

PHÂN LOẠI CHỦNG VI KHUẨN *LACTOCOCCUS* PD14 TỔNG HỢP BACTERIOCIN

Hoa Thị Minh Tú^{1,*}, Nguyễn La Anh² và Lê Thanh Bình¹

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

²Viện Công nghiệp thực phẩm, Bộ Công Thương

*Email: hoathiminhtu@gmail.com

Đến Tòa soạn: 17/6/2012; Chấp nhận đăng: 25/12/2012

TÓM TẮT

Chủng *Lactococcus* PD14 tổng hợp bacteriocin cao được phân lập từ sữa bò tươi ở Việt Nam. Bacteriocin của chủng có phổ tác dụng chủ yếu với các vi khuẩn Gram dương, trong đó đặc biệt ức chế mạnh nhóm vi khuẩn gây bệnh, gây ngộ độc thực phẩm như *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*. Khi xử lý với các enzyme phân hủy protein thì bacteriocin của chủng bị mất hoạt tính hoàn toàn bởi tác động của α -chymotrypsin trong khi xử lý với trypsin vẫn giữ nguyên hoạt tính. Kết quả này cũng trùng với kết quả nghiên cứu về nisin đã được công bố trước đây. Nghiên cứu về đặc điểm hình thái tế bào cũng như các đặc điểm về sinh lý, sinh hóa cho thấy chủng PD14 có nhiều điểm tương đồng với loài *Lactococcus lactis* và giống với *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSMZ 20729. Đánh giá khả năng đồng hoá các nguồn cacbon qua sử dụng kit API 50 CHL và khẳng định lại bằng phương pháp phân tích trình tự gene 16S ARN cho thấy chủng PD14 tương đồng với *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* lần lượt là 99,0 và 99,7 %. Từ tất cả các kết quả đạt được nêu trên là những bằng chứng cho thấy chủng *Lactococcus* PD14 thuộc *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Từ khóa: phân loại, loài, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, bacteriocin, nisin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic thuộc nhóm Gram dương, hình que hay hình cầu, không sinh bào tử, oxydase và catalase âm tính [1]. Hệ vi sinh vật này là nguồn chủ yếu sản sinh bacteriocin, một loại peptit hay protein có khả năng tiêu diệt một số vi sinh vật gây bệnh, làm hỏng thực phẩm [2, 3, 4]. Nisin, một bacteriocin điển hình đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong bảo quản thực phẩm ở hơn 50 quốc gia trên thế giới [5, 6]. Nisin đầu tiên xuất hiện trên thị trường từ năm 1953, với tên thương mại là Nisaplin [5, 7]. Do khả năng ứng dụng và hiệu quả của chúng nên hướng nghiên cứu và ứng dụng về vi khuẩn lactic, đặc biệt về khả năng sinh bacteriocin ngày càng được mở rộng và phát triển [5, 8].

Chi *Lactococcus* được phát sinh từ một nhánh của chi *Streptococcus*. Những nghiên cứu gần đây cho thấy chi này có 5 loài, gồm *L. lactis*, *L. garviae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. piscum*; trong đó loài *L. lactis* có 3 dưới loài *L. lactis* subsp. *lactis*; *L. lactis* subsp. *cremoris* và

L. lactis subsp. *hordniae* [9]. Trong số bacteriocin được tổng hợp từ loài *L. lactis* subsp. *lactis* ngoài nisin, còn có một số khác như lacticin 481, lacticin 3147, lactococcin MMFII, lactococcin G, lactococcin M và lactostrepsin [10 - 12] .

Chủng PD14 có hoạt tính sinh tổng hợp bacteriocin cao được phân lập từ nguồn sữa bò tươi ở Việt Nam. Những kết quả nghiên cứu về đặc tính của bacteriocin này, bao gồm phổ kháng khuẩn, khả năng nhạy cảm với enzyme phân hủy protein, độ bền nhiệt, bền axit, trọng lượng phân tử cho thấy bacteriocin có nhiều đặc điểm tương đồng với nisin. Vì vậy, vấn đề định tên đến loài chủng PD14 không chỉ có ý nghĩa khoa học mà còn mở ra khả năng ứng dụng bacteriocin này trong việc quản thực phẩm.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng vi sinh vật và môi trường

Chủng *Lactococcus* PD14, *L. lactis* DSMZ20729 và chủng kiểm định *Lactobacillus plantarum* JCM1149 có trong bộ sưu tập giống của Phòng Vật liệu sinh học, viện Công nghệ sinh học. Những chủng này được nuôi trên môi trường MRS có thành phần như sau (g/l): peptone 10; cao thịt 10; cao nấm men 5; glucose 20; Tween 80 1; K_2HPO_4 2; CH_3COONa 5; amoni citrat 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,05; pH = 6,5 ÷ 6,8.

2.2. Phát hiện hoạt tính bacteriocin

Hoạt tính bacteriocin được phát hiện bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch [14]. Trong đó chủng PD14 được nuôi ở 30°C trong khoảng thời gian từ 14 - 16 giờ, sau đó li tâm thu dịch nổi. Chủng kiểm định *L. plantarum* JCM 1149 nuôi qua đêm ở môi trường MRS lỏng được bổ sung vào môi trường MRS agar tỉ lệ 0,5 %, lắc đều môi trường với chủng kiểm định, đổ ra đĩa petri và đục lỗ thạch. Nhỏ dịch li tâm đã được chỉnh pH về 6,5 vào các lỗ thạch, giữ ở nhiệt độ 4 °C trong khoảng 4 giờ, sau đó ủ ở 30 °C sau 24 giờ. Việc xuất hiện vòng vô khuẩn đồng nghĩa mẫu có thể có hoạt tính bacteriocin.

Để khẳng định bản chất bacteriocin, cần nghiên cứu khả năng nhạy cảm với proteaza. Phương pháp được tiến hành như sau, dịch lên men của chủng PD14 sau khi li tâm điều chỉnh về pH 6,5 được xử lí với các enzyme proteinase K, bromelin, papain, neutra H, trypsin, α -chymotrypsin pha trong đệm 20 mM TrisHCl pH7. Riêng pepsin pha trong đệm 0,002 N. Các enzyme này được pha ở nồng độ 2 mg ml⁻¹. Mẫu phản ứng được pha theo tỉ lệ 1 : 1 (enzyme: bacteriocin) [14, 15]. Các mẫu đối chứng âm chỉ có các enzyme, trong khi mẫu đối chứng dương gồm dịch nuôi cấy vi khuẩn và đệm 20 mM TrisHCl pH7 theo tỉ lệ (1:1). Các mẫu được ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Dừng phản ứng bằng tác động nhiệt, làm biến tính enzyme 100 °C trong 5 phút. Thử hoạt tính theo phương pháp khuếch tán trên thạch. Tại những mẫu không xuất hiện hay vòng vô khuẩn hoặc giảm nhiều so với mẫu đối chứng, có thể kết luận mẫu thí nghiệm đó là bacteriocin.

2.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại

Chủng PD14 được nuôi cấy trên môi trường MRS đặc, sau 18 - 24 giờ, tiến hành quan sát hình dạng khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa. Hình thái tế bào được quan sát trên tiêu bản nhuộm Gram, dưới vật kính dầu của kính hiển vi quang học Olympus CH-2 độ phóng đại 1000 lần và dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM). Trong những nghiên cứu về các đặc điểm hình

thái, sinh lí, sinh hóa cũng như hoạt tính đối kháng của chủng PD14, chủng chuẩn *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSMZ 20729 được sử dụng làm chủng so sánh.

Các đặc điểm đồng hóa nguồn cacbon của chủng PD14 được xác định bằng Kit API 50 CHB (BioMérieux, Pháp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.4. Phân tích trình tự đoạn gene 16S rARN

Tách ADN tổng số

Chủng PD 14 nuôi qua đêm trong môi trường MRS dịch thể ở 30°C, được ly tâm ở 10000 v/p, trong 10'. Sinh khối thu được hòa tan trong đệm TE và bổ sung dung dịch lysozyme, protease K và SDS 10 %. Sau khi ủ ở 37 °C trong 60', bổ sung hỗn hợp phenol: chloroform (24:1) tỉ lệ 2 : 1, lắc đều rồi ly tâm tách ADN tổng số theo mô tả bởi Sambrook và cộng sự [16].

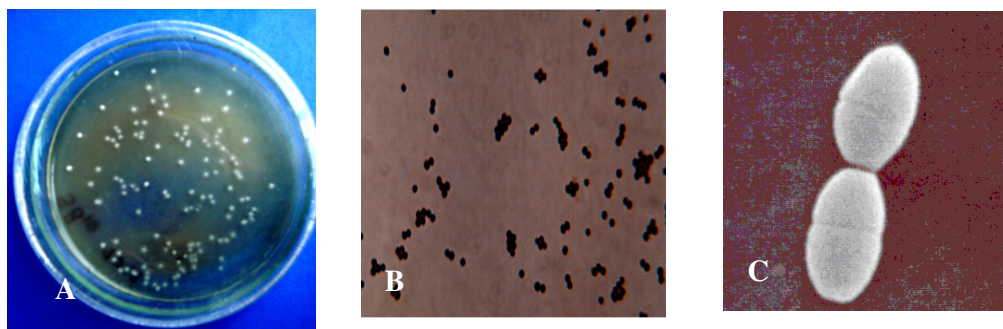
Nhân đoạn gen 16S rRNA: ADN tổng số của các chủng PD14 được dùng làm khuôn để nhân đoạn gen 1500 bp mã hóa cho 16S rARN. Hai cặp mồi gồm mồi xuôi 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và mồi ngược 16SR (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') được sử dụng trong nghiên cứu. Phản ứng PCR bao gồm đệm Taq polymerase (10x): 5 µl, dNTPs (10 mM): 2 µl, Dream Taq polymerase (5000 U/ml): 0,3 µl, mồi 16SF (10 pmol): 1 µl, mồi 16SR (10 pmol): 1 µl, DNA khuôn (20 ng): 2 µl, nước: 3 8,7 µl. Phản ứng trên được tiến hành theo chương trình sau (lặp lại 30 chu kì): 95 °C: 3 min, 95°C:1 min, 55 °C: 1 min, 68 °C: 1 min 15 sec, 70 °C: 7 min, 4 °C: ∞.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8 % và tinh sạch bằng Kit GeneJET™ Gel Extraction (Fermentas, Canada). Đọc trình tự trên máy ABI-377 Perkin Elmer tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm và công nghệ Gene, Viện Công nghệ Sinh học.

Trình tự gene 16S rARN của chủng PD14 được so sánh với các trình tự đã công bố trên GenBank. Từ kết quả đó xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng các phần mềm Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) và TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa và khả năng kháng khuẩn



Hình 1. A: Hình dạng khuẩn lạc, B: Ảnh nhuộm Gram dưới kính hiển vi Olympus CH - 2 độ phóng đại 1000 lần, C: hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử (10.000 X) chủng PD14.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa của chủng *Lactococcus* PD14.

Đặc điểm sinh học	Chủng PD14	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DSMZ 20729
Tế bào - Hình dạng - Kích thước - Sắp xếp tế bào - Gram	Oval 0,5 × 1,5 µm Sắp đôi +	Oval 0,5 × 1,5 µm Sắp đôi +
Đặc điểm sinh lí - Khả năng di động - Hô hấp tùy tiện - Khả năng sinh bào tử - Dạng đồng phân acidlactic - Sinh trưởng ở: 25°C 30°C 37°C 45°C	- Vi hiếu khí - L-acid lactic + +++ ++ -	- Vi hiếu khí - L-acid lactic + +++ ++ -
Đặc điểm sinh hóa - Hoạt tính catalase - Sinh khí từ glucose	- -	- -
Hoạt tính đối kháng <i>L. plantarum</i> JCM 1149 <i>L. algilis</i> JCM 1048 <i>L. salivarius</i> JCM 1230 <i>E. faecium</i> JCM 5804 <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC19258 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 <i>Escheria coli</i> ATCC4157 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 33015 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 21778 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1911	+ + + + + + - + + + + +	+ + + + + + - + ± + +

Chú thích: -: âm tính

±: dương tính yếu

+: dương tính

Chủng PD14 có vòng kháng khuẩn lớn nhất được tiến hành nghiên cứu quan sát hình dạng khuẩn lạc và hình thái tế bào dưới kính hiển vi thường và điện tử được mô tả tóm tắt tại bảng 1 và hình 1. Ngoài ra ở bảng 1 còn thể hiện các đặc điểm của loài *L. lactis* DSMZ 20729 giúp cho việc so sánh thuận lợi hơn.

Từ những nghiên cứu tính chất của bacteriocin đến việc xác định các đặc điểm về sinh lí sinh hóa của chủng PD14 cho thấy, hầu hết tất cả các điểm đều tương đồng với chủng chuẩn *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSMZ 20729. Mặc dù vậy, để định tên chính xác đến loài, đặc biệt với loài có nhiều dưới loài như *Lactococcus lactis*, sự kết hợp bổ sung cả phương pháp phân loại nhờ Kit chuẩn sinh hóa API 50 CHL và phương pháp sinh học phân tử sẽ cho kết quả tin cậy hơn.

3.2. Khả năng đồng hóa nguồn cacbon của chủng *Lactococcus* PD14

Bảng 2. Khả năng sử dụng nguồn cacbon của chủng PD14.

STT	Nguồn cacbon	Lên men	STT	Nguồn cacbon	Lên men
0	Đôi chứng	-	25	Esculine	+
1	Glycerol	-	26	Salicine	+
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L- Arabinose	+	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	+
6	D-Xylose	+	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	+
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β -Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	+	35	D-Raffinose	$\pm$
11	D-Glucose	+	36	Amidon	+
12	D-Fructose	+	37	Glycogene	-
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	β -Gentiobiose	+
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	$\pm$
18	Mannitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	α -Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α -Methyl-D-glucoside	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl glucosamine	+	47	Gluconate	+
23	Amygdaline	+	48	2-ceto-gluconate	-
24	Arbutine	+	49	5-ceto-gluconate	-

Chú thích: -: âm tính

$\pm$: dương tính yếu

+: dương tính

Kết quả phân loại nhờ Kit chuẩn sinh hóa API 50 CHL đối chiếu với dữ liệu phần mềm APILAB Plus version 4.0 cho thấy mức độ tương đồng giữa chủng PD14 với loài *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* là $ID \geq 99,0 \%$. Kết quả này được trình bày ở bảng 2.

3.3. Nhạy cảm với enzym phân hủy protein của bacteriocin chủng PD14

Bacteriocin có bản chất là protein hay peptit, vì vậy sẽ phải nhạy cảm với ít nhất một enzym phân hủy protein. Tính nhạy cảm với enzym phân hủy protein là một tiêu chí quan trọng để xác định chất kháng khuẩn bản chất là bacteriocin [6, 7]. Bảng 3 là kết quả xử lý mẫu dịch nuôi cấy có hoạt tính đối kháng với vi sinh vật kiểm định *L. plantarum*.

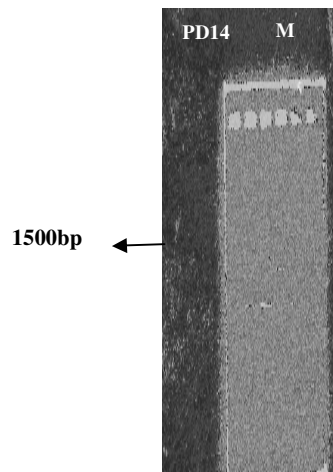
Bảng 3. Nhạy cảm với enzym phân hủy protein của bacteriocin chủng PD14.

TT	Enzym	Dịch nuôi cấy chủng PD14
		Hoạt tính còn lại (%)
1	Proteinase K	87
2	Papain	70
3	bromelin	74
4	Trypsin	100
5	Pepsin	65
6	α -chymotrypsin	0
7	Neutra H	82
8	Dịch nuôi cấy (đối chứng +)	100

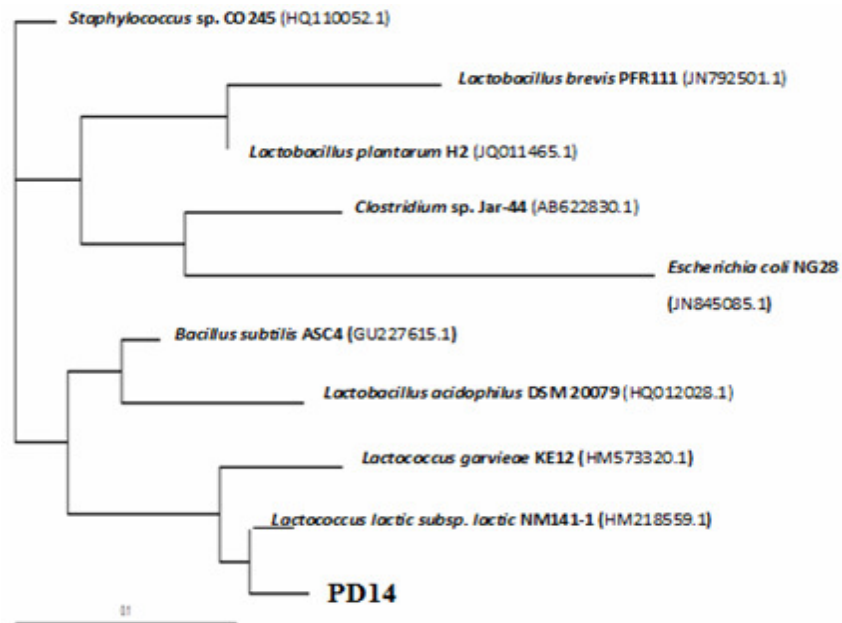
Kết quả ở bảng 3, cho thấy hoạt tính bacteriocin của đa số các mẫu đều giảm so với mẫu đối chứng. Đáng chú ý nhất ở mẫu số 6 bị mất hoạt tính ức chế hoàn toàn bởi tác động của α -chymotrypsin. Trong khi ở mẫu 4 xử lý với trypsin lại vẫn giữ nguyên hoạt tính bacteriocin. Kết quả này cũng trùng với kết quả nghiên cứu về nisin đã công bố trước đây [11, 12, 15]. Những bằng chứng này khẳng định bản chất tính kháng khuẩn của chủng PD14 là bacteriocin.

3.4. Phân tích gene 16S rARN

Gene 16S rARN có tính bảo thủ cao, đặc trưng cho từng loại vi khuẩn. Bởi vậy trình tự của nó thường được sử dụng như một công cụ hữu hiệu để phân loại các chủng vi khuẩn đến loài. Kết quả sử dụng cặp mồi 16SF và 16SR để khuếch đại đoạn gene có kích thước 1500 bp mã hóa cho 16S rRNA cho sản phẩm PCR và được kiểm tra trên gel agarose 0,8 %. Kết quả cho 1 băng đặc hiệu duy nhất, có kích thước 1500 bp (hình 3).



Hình 3. Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA của chủng PD14, M: marker.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại chủng PD14.

Kết quả giải trình tự gene 16S rARN của chủng PD14 được phân tích bằng chương trình Chromas. Sử dụng chương trình Clustalw để so sánh trên GenBank. Kết quả cho thấy chủng PD14 có độ tương đồng 99,7 % với chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NM141-1 (HM218559.1). Từ kết quả này xây dựng được cây phát sinh chủng loại của chủng PD14 (hình 4). Chủng này có trình tự tương đồng 99,7% đối với *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

4. KẾT LUẬN

Chủng *Lactococcus* PD14 có hoạt tính bacteriocin cao phổ kháng khuẩn rộng chủ yếu tác dụng với các vi khuẩn Gram dương, trong đó đặc biệt ức chế mạnh nhóm vi khuẩn gây bệnh, gây ngộ độc thực phẩm như *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*. Khi xử lý với các enzym phân hủy protein, bị mất hoạt tính hoàn toàn với α -chymotrypsin, đặc biệt giữ nguyên hoạt tính với hoạt tính với trypsin, còn lại 65 % với pepsin.

Những nghiên cứu về đặc điểm hình thái tế bào cũng như các đặc điểm về sinh lý, sinh hóa kết hợp với sinh học phân tử cho thấy chủng *Lactococcus* PD14 thuộc về dưới loài *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Riley M. A., Chavan M. A. - Bacteriocins Ecology and Evolution, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
2. Cleveland J., Montville T. M., Nes I. F., Chikindas M. L. - Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, Int. J. Food Microbiol **71** (2001) 1-20.
3. Dimov S. G. - A novel bacteriocin - like substance produced by *Enterococcus faecium* 3587, Current Microbiology **55** (2007) 323-327.
4. Diop M.B., Dubois- Dauphin R., Tine E., Ngom A., Destain J., et al. - Bacteriocin producers from traditional food products, Biotechnol. Agron. Soc. Environ, **11** (4) (2007) 275-281.
5. Delves-Broughton J. - Nisin as a food preservative, Food Australia, **57** (2005) 525 - 527.
6. Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A. - Lactic Acid Bacteria, 2004.
7. Reunanen J. - Lantibiotic nisin and its detection methods, 2007.
8. Chen H., Hoover D. G. - Bacteriocins and their food applications, Comprehensive reviews in food science and food safety **2** (2003) 82-100.
9. Teuber M. - The genera of Lactic Acid Bacteria **6** (3) (2003) 173-200.
10. Ferchichi M., Frère J., Mabrouk K., Manai M. - Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product, FEMS Microbiol. Lett **205** (2001) 49-55.
11. Rajaram G., Manivasagan P., Thilagavathi B., Saravanakuma A. - Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* isolated from Marine Environment, Advance Journal of Food Science and Technology **2**(2) (2010) 138-144.
12. Hadda Ouzari, Afef Najjari, Houda Amairi, Maher Gtari, Abdenaceur Hassen and Abdellatif Boudabous, - Comparative analysis of *Lactococcus lactis* bacteriocins and preliminary characterisation of a new proteinase K resistant lactococcin member", Annals of Microbiology **58** (1) (2008) 83-88, DOI: 10.1007/BF03179449.
13. Hoa T. M. Tu, Nguyen Thi Da, Le Hue Anh and Le Thanh Binh - Screening Lactic Acid Bacteria Producing bacteriocins from cow's raw milk and fecal, Tạp chí khoa học và Công nghệ **47** (3) (2009) 29-38.
14. De Vuyst L., Leroy F. - Bacteriocin from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications, J. Mol. Microbial. Biotechnol **13** (2007) 194-199

15. Leitão, Izildinha Moreno, Alda L.S. Lerayer, Vera L.S. Baldini, Mauro F. de F. - characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains, Brazilian Journal of Microbiology Print ISSN 1517-8382 Braz. J. Microbiol **31** (3) (2000).
16. Russell, Joseph Sambrook and David W. - Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform, Appendix 8, in Molecular Cloning, by Joseph Sambrook and David W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA Volume 3, 3rd edition, 2001.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *LACTOCOCCUS* PD14 PRODUCING BACTERIOCIN

Hoa Thi Minh Tu¹, Nguyen La Anh² and Le Thanh Binh¹

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

² *Food Industrial Research Institute, Ministry Of Industry and Trade*

*Email: hoathiminhtu@gmail.com

The strain PD14 was isolated from cow's fresh milk of Phu Dong farm, Gialam, producing a bacteriocin at high level and its properties are very similarity to nisin. The inhibition activity determination of the strain PD14 to test- microorganism showed that the crude extract exhibited strongly against *Lactobacillus plantarum* JCM1149. Study the effects of various proteolytic enzymes on antibacterial activity revealed the raw bacteriocin was completely inactivated by α -chymotrypsin and the activity remained to 100 % in case of trypsin and 65 % by pepsin. The amplification and sequence analysis of gene 16S rRNA combined with morphological characterization and biochemical tests by API 50 CHL demonstrate strongly the strain PD14 belongs to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Keywords: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, bacteriocin, nisin.