

CHỌN LỌC DÒNG VI KHUẨN LACTIC TRONG CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN SINH BACTERIOCIN KHÁNG KHUẨN

Đến tòa soạn 11-6-2018

Trần Thanh Mến, Nguyễn Đức Thiên, Nguyễn Trọng Tuấn

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Đỗ Tấn Khang

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Nguyễn Thị Tố Quyên, Trần Trung Tín

Trung Tâm kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng Cần Thơ

SUMMARY

SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED PRODUCTS, PRODUCING ANTIBACTERIAL BACTERIOCINS

The study was conducted to isolate, select and identify lactic acid bacteria (in fermented products) being able to produce antibacterial bacteriocins. Forty-seven lactic acid bacteria strains were isolated from 23 fermented products including pickled leeks, Kimchi, pickled mustard greens, fermented milk Yakul and Probio. The results showed that most of the isolated bacteria had rod shape and features of lactic acid bacteria such as catalase negative, oxidase negative and Gram positive. The results in the antibacterial test indicated that there were 23 strains which could inhibit Escherichia coli, 25 strains could inhibit Salmonella enterica, 26 strains could inhibit Staphylococcus aureus, 25 strains could inhibit Shingella flexneri and 25 strains could inhibit Vibrio parahaemolyticus. In which, there were 11 strains which could inhibit 4/5 species of tested bacteria. Two strains, that had the highest antibacterial activity, were C.C.5 and C.B.3 which were identified as Lactobacillus reuteri and Lactobacillus plantarum, respectively.

Keywords: bacteriocin, antibacterial, lactic acid bacteria, Lactobacillus.

1. MỞ ĐẦU

Bacteriocin có thể được xem là một chất kháng khuẩn có khả năng thay thế kháng sinh vì các peptide được tạo ra từ các vi khuẩn rất đa dạng và phong phú, hơn 99% vi khuẩn có khả năng tổng hợp được ít nhất một bacteriocin [1]. Mặc khác, các bacteriocin được vi khuẩn tổng hợp được có khả năng giết chết các loài vi khuẩn khác loài (phổ rộng) và các loài vi khuẩn có quan hệ gần gũi (phổ hẹp) [2] và không giống với hầu hết các chất kháng sinh, bacteriocin có bản chất là protein, dễ dàng bị phân hủy bởi enzyme proteases có trong hệ tiêu hóa của

người và động vật nên có thể nói là vô hại đối với người và không ảnh hưởng đến môi trường [3]. Trong số các bacteriocin được nghiên cứu thì bacteriocin được sản xuất từ vi khuẩn lactic là được chú ý nhiều nhất vì vi khuẩn lactic rất đa dạng, quen thuộc, đã được con người phát hiện, sử dụng từ rất lâu trước đây để tạo ra các sản phẩm lên men, bảo quản các loại thực phẩm và quan trọng nhất là không những chúng được chứng minh là loài vi khuẩn an toàn mà còn được coi là một loài vi khuẩn có lợi cho con người (probiotics) [4]. Do đó, bacteriocin là hợp chất tiềm năng để sử dụng

trong bảo quản thực phẩm thay thế các hợp chất hóa học công nghiệp, giúp ngăn chặn sự phát triển của các vi sinh vật gây hư hại thực phẩm cũng như các vi sinh vật gây ảnh hưởng sức khỏe người tiêu dùng.

Chính vì những lợi thế đó, việc lựa chọn nghiên cứu về các hoạt chất kháng sinh được tổng hợp từ vi khuẩn lactic có thể được xem là một trong những lựa chọn mang nhiều ưu điểm và có hiệu quả nhất trong quá trình tìm kiếm các chất kháng sinh. Vì vậy nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tìm kiếm các dòng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất chất kháng khuẩn mạnh để có thể ứng dụng vào sản xuất các chất bảo quản thực phẩm cũng như tạo ra các chế phẩm sinh học mới phục vụ cho cuộc sống.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các sản phẩm lên men chưa: củ kiệu, kim chi, dưa cải, sữa chua uống Yakul, Probio mua ở các siêu thị Big C, Co.op Mart và Lotter Mart ở thành phố Cần Thơ.

2.2. Môi trường và hóa chất

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn: MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, Himedia), Môi trường thử hoạt tính BHI (Brain Heart Infusion), hydrogen peroxide (Sigma), Tetramethyl-p-phenylendiamin dihydrochlorid (Sigma), PCR buffer (Thermo Fisher Scientific), dNTPs (Promega), Taq polymerase (NEB).

2.3. Chuẩn chuẩn

Các dòng vi khuẩn thử nghiệm gồm:

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* và *Vibrio parahaemolyticus* được cung cấp từ Phòng Thử nghiệm hóa sinh, Trung tâm kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng Cần Thơ, Số 45 - đường 3/2 - Quận Ninh Kiều - Thành phố Cần Thơ.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập và khảo sát đặc điểm hình thái, đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn

Phân lập: Khoảng 100 μ L dung dịch các sản phẩm lên men được trộn với 900 μ L nước

cát vô trùng, sau đó pha loãng đến 10^{-5} . Mẫu pha loãng (100 μ L) được hút bằng micropipette cho vào đĩa Petri có sẵn môi trường MRS agar, dùng que cấy trải đều. Đĩa sau khi cấy được ủ ở 37°C trong 24h. Khi khuẩn lạc xuất hiện, chọn những khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa Petri, cấy và phân lập nhiều lần trên môi trường MRS agar cho đến khi xuất hiện những khuẩn lạc đồng nhất [5].

Khảo sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn: Đo kích thước và quan sát hình thái dạng khuẩn lạc bao gồm các chỉ tiêu: màu sắc, hình dạng, độ nổi và dạng bìa khuẩn lạc bằng mắt thường. Nhuộm Gram để quan sát hình thái tế bào vi khuẩn và để xác định đặc tính Gram của vi khuẩn [5].

Khảo sát đặc tính sinh hóa: Thử nghiệm catalase và oxidase được thực hiện để khảo sát đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập được [5].

2.4.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch bacteriocin thô

Ly trích bacteriocin: Các dòng vi khuẩn sau khi phân lập được nuôi tăng sinh trong các ống nghiệm chứa môi trường BHI lỏng, các ống môi trường này được ủ ở 37°C trong 24h. Các ống nuôi vi khuẩn sau khi ủ được đem ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C , dùng micropipette hút lấy phần dung dịch phía trên, điều chỉnh pH của dung dịch đạt pH 6,5 bằng NaOH 0,1N, thu được dung dịch bacteriocin thô [6].

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch: Sử dụng 1 mL dịch vi khuẩn của các dòng vi khuẩn thử nghiệm với nồng độ 10^6 CFU bơm vào đĩa Petri chứa môi trường BHI agar, trải đều, sau đó rút lượng huyền dịch dư thừa ra, để khô mặt các đĩa trong khoảng 15 phút. Dùng thanh kim loại vô trùng tạo các giếng nhỏ có đường kính 8 mm trên các đĩa Petri đã trải vi khuẩn thử nghiệm. Hút 100 μ L dung dịch bacteriocin thô từ các dòng vi

khuẩn thu thập nhỏ vào từng giếng của đĩa thạch, với đĩa đối chứng nước cất vô trùng được thay thế cho dung dịch bacteriocin. Các đĩa thạch được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút cho dung dịch khuếch tán trên mặt thạch. Sau đó, các đĩa thạch được ủ ở 37°C trong vòng 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn được xác định bằng sự hiện diện của vòng kháng khuẩn xung quanh lỗ [7].

2.4.3. Định danh

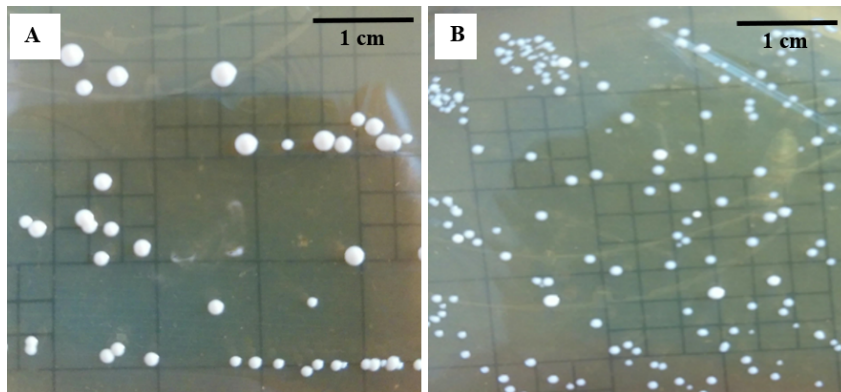
Sau khi khảo sát đặc tính kháng khuẩn của những dòng vi khuẩn phân lập, chọn các dòng vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn mạnh để định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi gồm 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTC -3') và 1492R (5'- TACGGTTACCTTGTTACGACT -3'). Chất

lượng của trình tự DNA được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit, sau đó trình tự được so sánh với dữ liệu ngân hàng gene NCBI (National Center for Biotechnology Information) thông qua chương trình BLASTN để xác định tên loài của vi khuẩn [5].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Phân lập và khảo sát đặc điểm hình thái, đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn

Tổng cộng có 47 dòng vi khuẩn được phân lập từ 23 mẫu sản phẩm lên men tại các siêu thị ở Thành phố Cần Thơ. Trong đó có 10 dòng phân lập được từ mẫu kim chi, 10 dòng từ các mẫu dưa củ kiệu, 8 dòng từ các mẫu dưa cải, 11 dòng từ sản phẩm uống Yakul và 8 dòng từ các mẫu Probio.



Hình 1: Khuẩn lạc của dòng vi khuẩn Y.B.3 (A) và D.B.2 (B)

Các dòng vi khuẩn phân lập được đa số đều phát triển nhanh, khuẩn lạc được quan sát rõ sau 24 giờ ủ ở 37°C. Các khuẩn lạc phân lập được có màu trắng nhạt, trắng đục và màu vàng kem, bìa nguyên, độ nổi mô hoặc lồi, kích thước khuẩn lạc nằm trong khoảng từ 0,5 – 3,0 mm (Hình 1). Tế bào của các dòng vi khuẩn có dạng hình que hoặc hình cầu. Đa số các khuẩn lạc có dạng tròn nhỏ, gồm 31 dòng. Các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng nhạt, gồm 25 dòng. Một số khuẩn lạc có màu trắng đục, gồm 14 dòng. Số còn lại, khuẩn lạc có màu vàng kem, gồm 8 dòng. Ở tất cả các dòng, khuẩn lạc

có bìa nguyên. Đa số dòng vi khuẩn khuẩn lạc mô, gồm 26 dòng. Số còn lại là khuẩn lạc lồi, gồm 21 dòng, chiếm 45%. Khuẩn lạc có kích thước vào khoảng từ 2 - 3 mm. Hầu hết các dòng vi khuẩn có hình que, số còn lại có hình cầu.

3.2. Các thử nghiệm xác định đặc tính vi khuẩn

Các đặc tính sinh lý và sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập từ các sản phẩm lên men được xác định bằng các thử nghiệm đặc trưng gồm nhuộm Gram, thử nghiệm catalase và oxidase.

Nhuộm Gram: Tất cả tế bào của 47 dòng vi khuẩn được phân lập đều bắt màu tím xanh của phẩm nhuộm crystal violet, chứng tỏ các dòng vi khuẩn này đều thuộc vi khuẩn Gram dương.

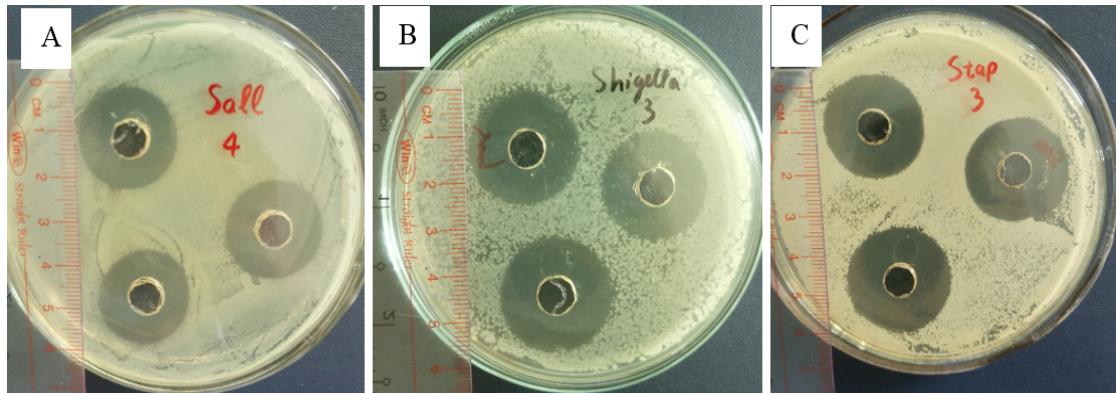
Thử nghiệm catalase: Các dòng vi khuẩn trên đều không xảy ra hiện tượng hình thành bọt khí khi kiểm tra với dung dịch H₂O₂, chứng tỏ các dòng vi khuẩn này không có enzyme catalase.

Thử nghiệm oxidase: Không xuất hiện màu tím sẫm khi cho vi khuẩn lên giấy có thuốc thử Tetramethyl-p-phenylendiamin dihydrochlorid nên chúng không thể hiện hoạt tính của enzyme oxidase.

Qua các thử nghiệm trên kết hợp với các đặc điểm khuẩn lạc, có thể kết luận rằng các dòng vi khuẩn phân lập từ các sản phẩm lên men đều thuộc dòng vi khuẩn lactic dựa trên các đặc tính điển hình Gram dương, catalase và oxydase âm tính.

3.3. Kết quả khảo sát tính kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn được tiến hành khảo sát khả năng kháng khuẩn với 5 dòng vi khuẩn gây bệnh là *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*. Khả năng kháng 5 dòng khuẩn gây bệnh của các dòng vi khuẩn lactic đã phân lập thể hiện thông qua sự hình thành vòng kháng xung quanh giếng thạch trên đĩa môi trường BHI đã trải vi khuẩn gây bệnh (Hình 2). Đối với vi khuẩn *E. coli*, có 23/47 dòng vi khuẩn có khả năng kháng. Có 26/47 dòng vi khuẩn có khả năng kháng lại vi khuẩn *S. aureus*. Đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có 25/47 dòng vi khuẩn có khả năng kháng. Đối với vi khuẩn *S. flexneri*, có 25/47 dòng vi khuẩn có khả năng kháng. Đối với vi khuẩn *S. enterica*, có 25/47 dòng có khả năng kháng.



Hình 2: Hoạt tính kháng khuẩn của bacteriocin ly trích từ dòng vi khuẩn lactic (A): P.B.1 trên *S. enterica*; (B): K.B.3 trên *S. flexneri* (C): C.B.3 trên *S. aureus*

Hầu hết các dòng vi khuẩn lactic đều có khả năng kháng lại ít nhất là 1 dòng khuẩn bệnh và tối đa 4 dòng khuẩn gây bệnh, trừ dòng K.L.3 là không có khả năng kháng lại các dòng khuẩn gây bệnh. Từ 47 dòng vi khuẩn được phân lập, 11 dòng vi khuẩn có khả năng kháng lại 4/5 dòng khuẩn gây bệnh được chọn ra bao gồm: K.B.3, C.B.1, C.B.3, P.B.1, C.C.2, C.C.4, C.C.5, Y.C.3, D.C.2, D.L.2, D.L.3. Các dòng này được so sánh với nhau để lựa chọn các dòng tối ưu nhất.

Từ các kết quả khảo sát cho thấy, dòng C.C.5 và C.B.3 là 2 có khả năng kháng khuẩn cao nhất trong số 11 dòng khảo sát. Cụ thể, dòng C.C.5 có khả năng kháng mạnh đối với các vi khuẩn *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* và không tạo vòng kháng với dòng *S. flexneri*. Dòng C.B.3 có khả năng kháng mạnh đối với các vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *S. flexneri*, *S. enterica* và không kháng với dòng *V. parahaemolyticus*.

Bảng 1: Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của 11 dòng vi khuẩn lactic

STT	Dòng	Vi khuẩn gây bệnh				
		<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
1	K.B.3	10,67±1,56 ^f	-	10,67 ± 0,58 ^c	20,67 ± 1,16 ^d	13,33 ± 1,53 ^c
2	C.B.1	13,33±1,53 ^{dc}	14,33 ± 0,58 ^c	25,33 ± 0,58 ^b	-	22,67 ± 1,16 ^b
3	C.B.3	26,67±1,56 ^a	13,67 ± 1,16 ^c	26,67 ± 1,16 ^b	23,67 ± 1,16 ^{ab}	-
4	P.B.1	-	22,67 ± 1,16 ^c	15,00 ± 1,00 ^d	12,00 ± 3,46 ^d	15,67 ± 2,89 ^c
5	C.C.2	14,67±0,58 ^d	18,33 ± 1,16 ^d	-	12,67 ± 1,53 ^d	10,67 ± 1,56 ^d
6	C.C.4	10,67±0,58 ^f	18,00 ± 1,00 ^d	-	21,67 ± 1,53 ^{bc}	20,33 ± 0,58 ^b
7	C.C.5	26,33±0,58 ^a	26,67 ± 0,58 ^a	28,33 ± 1,53 ^a	-	26,67 ± 0,58 ^a
8	Y.C.3	20,67±0,58 ^c	17,00 ± 1,00 ^d	15,67 ± 1,56 ^d	12,33 ± 2,51 ^d	-
9	D.C.2	22,33±1,65 ^b	17,67 ± 1,16 ^d	25,33 ± 0,58 ^b	12,00 ± 1,00 ^d	-
10	D.L.2	-	24,00 ± 1,00 ^{bc}	11,33 ± 1,53 ^c	25,33 ± 1,53 ^a	15,33 ± 2,51 ^c
11	D.L.3	12,33±1,56 ^c	25,00 ± 1,73 ^{ab}	18,00 ± 1,00 ^c	-	27,67 ± 1,16 ^a

Ghi chú: các ký tự theo sau các giá trị trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; (-) không ức chế.

3.4. Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

Dựa vào kết quả khảo sát tính kháng khuẩn, hai dòng vi khuẩn C.C.5 và C.B.3 được chọn để định danh. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn C.C.5 có mức độ đồng hình với dòng *Lactobacillus reuteri* là 97% và dòng C.B.3 có mức độ đồng hình với dòng *Lactobacillus plantarum* là 97%.

L. reuteri được biết và sử dụng như một probiotic từ nhiều năm cho con người và vật nuôi [8]. Nhiều bacteriocin đã được xác định và phân tách từ *L. reuteri* trong đó có 2 bacteriocin chính là Reuterin_LHS (10,6 kDa), một trong những bacteriocin chiếm phần lớn của vi khuẩn này và Reuterin 6 (2,7 kDa) [9].

Các bacteriocin sản xuất từ *L. plantarum* gồm có Plantaricin UG1, Plantaricin 154, Plantaricin SA6, Plantaricin 1.25L, Plantaricin ST32, Plantaricin S α , Plantaricin S ν , Plantaricin A α , Plantaricin A β , Plantaricin C, Plantaricin 149, Plantaricin WHE92, Plantaricin C19, Plantaricin 423, Plantaricin D, Plantaricin LC74, Plantaricin KW30, ST13BR, Plantaricin LpU4 [10, 11].

4. KẾT LUẬN

Phân tích các chuỗi trình tự trên ngân hàng gene đã xác định hai dòng vi khuẩn (C.C.5 và C.B.3) là vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus plantarum* được phân lập từ mẫu dưa củ kiệu truyền thống. Đây là hai dòng vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất bacteriocin có khả năng kháng khuẩn tốt, có thể kháng được một số dòng vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm và gây bệnh cho người gồm *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* và *S. flexneri*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Riley M.A. and Wert J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137.
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788.
- Saavedra L., Minahk C., de Ruiz Holgado A.P., Sesma F. (2004). Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH2-terminal sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2778 - 2781.
- Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guequen M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Intl. J. Food Microbiol.*

126(3), 278–285.

5. Trần Ngọc Đương, Trần Nhân Dũng, Bùi Thị Minh Diệu và Đỗ Tấn Khang (2013). Khảo sát tính đa dạng sinh học vi khuẩn acid lactic phân lập từ cơm mẻ ở ba vùng sinh thái của đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 25, 58 – 66.

6. Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Xuân Phong và Huỳnh Thị Yến Ly (2011). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 19a, 174-184.

7. Aly, E. and Abo-Amer. 2007. Characterization of a Bacteriocin-Like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Egyptian home-made Yogurt. ScienceAsia, 33, 313 - 319.

8. Mahdi L., Alkareem S.A., Musafir H. (2016). Immunomodulatory and antagonistic effect of *Lactobacillus reuteri* and its purified characterized bacteriocin against *Salmonella enterica* and *Shigella flexnerii*. Advances in Natural and Applied Sciences. 10(17), 155-167.

9. Kabuki T., Saito T., Kawai Y., Uemura J., Itoh T. (1997). Production, purification and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. International Journal of Food Microbiology, 34(2), 145-156.

10. Milioni C., Martinez B., Degl'innocenti S., Turchi B., Fratini F., Cerri D., Fischetti R. (2015). A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LpU4 as a valuable candidate for biopreservation in artisanal raw milk cheese. Dairy Science & Technol. 95, 479.

11. Todorov S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. Brazilian Journal of Microbiology, 40(2), 209–221.

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN ĐIỆN CỰC MÀNG BISMUT IN SITU(tiếp theo tr. 33)

6. Pauliukaite R., Brett C., *Characterization and application of bismuth-film modified carbon film electrodes*, Electroanalysis 17, (2005), 1354-1359.

7. Prior C., Lenehan C. E., Walker G., S., *Utilising gallium for enhanced electrochemical copper analysis at the bismuth film electrode*, Analytica Chimica Acta 598, (2007), 6573.

8. Stozhko N. U., Malakhova N. A., Fyodorov M. V., Brainina K. Z., *Modified carboncontaining electrodes in stripping*

voltammetry of metal, Journal of Solid State Electrochemistry 12, (2008), 1185-1204.

9. Wang J., Lu J., Hocevar S., Farias P., *Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry*, Analytical Chemistry 72, (2000), 3218-3222.