12 CLA lại có tác dụng trong việc giảm mỡ cơ thể (Marques *et al.*, 2015) và duy trì trọng lượng cơ thể (Sou *et al.*, 1994). *Trans*-10, *cis*-12 CLA ức chế sự tổng hợp những enzyme quan trọng liên quan đến sự tổng hợp mới acid béo, từ đó giảm tổng hợp chất béo trong sữa (Baumgard *et al.*, 2000). *Trans*-10, *cis*-12 CLA làm tăng hoạt tính enzyme carnitine palmitoyltransferase (CPT), kết quả là làm tăng quá trình beta oxy hóa acid béo (Park *et al.*, 1997). CLA tác động lên thụ thể alpha được hoạt hóa bởi peroxisome “peroxisome proliferator-activated receptor alpha” (PPAR- α) để làm tăng quá trình phân giải lipid trong gan của động vật (Lee *et al.*, 2007).

Nhiều nghiên cứu cho thấy, một số vi khuẩn trong đó có chi *Lactobacillus* phân lập từ hệ vi sinh vật đường ruột của người có khả năng tạo CLA từ LA (Ewaschuk *et al.*, 2006, Rosberg-Cody *et al.*, 2011, Kishino *et al.*, 2013). Hơn nữa, *cis*-9, *trans*-11 hoặc *trans*-10, *cis*-12 CLA được xác định là những đồng phân chính của quá trình chuyển hóa này (Alonso *et al.*, 2003). Lee và đồng tác giả đã báo cáo rằng *L. rhamnosus* PL60 có nguồn gốc từ người, có khả

năng sản xuất *trans*-10, *cis*-12 CLA từ LA. *L. casei* tạo ra nhiều đồng phân *trans*-10, *cis*-12 CLA hơn *cis*-9, *trans*-11 CLA (Anil *et al.*, 2009) trong khi *L. plantarum* ZS2058 chuyển hóa 37,78% linoleic acid thành *cis*-9, *trans*-11 CLA và 16,57% thành *trans*-9, *trans*-11 CLA (Yang *et al.*, 2014).

Tại Việt Nam, trong số 100.000 người chết vì ung thư mỗi năm thì với số ca tử vong do ung thư đại trực tràng ước tính khoảng 55.000 trường hợp. Bên cạnh đó, tốc độ gia tăng về tỉ lệ người quá cân, béo phì ở Việt Nam nằm trong nhóm các nước có tỉ lệ gia tăng nhanh nhất thế giới. Với những tác dụng có lợi cho sức khỏe của CLA thì việc phân lập, tuyển chọn những chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có ích từ hệ vi sinh vật đường ruột của người có khả năng chuyển hóa LA thành CLA như một probiotic là rất cần thiết để tăng lượng CLA đưa vào cơ thể người và thu được những lợi ích hữu hiệu của CLA (McCrorie *et al.*, 2011).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn mẫu phân lập

Các mẫu phân được người tình nguyện tham gia tại khu vực Hà Nội tự thu thập phân của mình sau đó để trong hộp vô trùng. Mẫu sau đó sẽ giữ lạnh ở 4°C và chuyển ngay đến phòng thí nghiệm để phân tích.

Phân lập vi khuẩn *Lactobacillus*

Một gram phân sẽ được hòa trong 9 mL nước muối sinh lý vô trùng. Dung dịch sau đó sẽ được pha loãng 10 lần liên tiếp cho đến 10^{-7} . Mỗi một nồng độ pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-7} sẽ được cấy gọt trên môi trường thạch MRS và được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí ở 37°C trong vòng 48 đến 72 h. Các khuẩn lạc phát triển trên các đĩa MRS sẽ được lựa chọn và làm sạch bằng cách rìa pha loãng trên đĩa MRS để thu nhận những khuẩn lạc riêng lẻ. Các khuẩn lạc phân lập đầu tiên sẽ kiểm tra hoạt tính catalase và nhuộm Gram, và chỉ những khuẩn lạc âm tính với hoạt tính catalase và là Gram dương sẽ được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp

theo. Những khuẩn lạc này sẽ được giữ trên đĩa thạch MRS để sử dụng cho những nghiên cứu tiếp và được lưu trữ lâu dài ở -80°C trong dịch MRS có bổ sung 20% glycerol.

Tuyển chọn các chủng *Lactobacillus* biểu hiện enzyme isomerase

Quá trình chuyển hóa LA thành CLA ở vi khuẩn *Lactobacillus* gồm nhiều bước với sự kết hợp của các enzyme bao gồm enzyme xúc tác sự hydrat hóa/dehydrat (CLA-HY), oxy hóa nhóm hydroxy/sự khử nhóm oxo (CLA-DH), di chuyển của các nối đôi carbon-carbon (CLA-DC), và bão hòa liên kết đôi carbon-carbon (CLA-ER) (Kishino *et al.*, 2013). Để sàng lọc các chủng mang các gen giúp chuyển hóa LA thành CLA chúng tôi sử dụng phương pháp PCR với các mồi đặc hiệu, bao gồm gen mã hóa CLA-DH (F: 5'- AGC TAG TGT CGA CGA TGC GG-3'; R: 5'-GAC GGT ATC GGC AAT CGT ATC-3'), CLA-DC (F: 5'- ATG CCA CTG ACG AAG CGG TG-3'; R: 5'-TGT CGC AGC ATC AAC TTC GTC-3'), CLA-HY (F: 5'- TGG TGT TGA TAT GCA CGG TGC-3'; R: 5'-AGT CTG CGC ATC CTC AAT GAC-3') và CLA-ER (F:5' CAGACGTGATGTTTAACCGC-3'; R: 5' CAGTCTGTGTTTTGGCATCG-3'). Các cặp mồi này được thiết kế trên cơ sở trình tự hệ gen của các chủng *Lactobacillus* đã công bố trên GenBank [*cla-dh* (GenBank. NC-004567)], [*cla-dc* (GenBank NC-004567)], *cla-er* (GenBankNC-004567)]. Sản phẩm PCR được tách dòng vào vector tách dòng pCR2.1 (Invitrogen), giải trình tự bằng máy xác định trình tự DNA tự động và so sánh với các gen cùng loại trên GenBank bằng phần mềm tin sinh chuyên dụng như mô tả trong các nghiên cứu trước của chúng tôi (Đỗ Thị Ngọc Huyền *et al.*, 2005). Những chủng mang cả 4 gen trên sẽ được lựa chọn để thử nghiệm khả năng đồng phân hóa LA.

Xác định khả năng chuyển hóa LA thành các đồng phân *cis-9*, *trans-11* và *trans-10*, *cis-12* CLA

Các chủng mang gen mã hóa cho LA isomerase sẽ được kiểm tra; cấy chuyển ít nhất ba lần trong MRS sử dụng 1% dịch vi khuẩn và ủ trong 18 giờ ở 37°C . Dung dịch MRS sẽ được bổ sung 0,5 mg/mL LA (Sigma, USA). Các LA được hòa vào 1% Tween 80 trước khi bổ sung vào môi trường. Môi trường được cấy 1% vi khuẩn và ủ ở 37°C với thời gian ủ khác nhau. Sau mỗi thời gian ủ, mẫu từ mỗi nồng độ sẽ được lấy ra và để trên đá. Đo pH, xác định mật độ vi khuẩn bằng cách trải trên đĩa MRS và ủ ở 37°C trong vòng 48 đến 72 h. Sau đó dịch nuôi được ly tâm ở $23.500\times g$ trong 10 min ở 4°C . Loại bỏ cặn tế bào và thu dịch để phân tích CLA. Thí nghiệm sẽ được lặp lại ba lần vào những ngày khác nhau.

Xác định các đồng phân CLA bằng sắc ký khí

Sự có mặt của các đồng phân trong dịch nuôi tế bào sẽ được xác định bằng phương pháp sắc ký khí (GC) như mô tả trong nghiên cứu của Yang và đồng tác giả (2014). Các bước được tiến hành như sau: bổ sung 217 μg chất nội chuẩn, C17: 0 heptadecanoic acid vào 4 mL dịch nổi. Sau khi thêm vào 4 mL isopropanol, hỗn hợp được vortex trong 30 s. Tiếp theo, bổ sung 4 mL n-hexane và vortex, ly tâm ở $5000\times g$ trong 5 phút. Lớp hexan thu được (có chứa lipid) sẽ được làm bay hơi bằng khí nitrogen. Các đồng phân này sẽ được biến đổi thành các methyl este tương ứng với (trimethylsilyl)-diazomethane (Sigma, USA). Các FAME (fatty acid methyl ester) này sẽ được chiết xuất trong n-hexane và phân tách trên cột phân tách dùng trong sắc ký khí (Shimadzu, Japan). Các đồng phân CLA được xác định bởi thời gian lưu với tham chiếu tiêu chuẩn pha CLA (Sigma, USA). Lượng CLA thu được trong dịch nuôi sau khi ủ với *Lactobacillus* là

$$\frac{\text{Lượng CLA thu được sau khi ủ với Lactobacillus}}{\text{Lượng LA trong dung dịch trước khi ủ với Lactobacillus}} \times 100$$

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và tuyển chọn chủng *Lactobacillus*

Tổng số 195 chủng *Lactobacillus* đã phân lập được trên môi trường MRS từ mẫu phân của những người khỏe mạnh ở khu vực Hà Nội. Trên môi trường MRS số lượng khuẩn lạc xuất hiện nhiều với hình dạng và màu sắc khác nhau hơn so với môi trường nước ép cà chua của Briggs hay môi trường chiết xuất thịt và cà chua của de Man (Lee *et al.*, 2008). Các khuẩn lạc thu được hầu hết đều có hình dạng lồi, không nhẵn, trắng đục, không màu, rìa trơn hoặc xê thùy. Các mẫu đã phân lập được làm sạch bằng cách ria cấy trên đĩa thạch MRS để thu được khuẩn lạc thuần khiết. Sau khi nhuộm Gram, hoạt tính catalase và kiểm tra sự đồng nhất dưới kính hiển vi quang học, 19 chủng được chọn lọc để kiểm tra khả năng chuyển hóa LA thành CLA.

Khả năng chuyển hóa LA thành CLA

Khả năng biến đổi LA thành CLA của các vi khuẩn đã được biết đến từ những năm 1980 (Arion *et al.*, 2010). Mười chín chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hình que, Gram dương và có hoạt tính enzyme catalase âm tính đã được kiểm tra khả năng chuyển hóa LA. Kết quả trên Hình 1 cho thấy, hầu hết các chủng này đều có khả năng chuyển hóa LA thành CLA nhưng với mức độ khác nhau.

Bốn chủng Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16 có hoạt tính cao hơn so với 15 chủng còn lại. Những nghiên cứu trước cho thấy, vi khuẩn *Lactobacillus* có thể tạo ra từ 3 đến 56% CLA trong môi trường nuôi cấy có bổ sung LA tự do (Yang *et al.*, 2014). Hơn nữa hoạt tính đồng phân hóa LA của *Lactobacillus* tùy thuộc vào từng loài. Theo Pei và đồng tác giả, hiệu suất chuyển đổi từ LA thành CLA của chủng *L. plantarum* lp15 là 25% (Pei *et al.*, 2011) trong khi đó *L. reuteri* đạt hiệu suất là 54,35% (Sun *et al.*, 2003). Ngoài ra, hiệu suất của phản ứng chuyển hóa LA thành CLA ở quy mô phòng thí nghiệm còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác như thành phần môi trường, nồng độ cơ chất LA, giá trị pH và nhiệt độ nuôi cấy. Alonso và

đồng tác giả (2003) cho thấy khi nuôi cấy *L. acidophilus* L1 trong môi trường MRS có bổ sung 0,02% LA cho hiệu suất chuyển hóa thành CLA cao hơn khi bổ sung 0,05% LA. Thêm vào đó, ở nhiệt độ nuôi cấy 37°C, lượng CLA thu được cao nhất là sau 24 h so với lượng CLA ở 36, 48 và 72 h (Alonso *et al.*, 2003). Ngược lại, có tác giả lại cho rằng phần lớn CLA được tạo thành sau khi các chủng đạt đến pha cân bằng, ở 36 h nuôi cấy. Trong một nghiên cứu khác, tác giả Ty và đồng tác giả (2002) cho biết khi thử nghiệm với *L. acidophilus* (CCRC14079) ở pH 5, 6, 7, và 8, kết quả cho thấy lượng CLA được tạo ra ở pH 5 là cao nhất (TY *et al.*, 2002). Như vậy có thể thấy việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy đối với 4 chủng vi khuẩn Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16 là rất cần thiết.

Gen quy định enzyme mã hóa cho LA isomerase

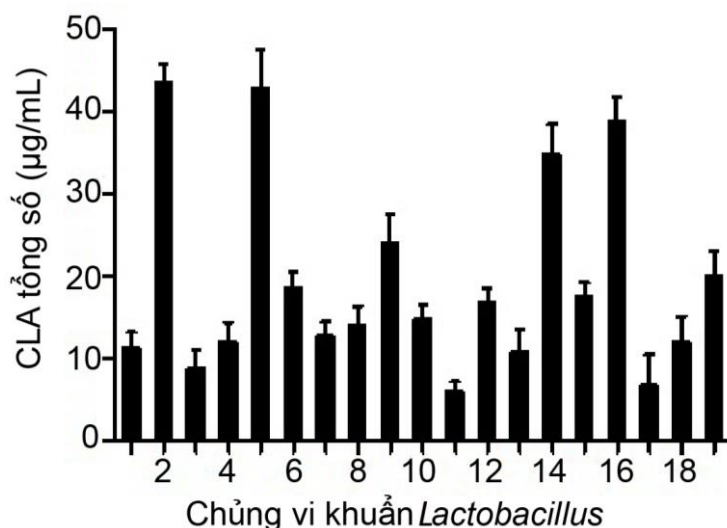
Linoleate isomerase là enzyme đa thành phần tham gia quá trình sản xuất CLA từ LA ở vi khuẩn lactic. Dựa vào trình tự hệ gen đã được công bố trên GenBank, chúng tôi đã thiết kế các cặp mồi đặc hiệu để nhân lên các đoạn gen *cla-dh* (529bp), *cla-dc* (681bp), *cla-er* (654bp) và *cla-hy* (717bp).

Sản phẩm PCR thu được cho thấy, cả 4 chủng chọn lọc đều xuất hiện đầy đủ 4 gen nêu trên với kích thước theo đúng như dự đoán lý thuyết (*cla-dh* - 529 bp; *cla-dc* - 681 bp; *cla-er* - 654 bp và *cla-hy* - 717 bp). Theo công bố của Kishino và đồng tác giả, (2013), ở *Lactobacillus* các gen mã hóa cho CLA-DH, CLA-DC, CLA-ER tạo thành một cụm gen (Kishino *et al.*, 2013). Giống như ở *L. plantarum*, *L. casei* và *L. rhamnosus* cũng có cùng một cụm gen và cả CLA-HY. Ngoài ra, ở các loài vi khuẩn lactic khác cũng chứa từ 1 đến 4 gen nói trên. Ví dụ, *L. salivarius* có 3 gen *cla-dc*, *cla-er* và *cla-hy*; trong khi *L. crispatus* cũng có nhưng lại là *cla-dh*, *cla-er* và *cla-hy*.

Có nghiên cứu cho rằng phải có sự kết hợp của 4 gen này mới cho ra sản phẩm CLA từ LA. Bên cạnh đó, sản phẩm CLA tạo ra sẽ tùy thuộc vào thành phần enzyme cụ thể (Kishino *et al.*, 2013). Cụ thể, khi phản ứng đồng phân hóa

được xúc tác bởi CLA-HY sẽ cho *trans*-10, *cis*-12 CLA, còn phản ứng đồng phân hóa được xúc tác bởi sự kết hợp hoạt động của CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC sẽ cho ra *cis*-9, *trans*-11 và *trans*-9, *trans*-11 CLA. Trong 4 chủng vi khuẩn

Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16 được kiểm tra, cả 4 thành phần enzyme thuộc hệ thống LA isomerase đều có mặt, kết quả này cho thấy những chủng vi khuẩn trên có thể tạo ra nhiều loại đồng phân CLA khác nhau.



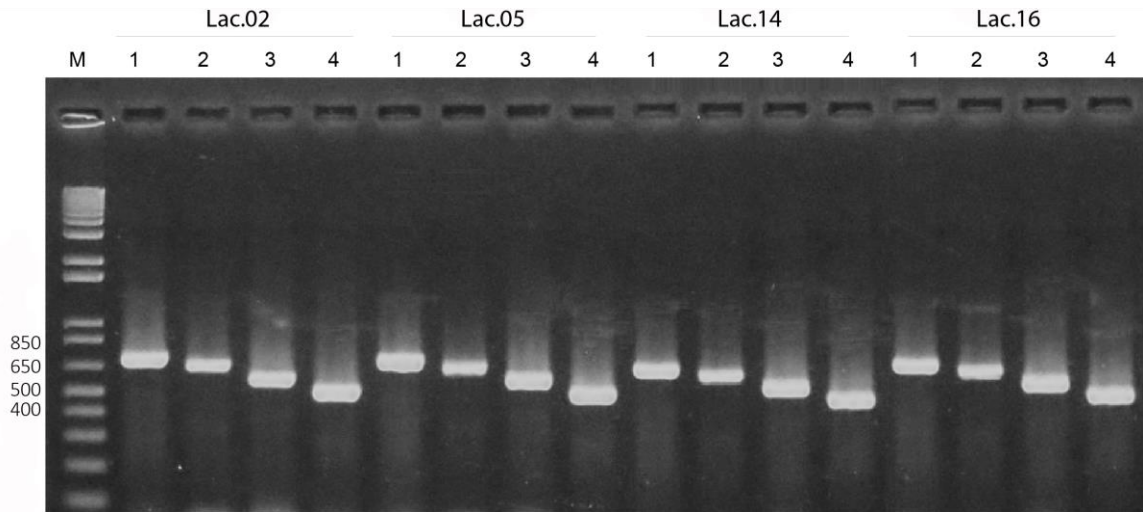
Hình 1. Hoạt tính chuyển hóa LA (0.5 mg/mL) thành CLA của 19 chủng vi khuẩn phân lập từ phân người khỏe mạnh ở Hà Nội.

Các loại đồng phân CLA khác nhau được tạo ra

Khả năng chuyển hóa LA thành CLA của các vi khuẩn đã được biết đến từ những năm 1980 (Haiqin *et al.*, 2012). Có đến 8 đồng phân CLA mà vi khuẩn *Lactobacillus* có thể tạo ra từ LA trong đó *cis*-9, *trans*-11 CLA và *trans*-10, *cis*-12 CLA được xem là 2 đồng phân chính. Một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng tạo ra *cis*-9, *trans*-11 CLA hoặc *trans*-10, *cis*-12 CLA như là một đồng phân chính. Tuy nhiên, một số chủng có khả năng tạo ra cả 2 đồng phân này với lượng tương đương nhau (Julia *et al.*, 2006). Thử nghiệm khả năng đồng phân hóa LA của 4 chủng vi khuẩn chọn lọc, kết quả trên Bảng 1 cho thấy có khoảng gần 10% LA được chuyển hóa thành CLA.

Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp sắc ký khí để phân tách và định lượng các đồng phân tạo ra từ bốn chủng vi khuẩn Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16, chúng tôi thu được kết quả trên Hình 3.

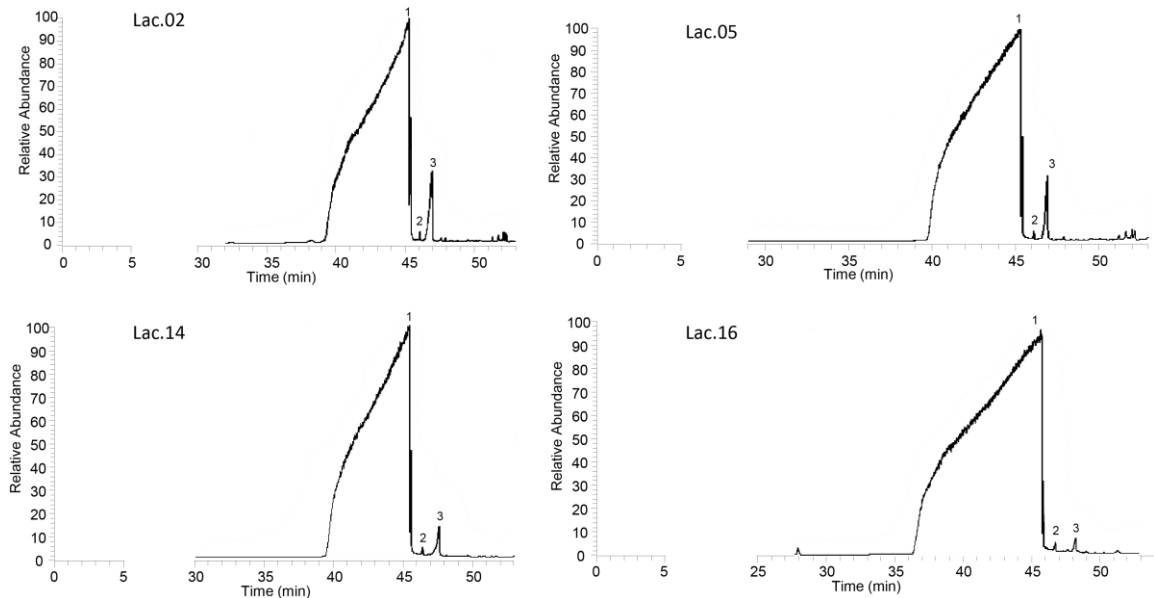
Các chủng này đều có thể chuyển hóa các LA tự do thành *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 CLA. Kết quả trên hình 3 cho thấy, một số đồng phân *cis/trans* và *trans/trans* của CLA có sự phân tách riêng rẽ. Trong đó có *cis*-9, *trans*-11 và *trans*-10, *cis*-12 CLA. Kết quả định lượng (bảng 1) cho thấy, *trans*-10, *cis*-12 CLA được tạo ra từ 4 chủng vi khuẩn Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16 có sự khác biệt, với kết quả cao nhất thu được ở chủng Lac.02, và thấp nhất ở chủng Lac.16. Trong khi đó, *Cis*-9, *trans*-11 CLA được tạo ra với mức độ gần tương đương ở 4 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Như trên đã đề cập, hiệu suất của phản ứng đồng phân hóa LA phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Trong nghiên cứu của Niu và đồng tác giả (2007) cho thấy, trong sản phẩm CLA tạo ra bởi *L. plantarum* ZS2058, *Cis*-9, *trans*-11 CLA chiếm đến 96,4 %. Ngược lại, *L. acidophilus* lại sản xuất *trans*-10, *cis*-12 CLA là chủ yếu khi được nuôi cấy trong môi trường MRS có bổ sung LA (Ty *et al.*, 2002).



Hình 2. Gen mã hóa linoleic acid isomerase của 4 chủng LA 02, LA05, LA12 và LA16. (1) *cla-hy*; (2) *cla-dc*; (3) *cla-er*; (4) *cla-dh*.

Bảng 1. Tỷ lệ thành phần của các CLA.

	<i>Linoleic acid</i> (%)	<i>cis-9, trans-11 CLA</i> (%)	<i>trans-10, cis-12-CLA</i> (%)	<i>Thành phần CLA khác</i> (%)
LA 2	90,51	0,08	2,08	7,33
LA 5	91,34	0,07	1,2	7,39
LA 14	92,61	0,07	0,68	6,64
LA 16	95,84	0,07	0,18	3,91



Hình 3. Đặc điểm của các CLA được tạo ra. (1) Linoleic Acid; (2) *Cis-9, trans-11 CLA*; (3) *Trans-10, cis-12 CLA*.

Kết quả tương tự cũng được quan sát ở các nghiên cứu trước, ví dụ như *L. reuteri* cho thấy độ đặc hiệu cao cho việc sản xuất đồng phân *cis-9, trans-11* CLA nhưng *L. gasseri* tích lũy nhiều đồng phân *trans-10, cis-12* hơn *cis-9, trans-11* khi nuôi trong cùng điều kiện. Ngoài hai đồng phân CLA được chúng tôi báo cáo (*cis-9, trans-10* và *trans-10, cis-12*) có rất nhiều đồng phân khác có thể có mặt trong môi trường mà không được phát hiện bởi phương pháp sắc ký khí được sử dụng trong nghiên cứu này.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được bốn chủng vi khuẩn Lac.02, Lac.05, Lac.14 và Lac.16 có khả năng chuyển hóa LA thành các CLA có ích và kiểm tra sự có mặt của các gen liên quan đến sự chuyển hóa LA. Những phát hiện về khả năng chuyển hóa LA thành *trans-10, cis-12*-CLA và *cis-9, trans-11*-CLA của các chủng *Lactobacillus* phân lập từ phân người tại Việt Nam là những số liệu lần đầu được công bố tại Việt Nam.

Lời cảm ơn. Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài Nafosted Mã số 106.04-2017.313, chủ nhiệm: TS. Nguyễn Thị Tuyết Nhung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W (2008) Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 491-504.

Akalin AS, Tokusoglu Ö, Göncü S, Aycan S (2007) Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructo oligosaccharide. *Int Dairy J* 17: 1089-1095.

Alonso L, Cuesta EP, Gilliland SE (2003) Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J. Dairy Sci* 86: 1941-1946.

Anil Kumar Puniya, Chaitanya S Reddy, Sanjay Kumar, Kishan Singh (2009) Influence of sunflower oil on conjugated linoleic acid production by

Lactobacillus acidophilus and *Lactobacillus casei*. *Ann Microbiol* 59(3): 505-507.

Arion Kennedy, Kristina Martinez, Soren Schmidt, Susanne Mandrup, Kathleen LaPoint, Michael McIntosh (2010) Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem* 21(3): 171-179.

Arman Arab, Shahab Aldin Akbarian, Reza Ghiyasvand, Maryam Miraghajani (2016) The effects of conjugated linoleic acids on breast cancer: A systematic review. *Adv Biomed Res* 5:115.

Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebo A, Bauman DE (2000) Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(1): 179-184.

Đỗ Thị Ngọc Huyền, Trịnh Thị Thu Hằng, Nguyễn Tiến Minh, Nguyễn Thị Ngọc Diệp, Đinh Duy Kháng, Trương Nam Hải, Nguyễn Thủy Châu (2005) Tách dòng và xác định trình tự gen phyC mã hoá cho Phytaza từ các chủng *Bacillus subtilis*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 3: 83-86.

Ewaschuk JB, Walker JW, Diaz H, Madsen KL (2006) Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. *J Nutr* 136(6): 1483-1487.

Fiona Moloney, Sinead Toomey, Enda Noone, Anne Nugent, Bernard Allan, Christine E Loscher, Helen M Roche (2007) Antidiabetic effects of *cis-9, trans-11*-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *DIABETES* 56: 574-582.

HM Lee, Yeonhee Lee (2008) A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. *Lett Appl Microbiol* 46(6): 676-681.

Haiqin Chen, Bo Yang, Sitian Gu, Baixi Zhang, Qingyan Xu, Qiang Ye, Yuanda Song, Yong Q Chen, Hao Zhang, Wei Chen (2012) Purification and characterization of a linoleate isomerase from *Lactobacillus plantarum* ZS2058. *Afric J Biotechnol* 11(20): 4579-4587.

Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW (1991) Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124.

Julia B, Ewaschuk John W, Walker Hugo Diaz Karen L, Madsen (2006) Bioproduction of

- conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. *J Nutr* 136(6): 1483–1487.
- Kelley NS, Hubbard NE, Erickson KL (2007) Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J Nutr* 137: 2599–2607.
- Kishino S, Takeuchi M, Park S B, Hirata A, Kitamura N, Kunisawa J, Kiyono H, Iwamoto R, Isobe Y, Arita M, Arai H, Ueda K, Shima J, Takahashi S, Yokozeki K, Shimizu S, Ogawa J (2013) Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *PNAS* 110(44): 17808-17813.
- Lee K, Paek K, Lee HY, Park JH, Lee Y (2007) Antiobesity effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-included obese mice. *J Appl Microbiol* 103: 1140-1146.
- Macouzet M, Lee BH, Robert N (2010) Genetic and structural comparison of linoleic isomerases from selected food-grade bacteria. *J Appl Microbiol* 109: 2128-2134.
- Marianne O'Shea, Josep Bassaganya-Riera, Inge CM Mohede (2004) Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 79(6): 1199S-1206S.
- Marques TM, Wall R, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Shanahan F, Quigley EM, Cotter PD, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Stanton C (2015) Dietary trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters fatty acid metabolism and microbiota composition in mice. *Br J Nutr* 113(5): 728-738.
- McCrorie TA, Keaveney EM, Wallace JM, Binns N, L MB (2011) Human health effects of conjugated linoleic acid from milk and supplements. *Nutr Res Rev* 24(2): 206-227.
- Niu XY, Chen W, Tian FW, Zhao JX, Zhang H (2007) Bioconversion of conjugated linoleic acid by resting cells of *Lactobacillus plantarum* ZS2058 in potassium phosphate buffer system. *Acta Meteorol Sin* 47: 244–248.
- Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32(8): 853-858.
- Pei Liu, Sheng-rong Shen, Q Z Hui Ruan, Liu-liu Ma, Guo-qing He (2011) Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles. *J Zhejiang Univ Sci B* 12(11): 923–930.
- Rafaela da Silva Marineli, Anne y Castro Marques, Cibele Priscila Busch Furlan (2012) Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague–Dawley rats. *Food Res Int* 49(1): 487-493.
- Rosberg-Cody E, Stanton C, O'Mahony L, Wall R, Shanahan F, Quigley EM, Fitzgerald GF, Ross RP (2011) Recombinant lactobacilli expressing linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host adipose tissue in mice. *Microbiology* 157: 609-615.
- Sebastiano Banni (2002) Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 13(3): 261-266.
- Sou F Chin, Jayne M Storkson, Karen J Albright, Mark E Cook, Michael W Pariza (1994) Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J Nutr* 124(12): 2344–2349.
- Sun Ok Lee, Chang Sup Kim, Somi Kim Cho, Ha Jong Choi, Geun Eog Ji, Deok-Kun Oh (2003) Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol Lett* 25(12): 935–938.
- Tatiana Ederich Lehen, Marcondes Ramos da Silva, Augusto Camacho, Aline Marcadenti, Alexandre Machado Lehen (2015) A review on effects of conjugated linoleic fatty acid upon body composition and energetic metabolism. *J Int Soc Sports Nutr* 12:36.
- TY Lin, CW Lin, YJ Wang (2002) Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *J Food Sci* 67(4): 1502-1505.
- Yang B, Chen H, Gu Z, Tian F, Ross R, Stanton C, Chen Y, Chen W, Zhang H (2014) Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *J Appl Microbiol* 117(2): 430-439.

LINOLEIC ACID ISOMERIZATION ABILITY OF *Lactobacillus* spp. ISOLATED FROM VIETNAMESE HUMAN INTESTINAL ORIGINS

Tran Xuan Thach¹, Ha Thi Thu¹, Vu Thi Hien¹, Hoang The Hung⁴, Nguyen Thi Hoa¹, Le Thi Thu Hong¹, Luu Dam Ngoc Anh², Bui Van Huong², La Thi Lan Anh³, Dong Van Quyen¹, Nguyen Thi Tuyet Nhung¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

⁴*Scientific Research Institute of Military Logistics, Military Academy of Logistics*

SUMMARY

Conjugated linoleic acid (CLA) have been shown to exert numerous health benefits, including anti-carcinogenic, anti-atherogenic, anti-diabetic, antiobesity, cholesterol reducing, antioxidant, anti-microbial, immune system modulator and growth-stimulating properties. In human, CLA is produced from Linoleic acid (LA) by gut bacteria. In this study, nineteen *Lactobacillus* (Lac.) strains isolated from human feces were studied to determine their ability to metabolize LA. The bacteria were grown in the liquid form of anaerobic MRS medium supplemented with 0.5 mg/mL LA. The linoleate isomerase activity in bacteria grown on MRS medium was determined by Gas chromatography. The results indicated that 4 out of 19 strains, including strains Lac.02, Lac.05, Lac.14 and Lac.16 are capable of producing about 40-50 µg/mL CLA from LA. Among them, the highest ability to produce CLA from LA is Lac.02 strain. In the production of CLA from LA, enzymes involved in this metabolism in *Lactobacillus* act as catalysts of hydration/dehydration (CLA-HY), oxidation of hydroxy groups/reduction of oxo groups (CLA-DH), migration of carbon-carbon double bonds (CLA-DC), and saturation of carbon-carbon double bonds (CLA-ER). The *cla-dh*, *cla-dc*, *cla-hy* and *cla-er* genes that encode enzymes CLA-DH, CLA-DC, and CLA-ER had been found in all Lac.02, Lac.05, Lac.14 and Lac.16 strains. Gas chromatography traces indicated that these strains produced the same compounds, which was subsequently identified as *cis*-9, *trans*-11, and *trans*-10, *cis*-12 CLA. In the next study, we will optimize the conditions such as substrate concentrations, pH values, temperature and culture time of each strain to obtain the best results.

Keywords: *Cis*-9, *trans*-12 CLA, *Lactobacillus*; linoleate isomerase; *trans*-10, *cis*-12 CLA;