

Phân lập và tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. được phân lập trên da người

Bùi Hoàng Đăng Long*, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Huỳnh Xuân Phong,
Phạm Thúy Vi, Nguyễn Ngọc Thanh

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

Ngày nhận bài 1/4/2019; ngày chuyển phản biện 5/4/2019; ngày nhận phản biện 20/5/2019; ngày chấp nhận đăng 29/5/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập các chủng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ da người, tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. đã phân lập và xác định điều kiện thích hợp nuôi cấy vi khuẩn lactic này bằng môi trường nước chua tàu hũ. Kết quả đã phân lập được hai chủng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. (PO và PM) là vi khuẩn Gram dương, tế bào hình que ngắn, không di chuyển, khuẩn lạc tròn, bìa nguyên và răng cưa, oxidase dương tính, catalase âm tính. Trong thử nghiệm kháng khuẩn, 10 chủng vi khuẩn lactic đều có khả năng sinh bacteriocin ức chế vi khuẩn *Propionibacterium* spp. Trong đó, chủng L39 có khả năng kháng khuẩn tốt nhất với đường kính vòng kháng PO và PM đạt lần lượt là 10,16 và 14,16 mm. Điều kiện thích hợp để tăng sinh vi khuẩn lactic bằng nước chua tàu hũ tạo chất kháng khuẩn được xác định ở môi trường bổ sung sucrose 2% (w/v), peptone 1% (w/v) và K_2HPO_4 2% (w/v), hàm lượng đường từ 5,73-5,87% (w/v), pH 6,09-6,14 và mật số giống chủng 10^7 (tế bào/ml). Ở điều kiện thích hợp trên quy mô 2 lít, chủng L39 có khả năng kháng vi khuẩn chỉ thị với đường kính vòng kháng chủng PO và PM đạt 11,33 và 5,5 mm. Kết quả giải trình tự 16S rRNA cho thấy, chủng vi khuẩn PO và L39 tương đồng với *Propionibacterium acnes* DNF00413 với độ tương đồng 99% và *Lactobacillus plantarum* 7.11E với độ tương đồng 98%.

Từ khóa: bacteriocin, điều kiện thích hợp, kháng khuẩn gây mụn, nước chua tàu hũ, vi khuẩn lactic.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm vi sinh vật được phát hiện, ứng dụng và phát triển gắn liền với công nghệ lên men thực phẩm [1]. Vi khuẩn lactic có khả năng biến đổi đường thành các sản phẩm có ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, trong đó có acid lactic và bacteriocin, nhóm protein kháng khuẩn.

Nghiên cứu về bacteriocin là một trong những hướng đi nhằm đối phó với tình trạng đề kháng kháng sinh tổng hợp gây ra bởi thực trạng lạm dụng thuốc kháng sinh ở hầu hết các quốc gia đang phát triển trên thế giới [2]. *Propionibacterium* spp. được xem là một trong các nguyên nhân gây ra mụn trứng cá. Liệu pháp kháng sinh trong điều trị mụn trứng cá thường kéo dài nhiều tháng và sự thất bại trong điều trị có liên quan đến chủng *Propionibacterium* spp. kháng thuốc [3]. Đặc tính đề kháng kháng sinh của *Propionibacterium* spp. được xem là một trong các nguyên

nhân gây ra mụn trứng cá.

Trước viễn cảnh trên, việc điều trị bằng các biện pháp thay thế mang tính bền vững như vi khuẩn đối kháng vi khuẩn và ứng dụng bacteriocin, một nhóm kháng sinh tự nhiên, đang ngày càng được quan tâm. Về bản chất, bacteriocin là nhóm chất kháng khuẩn có tính đặc hiệu, ít gây đề kháng và không mang tác dụng phụ cho con người [4]. Tuy nhiên, để có thể thu nhận bacteriocin, cần thiết phải chọn lựa những chủng vi khuẩn có hiệu suất tổng hợp cao tiến tới sản xuất bằng kỹ thuật sinh học với các chủng mới thích hợp cho sản xuất công nghiệp.

Nước chua tàu hũ là sản phẩm của công nghệ lên men lâu đời tại nước ta. Nước chua tàu hũ có chứa isoflavon, oligosaccharide, peptide và saponin vốn tương đồng các thành phần protein, đường và dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật [5]. Việc ứng dụng nước chua tàu hũ trong sản xuất sinh khối vi khuẩn lactic có tiềm năng

*Tác giả liên hệ: bhdlong@ctu.edu.vn

Isolation and optimisation for culture conditions of lactic acid bacteria for antibacterial properties against *Propionibacterium* spp. isolated from human skin

Hoang Dang Long Bui*, Thi Tuyet Mai Nguyen, Xuan Phong Huynh, Thuy Vi Pham, Ngoc Thanh Nguyen
Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

Received 1 April 2019; accepted 29 May 2019

Abstract:

This study aimed to isolate strains of *Propionibacterium* spp. from human skin, select lactic acid bacteria having antibacterial properties against the isolated *Propionibacterium* spp. strains, and identify the suitable conditions to culture lactic acid bacteria from tofu sour liquid. As a result, the two strains of *Propionibacterium* spp. were isolated (PO and PM), which had following properties: Gram-positive, rod shape, non-mobilized, round colony with entire or undulate margin, positive oxidase and negative catalase activities. In antibacterial property test, the L39 strain of lactic acid bacteria produced the largest antibacterial zone with the zone diameters against PO and PM at 10.16 mm and 14.16 mm, respectively. In tofu sour liquid, the suitable culture conditions for the antibacterial property of the strain L39 were determined with the addition of 2% (w/v) sucrose, 1% (w/v) peptone and 2% (w/v) K_2HPO_4 , 5.73-5.87% (w/v) sugar content, pH 6.09-6.14, and inoculum density at 10^7 (cell/ml). At the suitable conditions in 2-litre scale, L39 could produce 11.33 and 5.5 mm inhibitory zones against the indicator strains PO and PM. Strains PO and L39 were molecularly identified as *Propionibacterium acnes* DNF00413 with 99% identity and *Lactobacillus plantarum* 7.11E with 98% identity, respectively.

Keywords: antibacterial, bacteriocin, lactic acid bacteria, suitable conditions, tofu sour liquid.

Classification number: 3.5

làm giảm giá thành sản xuất. Xác định được điều kiện tối ưu để nuôi cấy sao cho sinh khối vi khuẩn thu được có khả năng kháng khuẩn tốt mang tính quyết định đến ứng dụng và chuyển giao công nghệ.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tìm được chủng vi khuẩn gây ra mụn *Propionibacterium* spp. trên da và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic cùng điều kiện nuôi cấy chúng trên môi trường nước chua tàu hủ cho khả năng sinh ra bacteriocin tốt để ức chế hoạt động của vi khuẩn *Propionibacterium* spp., qua đó hỗ trợ điều trị bệnh da liễu.

Nội dung nghiên cứu

Đối tượng và phương pháp

Mười chủng vi khuẩn lactic được phân lập, tuyển chọn và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn lactic được nuôi cấy bằng môi trường MRS (De Man, Rogosa và Sharpe, Merck) [6].

Mẫu nhân mụn được thu trên 5 tình nguyện viên nhằm phân lập vi khuẩn *Propionibacterium* spp. bằng cách phân lập trên môi trường BHI (Brain Heart Infusion, Merck) và được nuôi cấy trong môi trường TSB và TSA (Tryptic Soy Broth và Tryptic Soy Agar, Merck). Mẫu nước chua tàu hủ được thu tại cơ sở sản xuất tương chao Vĩnh Trân (phường An Hòa, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ).

Phân lập và định danh vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ da người

Phân lập vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ mẫu nhân mụn: tiến hành sát khuẩn xung quanh vị trí mụn trên da với ethanol 70% (v/v). Dùng dụng cụ nặn mụn thu mẫu nhân mụn từ da mặt của 5 tình nguyện viên và tăng sinh trong 100 ml môi trường BHI broth trong 72 giờ ở điều kiện kỵ khí. Tiến hành cấy trải lặp đi lặp lại nhiều lần trên đĩa chứa môi trường BHI agar đến khi thu được khuẩn lạc thuần. Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho vi khuẩn *Propionibacterium* spp.

Xác định các đặc tính sinh lý sinh hoá các chủng phân lập (nhằm xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn đã phân lập): các chủng vi khuẩn thuần có hình que, không chuyển động được chọn mẫu nhân mụn, sau đó tiến hành nhuộm Gram, thử catalase, oxidase để xác định các chủng vi khuẩn phân lập được thuộc nhóm vi khuẩn *Propionibacterium* spp.

Định danh vi khuẩn *Propionibacterium* spp. tuyển chọn được: qua kết quả định danh sơ bộ chọn được chủng

vi khuẩn có đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa phù hợp với các đặc tính của các loài thuộc chi *Propionibacterium* spp. Mẫu được gửi định danh ở Malaysia với cặp mồi được sử dụng để khuếch đại 16S RNA vi khuẩn bao gồm 27F: 5'-ACGGTTACCTTGTACGACT-3' và 1492R 5'-AGAGTTTGATCCT GGCTC-3' [7].

Khảo sát khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp. của vi khuẩn lactic

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic (nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng khuẩn và sinh bacteriocin tốt): tính kháng khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch [8]. Vi khuẩn chi thị *Propionibacterium* spp. được phân lập và xác định với các đặc tính sinh lý sinh hoá phù hợp. Chủng chi thị *Propionibacterium* spp. đã phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB trong 72 giờ đến mật số 10^7 tế bào/ml. Trải 50 μ l dịch môi trường nuôi cấy trên đĩa môi trường TSA. Tạo những giếng nhỏ có đường kính 5 mm với thanh kim loại vô trùng. Chuẩn bị dịch bacteriocin thô từ 10 chủng vi khuẩn lactic bằng cách ly tâm (10.000 vòng/phút, 15 phút) dịch tăng sinh vi khuẩn lactic sau khi nuôi ở môi trường MRS broth trong 48 giờ. Thu phần dịch sau ly tâm và chuẩn độ pH đến 6,5 bằng NaOH 0,1N. Cho 80 μ l dịch bacteriocin thô nhỏ vào mỗi giếng của đĩa thạch đã cấy trải vi khuẩn chi thị và ủ ở 37°C trong 48 giờ. Ghi nhận sự hình thành vòng kháng khuẩn xung quanh các giếng trên đĩa thạch.

Giải trình tự và định danh vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn tốt: trình tự gene 16S RNA của chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất đã tuyển chọn được khuếch đại bằng cặp mồi 27F và 1492R. Mẫu khuếch đại được giải trình tự tại Đại học Kyushu (Nhật Bản). Trình tự được giải được so sánh đối chiếu với cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information, Hoa Kỳ) sử dụng công cụ nucleotide BLAST.

Điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic trên nước chua tàu hủ cho khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp.

Nguồn carbon, nitơ và khoáng thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng vi khuẩn lactic từ nước chua tàu hủ: chủng 1 ml dịch tăng sinh vi khuẩn lactic vào ống nghiệm chứa 9 ml môi trường nước chua tàu hủ có bổ sung các yếu tố dinh dưỡng: 2% (w/v) nguồn carbon (sucrose, glucose, maltose), 1% (w/v) nguồn nitơ (peptone, tryptone, yeast extract) và 2% (w/v) nguồn khoáng (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4). Tăng sinh vi khuẩn trong 36 giờ và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch tăng sinh có bổ sung thành phần khác nhau tương tự [8].

Nồng độ giống chủng, hàm lượng đường và pH thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic: tăng sinh vi khuẩn lactic trong môi trường nước chua tàu hủ được bổ sung các thành phần đã xác định và điều chỉnh hàm lượng đường (5%, 6% và 7% w/v), nồng độ giống chủng (10^5 , 10^6 và 10^7 tế bào/ml), pH (5,0; 6,0 và 7,0). Thu dịch sau tăng sinh và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau theo phương pháp khuếch tán giếng thạch [8].

Khả năng nuôi cấy vi khuẩn lactic sinh chất kháng khuẩn từ nước chua tàu hủ ở quy mô 2 lít (nhằm kiểm tra tính thích ứng với điều kiện sản xuất quy mô phòng thí nghiệm): chuẩn bị dịch nước chua tàu hủ có bổ sung các thành phần carbon, nitơ và khoáng thích hợp xác định qua thí nghiệm trước. Điều chỉnh điều kiện pH và hàm lượng đường theo nghiệm thức thích hợp đã tuyển chọn. Chủng 1% (w/v) dịch tăng sinh vi khuẩn lactic (mật số 10^9 tế bào/ml) vào 2 lít dịch nước chua tàu hủ đã chuẩn bị và tiến hành tăng sinh trong 36 giờ. Thu mẫu dịch tăng sinh, ly tâm và tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn như các nội dung trên nhằm xác định khả năng kháng khuẩn.

Các số liệu về đường kính vòng kháng khuẩn của mỗi chủng *Lactobacillus* spp. được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion version XV để tìm sự khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức.

Kết quả và thảo luận

Phân lập và định danh vi khuẩn *Propionibacterium* spp. từ da người

Kết quả phân lập 8 mẫu nhân mụn thu từ các tỉnh nguyên viên đã thu được 4 chủng có đặc điểm hình thái đặc trưng của vi khuẩn *Propionibacterium* spp, gồm PO, PI, PL và PM.

Trên môi trường TSB agar ủ ở 37°C sau 72 giờ nuôi cấy, tất cả các chủng có dạng khuẩn lạc hình tròn, bìa răng cưa (chủng PL, PM, PI) và bìa nguyên (chủng PO). Khuẩn lạc màu trắng đục, bóng, khuẩn lạc lồi (chủng PL, PI) hoặc khuẩn lạc mô cao (PO, PM). Kích thước khuẩn lạc 5,0x1,0 mm (chủng PI, PM và PL) và 0,5x1,0 mm (chủng PO). Tế bào hình que, kích thước khoảng 1,0x5,0 μ m (chủng PI, PL, PM) và 0,6x5,0 μ m (chủng PO). Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được tổng hợp ở bảng 1 cho thấy phù hợp với công bố của một số nghiên cứu về đặc điểm của chi *Propionibacterium* spp. [9, 10]. Trong các nghiên cứu này, *Propionibacterium* spp. có khuẩn lạc dạng hình tròn, bìa răng cưa, bìa nguyên, tế bào có dạng hình que, không có khả năng di động, không hình thành bào tử.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập.

STT	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm sinh hóa			Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc điểm tế bào		
		Gram	Oxidase	Catalase	Màu sắc	Hình dạng	Bia	Độ nổi	Khả năng di động	Hình thái tế bào
1	PL	-	+	-	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Lài	-	Que ngắn
2	PI	+	+	+	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Lài	-	Que ngắn
3	PO	+	+	-	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	-	Que ngắn
4	PM	+	+	-	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Lài	-	Que ngắn

*Chú thích: (-) không di động.

Đặc tính sinh hoá tế bào cho thấy hai chủng PO và PM là vi khuẩn Gram dương, có hoạt tính catalase nhưng không có hoạt tính oxidase. Các đặc điểm này phù hợp với miêu tả đặc tính sinh hoá tế bào vi khuẩn *Propionibacterium* spp. như mô tả của Amini và Richetti (2015): vi khuẩn Gram dương, kỵ khí không tạo bào tử [11]. Theo Butler-Wu (2011) và Ulrika (2012), *Propionibacterium* spp. là nhóm vi khuẩn kỵ khí có hoạt tính catalase và không có enzyme oxidase [12, 13]. Hơn nữa, các đặc tính sinh hóa của các chủng PO và PM phân lập phù hợp với vi khuẩn *Propionibacterium* spp. theo khóa phân loại của Bergey với các đặc tính cơ bản bao gồm: vi khuẩn Gram dương, có hình que, có enzyme catalase và không có hoạt tính oxidase [14]. Vì vậy, có thể kết luận được rằng 2 chủng vi khuẩn PO và PM phân lập được từ các mẫu nhân mụn trên da thuộc chi *Propionibacterium*.

Chủng PO có tổng số nucleotide được giải là 634 và cho kết quả đồng hình với chủng *Propionibacterium acnes* DNF00413 tỷ lệ 99%, không có vị trí bị ngắt quãng trên chuỗi, mức độ sai lệch không đáng kể (1%).

Khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp. của vi khuẩn lactic

Hoạt tính kháng khuẩn và sinh bacteriocin của các chủng vi khuẩn lactic: tất cả 10 chủng vi khuẩn lactic được kiểm tra khả năng hình thành bacteriocin bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch (bảng 2), tính kháng khuẩn được biểu hiện khi đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn 5 mm [15]. Mười chủng vi khuẩn lactic đã phân lập đều có khả năng tạo vòng vô khuẩn ức chế vi khuẩn *Propionibacterium* spp., trong đó chủng L39 tạo đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất là 10,16 mm đối với chủng PO và 14,16 mm đối với chủng PM.

Bảng 2. Khả năng ức chế vi khuẩn *Propionibacterium* spp. của các chủng LAB.

LAB	Đường kính vòng kháng khuẩn PO ¹ (mm)	Đường kính vòng kháng khuẩn PM ¹ (mm)	LAB	Đường kính vòng kháng khuẩn PO ¹ (mm)	Đường kính vòng kháng khuẩn PM ¹ (mm)
L26	5,50 ^d	6,50 ^d	L52	6,00 ^d	5,50 ^{ef}
L2	5,50 ^d	5,16 ^f	L37	7,50 ^c	6,00 ^{de}
L30	5,83 ^d	8,00 ^c	L7	8,50 ^b	5,50 ^{ef}
L11	6,00 ^d	13,33 ^b	L54	9,16 ^b	13,33 ^b
L9	6,00 ^d	13,16 ^b	L39	10,16 ^a	14,16 ^a
CV (%)	6,76	4,50	CV (%)	6,76	4,50

Ghi chú: ¹Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%.

Định danh vi khuẩn lactic có khả năng kháng *Propionibacterium* spp: kết quả giải trình tự và truy vấn cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy trình tự chủng L39 tương đồng với *L. plantarum* chủng 7.11E với mức tương đồng 98%. Khi khảo sát các đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hoá tế bào của chủng L39 sau phân lập cho thấy, chủng L39 là trực khuẩn Gram dương, không có hoạt tính oxidase và catalase, có khả năng sinh acid phân giải CaCO₃ [16]. So với đặc điểm sinh hoá, kết quả giải trình tự tương đồng với vi khuẩn *L. plantarum* là phù hợp. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu đi trước trên *L. plantarum* là loài vi khuẩn lactic có tiềm năng sinh chất kháng khuẩn mạnh như acid hữu cơ, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocin [17, 18].

Điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic trên nước chua tàu hũ cho khả năng kháng khuẩn *Propionibacterium* spp.

Nguồn carbon, nitơ và khoáng thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng *L. plantarum* L39 từ nước chua tàu hũ: kết quả cho thấy, đường kính vòng kháng khuẩn đạt cao nhất ở nghiệm thức 2 khi môi trường nước chua tàu hũ bổ sung sucrose 2% (w/v), peptone 1% (w/v) và K₂HPO₄ 2% (w/v) (bảng 3). Tính kháng khuẩn yếu khi môi trường bổ sung maltose 2% (w/v) và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này tương ứng với thí nghiệm của Todorov về khả năng sinh chất kháng khuẩn biến động theo hàm lượng và thành phần carbon của môi trường ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của tế bào vi khuẩn [19]. Trong thí nghiệm của Todorov, *Lactobacillus* spp. không sinh nhiều bacteriocin ST22Ch khi môi trường được bổ sung maltose và gluconate.

Bảng 3. Tác động của nguồn carbon, nitơ và khoáng thích hợp cho sinh chất kháng khuẩn của vi khuẩn lactic từ nước chua tàu hủ.

STT	Nhiệm thức	Đường kính vòng kháng khuẩn chủng PO (mm) ¹	STT	Nhiệm thức	Đường kính vòng kháng khuẩn chủng PO (mm) ¹
1	Glucose-Peptone-K ₂ HPO ₄	10,83 ^{bc}	15	Maltose-Tryptone-MgSO ₄	0,00 ^k
2	Glucose-Peptone-KH ₂ PO ₄	6,67 ^{ghi}	16	Maltose-Yeast Extract-K ₂ HPO ₄	0,00 ^k
3	Glucose-Peptone-MgSO ₄	0,00 ^k	17	Maltose-Yeast Extract-KH ₂ PO ₄	6,00 ^{ghi}
4	Glucose-Tryptone-K ₂ HPO ₄	9,50 ^{cd}	18	Maltose-Yeast Extract-MgSO ₄	11,33 ^{ab}
5	Glucose-Tryptone-KH ₂ PO ₄	11,17 ^{ab}	19	Sucrose-Peptone-K ₂ HPO ₄	12,67 ^a
6	Glucose-Tryptone-MgSO ₄	7,33 ^{ghi}	20	Sucrose-Peptone-KH ₂ PO ₄	9,00 ^{bc}
7	Glucose-Yeast Extract-K ₂ HPO ₄	7,50 ^{de}	21	Sucrose-Peptone-MgSO ₄	0,00 ^k
8	Glucose-Yeast Extract-KH ₂ PO ₄	0,00 ^k	22	Sucrose-Tryptone-K ₂ HPO ₄	5,50 ^j
9	Glucose-Yeast Extract-MgSO ₄	6,67 ^{ghi}	23	Sucrose-Tryptone-KH ₂ PO ₄	0,00 ^k
10	Maltose-Peptone-K ₂ HPO ₄	6,33 ^{ghi}	24	Sucrose-Tryptone-MgSO ₄	5,83 ^{ji}
11	Maltose-Peptone-KH ₂ PO ₄	6,67 ^{ghi}	25	Sucrose-Yeast Extract-K ₂ HPO ₄	7,67 ^{de}
12	Maltose-Peptone-MgSO ₄	7,33 ^{ghi}	26	Sucrose-Yeast Extract-KH ₂ PO ₄	5,83 ^{ji}
13	Maltose-Tryptone-K ₂ HPO ₄	9,50 ^{cd}	27	Sucrose-Yeast Extract-MgSO ₄	0,0 ^k
14	Maltose-Tryptone-KH ₂ PO ₄	9,833 ^{bcd}			

Ghi chú: ¹Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các ký tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%; CV=12,97 (%).

Kết quả cho thấy, nhiệm thức tối ưu được xác định ở môi trường có bổ sung sucrose là nguồn carbon chính cũng phù hợp với nghiên cứu gần đây của Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhật trên môi trường chứa 2% w/v sucrose [20]. Về tính kinh tế, sucrose có nhiều trong các nhóm sản phẩm đường sản xuất như đường mía và đường củ cải vốn đa dạng về nguồn cung. Giá thành rẻ giúp sản xuất hoạt chất sinh học như bacteriocin ở quy mô công nghiệp có tính khả thi cao hơn. Từ đó, việc thích ứng với đường sucrose giúp tăng tiềm năng ứng dụng chủng *L. plantarum* L39 trong thực tế. Nguồn đạm phổ biến như peptone được sản xuất từ nhiều nguyên liệu khác nhau có giá thành rẻ, dễ sản xuất và có tính khả thi khi ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Peptone cũng là một trong những thành phần của môi trường MRS nên có khả năng tương tác tốt trong chính môi trường của nó. So với các nguồn khoáng khác, kết quả thí nghiệm cho thấy K₂HPO₄ có khả năng hỗ trợ sinh bacteriocin tốt nhất cho *Lactobacillus* spp. tương tự kết quả nghiên cứu của Todorov và Dicks, mức sản xuất bacteriocin của chủng *L. plantarum* ST23LD khi môi trường bổ sung 0,2, 0,5 và 1,0 g/l KH₂PO₄ cao hơn khi bổ sung 0,2 g/l K₂HPO₄ [21].

So với tăng sinh kháng khuẩn trong môi trường MRS với đường kính vòng kháng *B. subtilis* của *L. plantarum* L54 (13,67 mm) [22], đường kính vòng kháng khuẩn sinh ra khi nuôi cấy chủng *L. plantarum* L39 trong môi trường

nước chua tàu hủ bổ sung sucrose-peptone-K₂HPO₄ (12,67 mm) là thấp hơn. Thực tế, MRS là môi trường chuyên nuôi cấy *Lactobacillus* spp. với các thành phần dinh dưỡng chọn lọc đặc biệt phù hợp với giá thành cao. Việc tận dụng nước chua tàu hủ là nguồn phụ phẩm phẩm trong nuôi cấy chủng *L. plantarum* L39 mang tính kinh tế và bảo vệ môi trường với đường kính kháng khuẩn thấp hơn (12,67 mm so với 13,67 mm của MRS) là chấp nhận được.

Các nhiệm thức 19, 20, 21, 23 và 26 cũng sử dụng sucrose như nhiệm thức tối ưu nhưng lại không tạo chất kháng khuẩn. Tương tự, nhiệm thức 23 và 24 đối với peptone và nhiệm thức 27 đối với K₂HPO₄ cũng không tạo chất kháng khuẩn mặc dù đơn lẻ sử dụng các thành phần như nhiệm thức tối ưu. Bên cạnh đó, khả năng sinh chất kháng khuẩn theo thành phần và điều kiện môi trường của *Lactobacillus* spp. là sự phản ứng của biểu hiện gene, kích thích sản xuất protein kháng khuẩn. Vì vậy, việc tối ưu hoá một số yếu tố như hàm lượng đường, pH và mật số giống chủng ở nội dung tiếp theo có thể giúp cải thiện khả năng tạo bacteriocin của *L. plantarum* L39.

Nồng độ giống chủng, hàm lượng đường và pH thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng *L. plantarum* L39 được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ giống chủng, hàm lượng đường và pH thích hợp cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng L39.

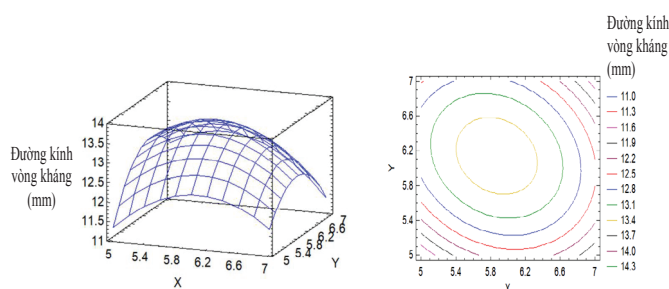
STT	Hàm lượng đường % (w/v)-pH-Mật số chủng (log tế bào/ml)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PO ¹ (mm)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PM ¹ (mm)	STT	Hàm lượng đường % (w/v)-pH-Mật số chủng (log tế bào/ml)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PO ¹ (mm)	Đường kính trung bình vòng kháng khuẩn chủng PM ¹ (mm)
1	5-5-5	10,50	5,50	15	6-6-7	13,00	8,33
2	5-5-6	10,67	6,17	16	6-7-5	10,50	7,16
3	5-5-7	11,00	6,33	17	6-7-6	12,67	7,50
4	5-6-5	12,00	7,50	18	6-7-7	14,00	8,50
5	5-6-6	12,00	8,17	19	7-5-5	10,33	7,50
6	5-6-7	15,33	7,17	20	7-5-6	12,17	6,83
7	5-7-5	11,33	6,00	21	7-5-7	11,83	7,00
8	5-7-6	12,33	6,67	22	7-6-5	12,17	7,33
9	5-7-7	11,33	6,33	23	7-6-6	12,83	6,83
10	6-5-5	12,00	5,33	24	7-6-7	11,17	5,67
11	6-5-6	11,83	6,17	25	7-7-5	11,67	5,50
12	6-5-7	13,00	6,67	26	7-7-6	12,67	5,50
13	6-6-5	13,00	7,16	27	7-7-7	11,17	5,50
14	6-6-6	13,67	8,50				

Ghi chú: ¹Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Số liệu của thí nghiệm được ghi nhận và phân tích bằng phần mềm thống kê Statgraphic Centurion XV nhằm thiết lập phương trình hồi quy nhiều biến (hình 1 và hình 2), dựa

vào phương trình này có thể xác định được nghiệm thức tối ưu cho việc sản xuất bacteriocin từ chủng *L. plantarum* L39 kháng chủng chỉ thị.

Khả năng kháng khuẩn chủng PO: đồ thị mặt đáp ứng và đồ thị đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn chủng PO (hình 1) của vi khuẩn lactic cho thấy, với hàm lượng đường 5,87% (w/v), pH 6,14 và mật số giống chủng log 7 (10^7 tế bào/ml) là điều kiện tối ưu cho khả năng sinh chất kháng khuẩn kháng chủng chỉ thị. Đường kính vòng kháng theo kiểm chứng đạt 14,00 mm. Điều kiện dinh dưỡng theo nghiệm thức tối ưu cao hơn so với kết quả nghiệm thức 19 ở bảng 3 (12,67 mm). Kết quả kháng khuẩn cũng tương ứng với nghiên cứu gần đây của Sabrina Sabo và cộng sự, khi cải thiện sản xuất bacteriocin từ vi khuẩn *L. plantarum* ST16Pa từ phế phẩm sữa bột, hoạt tính kháng khuẩn kháng *Literia innocua* 6A CLIST2865 với đường kính 13,23 mm [23].



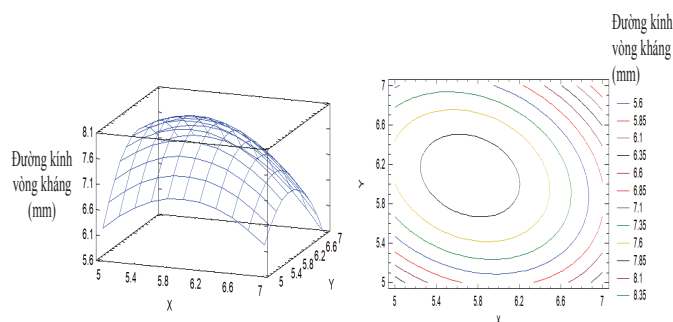
Hình 1. Đồ thị mặt đáp ứng và đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn PO theo mật độ giống chủng = log 7 tế bào/ml, hàm lượng đường = X và pH = Y.

$$\begin{aligned} \text{Đường kính vòng kháng khuẩn PO} = & -44,6111 + 5,87963 \cdot X - 2,43068 \cdot 10^{-11} \cdot 7 + 6,06481 \cdot Y - \\ & 0,861111 \cdot X \cdot X + 0,902778 \cdot X \cdot 7 + 0,972222 \cdot X \cdot Y - \\ & 0,416667 \cdot 7 \cdot 7 + 1,125 \cdot 7 \cdot Y - 0,972222 \cdot Y \cdot Y - \\ & 0,1875 \cdot X \cdot 7 \cdot Y. \end{aligned}$$

Nhiều nghiên cứu cho thấy, pH là yếu tố hết sức quan trọng đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Khalid kết luận sự tăng trưởng tối ưu cho LAB là ở mức pH acid nhẹ 5,0-6,0 [24]. Từ kết quả cho thấy, chủng *L. plantarum* L39 được kích thích sản xuất bacteriocin ở pH 6,14 là phù hợp với nghiên cứu trên.

Khả năng kháng khuẩn chủng PM: từ đồ thị mặt đáp ứng và đồ thị đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn PM (hình 2) của vi khuẩn lactic cho thấy, với hàm lượng đường X=5,73% (w/v), pH=6,09 và mật số giống chủng log 7 (tế bào/ml) là điều kiện tối ưu cho khả năng sinh chất kháng khuẩn kháng chủng chỉ thị PM. Vòng kháng khuẩn ở

nghiệm thức tốt nhất đạt 8,5 mm (bảng 4), kiểm chứng điều kiện tối ưu đạt đường kính 8,5 mm. So với nghiên cứu đi trước về nuôi cấy trên môi trường MRS trên *L. plantarum* kháng *B. subtilis* tạo đường kính vòng kháng đạt 10,33 mm [25], kết quả này thấp hơn. Tuy nhiên, việc sử dụng nước chua tàu hủ để nuôi cấy vi khuẩn lactic mang lại ý nghĩa về kinh tế hơn so với môi trường MRS chuyên dùng, tiềm năng cao trong sản xuất chất kháng khuẩn ở quy mô công nghiệp.



Hình 2. Đồ thị mặt đáp ứng và đường định mức của đường kính vòng kháng khuẩn PM theo mật độ giống chủng = log 7 tế bào/ml, hàm lượng đường = X và pH = Y.

$$\begin{aligned} \text{Đường kính vòng kháng PM} = & -114,951 + 17,5741 \cdot X + 8,91667 \cdot 7 + 18,9259 \cdot Y - 0,731481 \cdot X \cdot X - 1,0 \cdot X \cdot 7 - \\ & 1,23611 \cdot X \cdot Y - 0,231481 \cdot 7 \cdot 7 - 0,75 \cdot 7 \cdot Y - \\ & 0,953704 \cdot Y \cdot Y + 0,125 \cdot X \cdot 7 \cdot Y \end{aligned}$$

Onwuakor phát hiện rằng, sản xuất bacteriocin tối ưu bởi bốn loài *Lactobacillus*: *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. casei* và *L. plantarum*, hoạt tính kháng *Salmonella typhimurium* xảy ra ở pH 5,0-6,0 [26]. Như vậy, pH tối ưu của thí nghiệm (6,09) là tương đối phù hợp. Bên cạnh đó, mật số giống chủng 10^7 (tế bào/ml) được sử dụng trong bố trí nghiên cứu thu được kết quả cao ở hầu hết các nghiệm thức. Mục đích của quá trình nuôi cấy chủng *L. plantarum* lactic L39 là thu nhận tế bào có hoạt tính kháng chủng chỉ thị mạnh, mật số vi khuẩn cao, giúp cho việc thích nghi với môi trường và sinh sản tế bào diễn ra tốt hơn [27].

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng đường tối ưu sinh chất kháng khuẩn kháng chủng chỉ thị PO và PM tương đối gần nhau, lần lượt là 5,87 và 5,73% (w/v). Mặc dù các điều kiện hàm lượng đường, pH và nồng độ giống chủng khác nhau nhưng hoạt tính kháng khuẩn đều được thể hiện qua các vòng kháng khuẩn ở hầu hết các giếng thạch, thí nghiệm cho thấy hoạt tính của các thành phần kháng khuẩn có sẵn trong tế bào chủng *L. plantarum* L39 có tác động đến chủng chỉ thị ở mức độ mạnh hay yếu phụ thuộc vào các điều kiện dinh dưỡng và môi trường [28].

Khả năng nuôi cấy vi khuẩn lactic sinh chất kháng khuẩn từ nước chua tàu hủ ở quy mô 2 lít

Từ kết quả thí nghiệm tối ưu với hàm lượng đường từ 5,73-5,87% (w/v), pH 6,09-6,14 và mật số giống chủng log 7 (tế bào/ml) được đánh giá là điều kiện thích hợp để *L. plantarum* L39 sinh chất kháng khuẩn. Khi tăng sinh chủng *L. plantarum* L39 trong môi trường nước chua tàu hủ quy mô 2 lít ở điều kiện tối ưu thì hoạt tính kháng khuẩn thấp hơn so với vòng kháng tối ưu PO và PM kiểm chứng ở quy mô 100 ml trong thí nghiệm trước (14,00 và 8,50 mm) với đường kính vòng kháng khuẩn ở chủng chỉ thị PO và PM lần lượt là 11,33 mm và 5,50 mm. Callewaert và De Vuyst đã tăng quy mô sản xuất bacteriocin và ghi nhận sự suy giảm hoạt tính kháng khuẩn riêng của bacteriocin sinh ra bởi *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, qua đó minh chứng sự giảm hoạt tính là do sự tích tụ acid lactic khi lên men quy mô lớn [27].

Như vậy, khả năng kháng khuẩn của *L. plantarum* L39 với vi khuẩn gây mụn *Propionibacterium* spp. cho thấy tiềm năng ứng dụng rất lớn của chủng này trong sản xuất mỹ phẩm, nhằm đảm bảo an toàn sức khỏe con người. Suda (2012) đã có kết luận, bacteriocin của *L. plantarum* gồm enterocin AS-48 và lacticin 3147 là an toàn và có độ bền cao phù hợp với sản xuất công nghiệp [29]. Do đó, triển vọng sản xuất bacteriocin từ *L. plantarum* L39 ứng dụng trong công nghiệp mỹ phẩm trị mụn là phù hợp.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn *Propionibacterium* spp. (PO và PM) từ 8 mẫu nhân mụn. Trong 10 chủng vi khuẩn lactic thử nghiệm, chủng L39 có khả năng sinh bacteriocin kháng chủng chỉ thị PO và PM tốt nhất với đường kính vòng kháng đạt lần lượt 10,16 mm và 14,16 mm. Kết quả giải trình tự 16S rRNA và so sánh tương đồng cơ sở dữ liệu gene NCBI cho thấy, PO và L39 tương đồng vi khuẩn *P. acnes* DNF00413 với độ tương đồng 99% và *L. plantarum* chủng 7.11E với độ tương đồng 98%. Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy chủng *L. plantarum* L39 từ nước chua tàu hủ sinh chất kháng khuẩn được xác định ở môi trường bổ sung sucrose 2% (w/v), peptone 1% (w/v) và K_2HPO_4 2% (w/v), hàm lượng đường từ 5,73-5,87% (w/v), pH từ 6,09-6,14 và mật số giống chủng log 7 (tế bào/ml). Khi nuôi cấy ở quy mô 2 lít với điều kiện thích hợp, đường kính vòng kháng chủng PO và PM đạt lần lượt 11,33 mm và 5,5 mm, mở ra triển vọng ứng dụng trong lĩnh vực làm đẹp và chăm sóc sức khỏe con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.J. Rhee, J.E. Lee and C.H. Lee (2011), "Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods", *Microbial Cell Factories*, doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S5.
- [2] J.A. Ayukekbong, M. Ntemgwa, and A.N. Atabe (2017), "The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies", *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, **6**, p.47.
- [3] J.K. Swanson (2003), "Antibiotic resistance of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris", *Dermatology Nursing*, **15**(4), pp.359-362.
- [4] W.P. Bowe, J.C. Filip, J.M. DiRienzo, A. Volgina, and D.J. Margolis (2006), "Inhibition of *Propionibacterium acnes* by bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*", *Journal of Drugs in Dermatology*, **5**(9), pp.868-870.
- [5] K.R. Sanjay, R. Subramanian, A. Senthil and G. Vijayalakshmi (2008), "Use of natural coagulants of plant origin in production of soycurd (Tofu)", *International Journal of Food Engineering*, **4**(8), pp.45-50.
- [6] J.D. De Man, M. Rogosa and M.E. Sharpe (1960), "A Medium for the Cultivation of Lactobacilli", *Journal Applied Bacteriology*, **23**, pp.30-135.
- [7] G. William, M. Barns Susan, A. Pelletier Dale and J. Lane David (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**, pp.697-703.
- [8] D. Hernández, E. Cardell and V. Zárate (2004), "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: Initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711", *Journal of Applied Microbiology*, **99**, pp.77-84.
- [9] K. Piwowarek, E. Lipińska, E. Hać-Szymańczuk, M. Kieliszek and I. Ścibisz (2018), "*Propionibacterium* spp. - source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **10**, pp.515-538.
- [10] H. Charles (1974), "Properties of *Corynebacterium acnes* bacteriophage and description of an interference phenomenon", *American Society for Microbiology*, **14**, pp.1268-1273.
- [11] M.H. Amini and E.T. Richetti (2015), "Periprosthetic infection in shoulder and elbow joints", *Management of Periprosthetic Joint Infections*, **40**, pp.239-446.
- [12] S.M. Butler-Wu (2011), "Optimization of periprosthetic culture for the diagnosis of *Propionibacterium acnes* prosthetic joint infection", *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, pp.2490-2495.
- [13] T. Ulrika, C. Stéphane, B. Bertrand, Z. Werner and T. Andrej (2012), "Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**(4), pp.1885-1891.
- [14] J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley, and S.T. Williams (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

- [15] Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Thị Yến Ly và Huỳnh Xuân Phong (2011) “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn”, *Tạp chí Nghiên cứu khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **19a**, tr.176-184.
- [16] Lương Liễu Như (2014), *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic chịu nhiệt từ trái cây*, Luận văn đại học chuyên ngành công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- [17] M.A. Herreros, H. Sandoval, L. González, J.M. Castro, J.M. Fresno and M.E. Tornadijo (2005), “Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats’ milk cheese)”, *Food Microbiology*, **22**, pp.455-459.
- [18] N. Tharmaraj and P.N. Shah (2009), “Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips”, *International Food Research Journal*, **16**, pp.261-276.
- [19] S.D. Todorov, M. Vaz-Velho and B.D.G.M. Franco (2013), “Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal”, *Food Control*, **30**, pp.111-121.
- [20] Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhứt (2014), “Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum*”, *Tạp chí Sinh học*, **36(1se)**, tr.97-106.
- [21] S.D. Todorov and L.M.T. Dicks (2006), “Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine”, *Microbiological Research*, **161(2)**, pp.102-108.
- [22] Huỳnh Nguyễn Như Thu, Bui Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong, Takeshi Zendo, Kenji Sonomoto and Ngô Thị Phương Dung (2017), “Selection of thermotolerant lactic acid bacteria producing high antibacterial activity and production of biomass from tofu sour liquid”, *Can Tho University Journal of Science*, **07**, pp.51-57.
- [23] S. Sabrina Sabo, Attilio Converti, Simone Ichiwaki and Ricardo P.S. Oliveira (2018), “Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations”, *Journal of Dairy Science*, **102(1)**, pp.87-99.
- [24] K. Khalid, R. Siddiqi and N. Mojgani (1999), “Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of lactobacilli”, *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, **12(3)**, pp.67-71.
- [25] Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Ngọc Thanh và Ngô Thị Phương Dung (2018), “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic chịu nhiệt từ phụ phẩm nông nghiệp”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Đồng Tháp*, **31**, tr.91-97.
- [26] C.E. Onwuakor, V.O. Nwaugo, C.J. Nnadi and J.M. Emetole (2014), “Effect of varied culture conditions on crude supernatant (bacteriocin) production from four *Lactobacillus* species isolated from locally fermented maize”, *American Journal of Microbiology Research*, **2**, pp.125-130.
- [27] R. Callewaert, and L. De Vuyst (2000), “Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation”, *Applied and Environmental Microbiology*, **66(2)**, pp.606-613.
- [28] M. Mataragas, E.H. Drosinos, E. Tsakalidou and J. Metaxopoulos (2004), “Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442”, *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**, pp.191-198.
- [29] S. Suda, P.D. Cotter, C. Hill and P. Ross (2012), “Lactacin 3147-biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications”, *Current Protein & Peptide Sciences*, **13**, pp.193-204.