

TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN CỦA MÀNG POLYLACTIC ACID - NISIN

Trần Thanh Thủy*, Hoa Thị Minh Tú, Phạm Thị Thu Phương, Nguyễn Quốc Việt,
Bùi Thị Thanh Mai, Trần Đình Mẫn, Lê Thanh Bình

Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: tranthuy782002@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 30/8/2013; Chấp nhận đăng: 7/12/2013

TÓM TẮT

Màng polylactic acid (PLA) và nisin được tạo thành theo phương pháp phối trộn. Trong đó, polylactic acid và nisin đều là những sản phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật (từ chủng *Rhizopus oryzae* VLSH 01 và chủng *L. lactis* subsp. *lactis* PD15.1). Ảnh kính hiển vi điện tử quét (scanning electron microscopy – SEM) cho thấy nisin phân bố khá đồng đều trên màng. Nisin kết hợp vào trong màng PLA đạt 1415 IU/cm². Bên cạnh đó, tác dụng kháng khuẩn của màng đã được nghiên cứu trên môi trường thạch bán lỏng và môi trường LB dịch thể. Kết quả cho thấy, màng PLA-nisin có tác dụng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn kiểm định thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+), đặc biệt đối với vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm gồm *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus*. Đồng thời, màng PLA-nisin có khả năng tiêu diệt hoàn toàn *B. cereus* ở nồng độ lây nhiễm ban đầu là 10⁶ CFU/ml sau 16 giờ nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu này đã cho thấy màng kháng khuẩn PLA-nisin có tiềm năng ứng dụng trong bao gói và bảo quản thực phẩm.

Từ khóa: màng kháng khuẩn, màng PLA-nisin, nisin, polylactic acid, vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm.

1. MỞ ĐẦU

Vấn đề ô nhiễm thực phẩm, đặc biệt là nhiễm vi sinh vật sau khi chế biến là một trong số các nguyên nhân chính liên quan tới bệnh thực phẩm, vấn nạn sức khỏe cộng đồng và là gánh nặng kinh tế đối với ngành công nghiệp thực phẩm. Đóng gói là một trong các khâu cuối cùng trước khi thực phẩm được bảo quản, phân phối và tiêu dùng. Bởi vậy đóng gói và vật liệu đóng gói là khâu có ý nghĩa đặc biệt và là bước có thể kiểm soát ô nhiễm vi sinh vật sau chế biến. Việc kiểm soát sự nhiễm này là một giải pháp quan trọng làm giảm thiểu các tác hại nói trên. Ngoài ra, thực phẩm được đóng gói trở nên an toàn hơn, chất lượng được đảm bảo và thuận lợi cho việc cung cấp và phân phối.

“Đóng gói tích cực, active packaging” là dạng mà ở đó có sự tương tác giữa thực phẩm với vật liệu đóng gói [1, 2]. Đóng gói kháng khuẩn là một dạng đóng gói tích cực [1, 2]. Việc sử dụng poly-lactic acid (PLA), một polymer sinh học kết hợp với nisin, một bacteriocin - chất diệt khuẩn nguồn gốc sinh học làm những vật liệu cơ bản trong việc tạo bao bì thực phẩm là một

hướng nghiên cứu mới [1 - 7]. Giải pháp này là một sự lựa chọn đạt hai mục tiêu là tạo ra bao bì thực phẩm không chỉ có khả năng kháng khuẩn mà còn có khả năng tự phân hủy (phân hủy sinh học). Bởi lẽ, do PLA có khả năng phân hủy trong tự nhiên, không gây ô nhiễm môi trường, không phụ thuộc vào tăng giá do quá trình khan hiếm của dầu mỏ. PLA có thể thu nhận được từ việc lên men acid lactic các nguồn nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên như ngô, lõi ngô, gỗ và từ các biomass nói chung. Trong khi đó, nisin một bacteriocin bền nhiệt, được sinh tổng hợp từ một vài chủng thuộc loài *Lactococcus lactis* [8, 9]. Nisin có khả năng tiêu diệt các vi khuẩn Gram dương, gây bệnh thực phẩm như *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, vi khuẩn kỵ khí *Clostridium botulinum* và đặc biệt đối với *Listeria monocytogenes*- một loài vi khuẩn nội bào tùy tiện, là tác nhân gây ra bệnh listeriosis, bệnh nhiễm *Listeria* rất nguy hiểm đối với trẻ em, người cao tuổi, phụ nữ mang thai [7].

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nisin là sản phẩm thu nhận từ quá trình lên men chủng *L. lactis* PD15.1, bằng phương pháp hấp phụ phản hấp phụ, hoạt tính đạt khoảng 7200 IU/mg. PLA có trọng lượng phân tử khoảng 100.000, thu nhận từ quá trình polymer hóa acid lactic do chủng *Rhizopus oryzae* VLSH 01 tổng hợp. PLA và nisin là sản phẩm của Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Vi khuẩn kiểm định *L. plantarum* JCM 1149, *Bacillus cereus* ATCC 147337, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152, *Staphylococcus aureus* ATCC 13709, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* DSM4620(613), *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 trong tập hợp giống của Phòng Công nghệ vật liệu sinh học.

2.2. Màng PLA-nisin

Màng PLA-nisin được chuẩn bị theo quy trình phối trộn PLA và nisin sử dụng dung môi methylene chloride [4]. Hỗn hợp được khuấy đều cho tới khi PLA và nisin hòa tan hoàn toàn trong một thiết bị chứa thích hợp, tại nhiệt độ phòng. Sau đó, hỗn hợp được duy trì trong điều kiện tủ hút để methylene chloride bay hơi hết. Màng film PLA-nisin tạo ra có độ dày $0,06 \pm 0,01$ mm và nồng độ nisin đạt 1415 IU/cm².

2.3. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của màng film PLA-nisin

Hoạt tính kháng khuẩn của màng film PLA-nisin xác định theo phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch cải tiến [4, 5, 10]. Theo đó, các chủng kiểm định bao gồm *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7 được nuôi cấy trong môi trường LB, *L. plantarum* 1149 trong MRS và *L. monocytogenes* trong môi trường BHI. Các mảnh cắt từ màng PLA-nisin có đường kính 6 mm được đặt lên môi trường thạch bán lỏng mà trước đó đã cấy các chủng vi khuẩn kiểm định trên môi trường thích hợp nêu trên. Các đĩa petri sau khi giữ ở nhiệt độ 4 °C trong 4 giờ, được nuôi cấy tiếp tục 12 giờ ở 37 °C đối với *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, ở 30 °C đối với *L. plantarum* và 24 °C đối với *L. monocytogenes*. Hoạt tính của màng film PLA-nisin được xác định thông qua việc đo đường kính vòng vô khuẩn hình thành quanh các mảnh cắt.

Đối với thí nghiệm kiểm tra khả năng kháng khuẩn trong môi trường dịch thể được tiến hành theo phương pháp ủ trong dịch của Appendini và Hotchkiss cải tiến [10]. Miếng màng có kích thước một mặt 1×2 cm được đặt vào ống nghiệm có chứa 2 ml môi trường LB dịch thể. Sau đó bổ sung 0,5 % dịch giống *B. cereus* được nuôi cấy 12 giờ vào ống nghiệm để đạt số lượng vi khuẩn khoảng 10^6 CFU/ml. Mẫu được nuôi ở 37°C , lắc 150 vòng/phút và lấy mẫu theo thời gian, rồi cấy gọt trên đĩa thạch LB để xác định số lượng vi khuẩn có trong dịch nuôi cấy. Từ đó đánh giá được khả năng kháng khuẩn của màng. Mẫu đối chứng được chuẩn bị tương tự nhưng không có màng PLA-nisin.

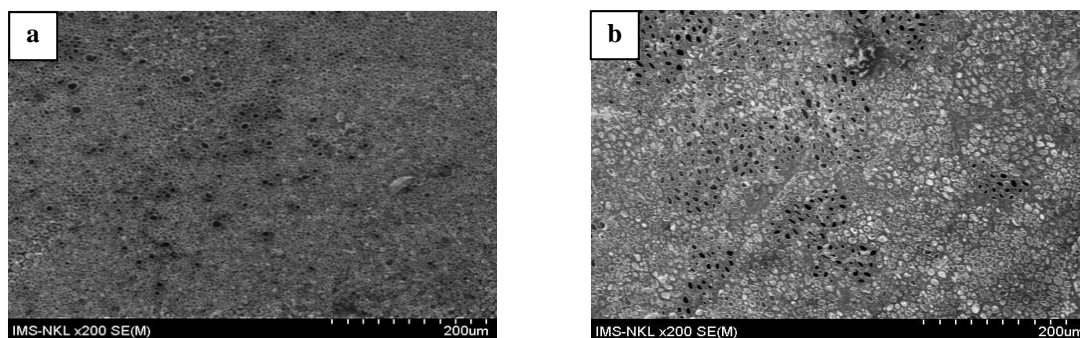
2.4. Phân bố nisin trong màng film PLA-nisin

Màng PLA-nisin được cắt thành các miếng có kích thước 3×5 mm. Sau đó trải màng lên lam kính và chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (scanning electron microscopy - SEM). Ảnh SEM của màng PLA-nisin được so sánh với ảnh SEM của mẫu đối chứng là màng PLA không chứa nisin.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự phân bố của nisin trong màng PLA-nisin

Kết quả ảnh kính hiển vi điện tử quét bề mặt màng PLA (hình 1a) và ảnh kính hiển vi điện tử quét bề mặt màng PLA-nisin (hình 1b) với độ phóng đại 200 lần cho thấy cấu trúc bề mặt màng PLA-nisin là một mạng lưới polymer không đồng nhất. Bề mặt màng PLA-nisin xù xì, trong khi bề mặt màng PLA lại khá mượt mà. Ngoài ra, ảnh SEM của màng PLA-nisin còn cho thấy trên bề mặt màng có những hạt sáng phân bố khá đồng đều. Các hạt sáng này có thể là các phân tử nisin đã được gắn lên trên nền PLA. Điều đó chứng tỏ trong cấu trúc màng PLA-nisin được tạo thành từ quy trình phối trộn nisin được phân bố khá đồng đều (hình 1b).



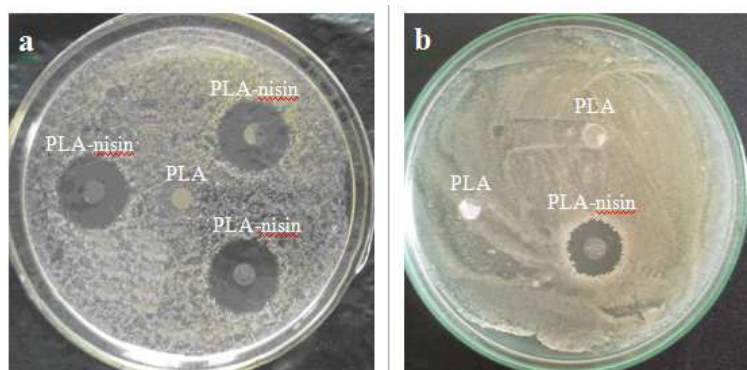
Hình 1. Ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) cấu trúc bề mặt của: a) màng PLA; b) màng PLA-nisin.

3.2. Hoạt tính kháng khuẩn của màng PLA-nisin

Xác định khả năng kháng khuẩn của màng PLA-nisin góp phần định hướng ứng dụng màng trong bảo quản thực phẩm một cách hiệu quả. Trong nghiên cứu này, tiến hành kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của màng PLA-nisin đối với 4 loại vi khuẩn Gram (+) và 3 loại vi khuẩn Gram (-). Kết quả được trình bày trong bảng 1 và hình 2.

Bảng 1. Phổ kháng khuẩn của màng PLA-nisin.

Vi khuẩn kiểm định	Đường kính vòng vô khuẩn của các loại màng (mm)	
	Đối chứng (màng PLA)	Thí nghiệm (màng PLA-nisin)
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149,	0	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13709	0	12
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	0	13
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 147337	0	12
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0	0
<i>Escherichia coli</i> DSM4620(613)	0	0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43888	0	0



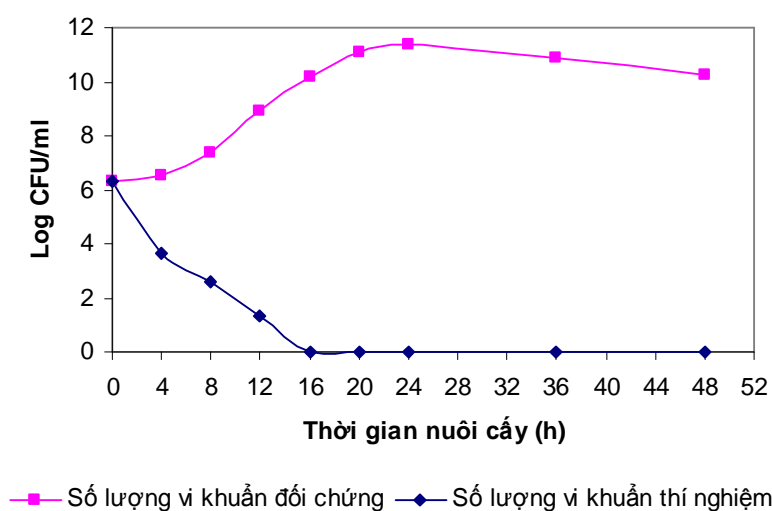
Hình 2. Hoạt tính kháng khuẩn của màng đối với *S. aureus* (a) và *L. monocytogenes* (b).

Kết quả bảng 1 và hình 2 cho thấy màng PLA-nisin có khả năng kháng lại các vi khuẩn Gram (+) nhưng không có khả năng kháng lại vi khuẩn Gram (-). Cụ thể màng PLA-nisin kháng lại các vi khuẩn: *L. plantarum* 1149, *Bacillus cereus* ATCC 147337, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152, *Staphylococcus aureus* ATCC 13709. Đường kính vòng vô khuẩn tạo ra có kích thước dao động trong khoảng 12 - 13 mm. Kết quả nghiên cứu này đã chứng minh tính kháng vi khuẩn của màng PLA-nisin là do hoạt tính của nisin.

Các kết quả ở trên cho thấy nisin trong cấu trúc màng PLA-nisin đã được giải phóng ra môi trường thạch bán lỏng khi tiếp xúc trực tiếp. Vấn đề đặt ra là, trong các môi trường dịch thể liệu nisin có được giải phóng và hoạt tính ra sao? Để trả lời câu hỏi này thí nghiệm được tiến hành để nghiên cứu ảnh hưởng của màng PLA-nisin đối với sinh trưởng của vi khuẩn *B. cereus* trong môi trường dịch thể theo như phương pháp được mô tả ở trên. Kết quả được trình bày trong bảng 2 và hình 3.

Bảng 2. Ảnh hưởng của màng PLA-nisin lên sinh trưởng của vi khuẩn *B. cereus* trong môi trường dịch thể ở 37 °C.

Thời gian nuôi cấy (h)	Số lượng vi khuẩn ở mẫu đối chứng (CFU/ml)	Số lượng vi khuẩn ở mẫu thí nghiệm (CFU/ml)
0	2×10^6	2×10^6
4	$3,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^3$
8	$2,2 \times 10^7$	$3,8 \times 10^2$
12	$8,2 \times 10^8$	2×10^1
16	$1,5 \times 10^{10}$	0
20	$1,3 \times 10^{11}$	0
24	$2,4 \times 10^{11}$	0
36	8×10^{10}	0
48	$1,9 \times 10^{10}$	0



Hình 3. Tác động của màng PLA-nisin lên sinh trưởng của *B. cereus*.

Kết quả nghiên cứu trong bảng 2 và hình 3 cho thấy, với số lượng *B. cereus* ban đầu lây nhiễm 2×10^6 , sau 16h nuôi cấy ở 37 °C, nisin trong màng PLA-nisin đã được giải phóng vào môi trường và thể hiện hoạt tính tiêu diệt hoàn toàn *B. cereus*. Trong khi ở mẫu đối chứng (không có màng PLA-nisin) số lượng *B. cereus* vẫn tiếp tục tăng và đạt $1,5 \times 10^{10}$ CFU/ml.

Kết quả nghiên cứu ở trên cũng cho thấy, *B. cereus* rất nhạy cảm với nisin được giải phóng từ màng PLA-nisin. Trong nghiên cứu tương tự của Tony Jin và cộng sự [4] lại cho thấy, màng PLA-nisin không có khả năng ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của *L. monocytogenes* với mật độ khoảng gần 10^4 CFU/ml khi nuôi trong môi trường BHI dịch thể ở 24 °C.

4. KẾT LUẬN

Trong cấu trúc màng PLA-nisin được tạo thành từ phương pháp trộn trong methylene chloride, sự phân bố của nisin khá đồng đều và được giải phóng ra khỏi cấu trúc khi tiếp xúc với môi trường lỏng và bán lỏng. Màng PLA-nisin thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của vi khuẩn kiểm định thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+), đặc biệt đối với vi khuẩn gây bệnh thực phẩm gồm *B. cereus*, *L. monocytogenes* và *S. aureus*. Với nồng độ nisin khoảng 1415 IU/cm², màng PLA-nisin có khả năng tiêu diệt hoàn toàn *B. cereus* ở nồng độ lây nhiễm ban đầu là 10⁶ CFU/ml.

Lời cảm ơn. Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Mã số: 01C-06/02-2012-2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brody A. L., Strupinsky E. R., Kline, L. R. - Active packaging for food applications. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc., 2001, pp. 218.
2. Suppakul P., J. Miltz, K. Sonneveld and S.W. Bigger. - Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications, *J. Food Science* **68** (2) (2003) 408-420.
3. Perez- perez C., Regalero-Gonzalez C., Rodriguez- Rodrigue C. A., Barbosa-Rodriguez J. R., and Villasenor-Ortega F. - Incorporation of antimicrobial agents in food packaging film and coating. *Advances in Argicultural and Food Biotechnology*, 193-216, ISBN 81-7736-269-0, Ed. By Ramon Gerardo Guevara-Gonzalez and Irineo Torres-Pacheco, 2006.
4. T. Jin and H. Zhang. - Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging, *Journal of Food Science* **57** (3) (2008) 127-134.
5. Jin T., Liu L. S., Zhang H., Hicks K. - Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44** (2009) 322–329.
6. Sunil Manglassary - Antimicrobial Food Packaging to enhance food safety: Current Development and Future Challenges, *Journal of Food Processing and Technology* **3** (2012) 5100e103.
7. Lê Thanh Bình - Cơ sở Vi sinh vật thực phẩm, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2012.
8. Phan Khánh Hoa, Nguyễn Việt Cường, Lê Thanh Bình - Ảnh hưởng của một số nguồn khoáng và nitơ lên sinh tổng hợp nisin của chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **39** (5) (2001) 37-43.
9. Chen H., Hoover D. G. - Bacteriocins and their food applications, *Comprehensive reviews in food science and food safety* **2** (2003) 82-100.
10. Appendini P., Hotchkiss J. H. - Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Sci. and Emerging Technol.* **3** (2002) 113-126.

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL EFFECT OF POLYLACTIC ACID - NISIN FILM

Tran Thanh Thuy*, Hoa Thi Minh Tu, Phạm Thị Thu Phương, Nguyễn Quốc Việt,
Bùi Thị Thanh Mai, Trần Đình Mạnh, Lê Thanh Bình

Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: *tranthuy782002@yahoo.com*

Antibacterial films were prepared from polylactic acid (PLA) and nisin by incorporation method in solvent. The polylactic acid and nisin are products derived from microorganisms (from *R. oryzae* VLSH 01 and *L. lactis* subsp. *lactis* PD14, respectively). The scanning electron microscope image revealed that nisin particles were uniformly distributed in PLA matrix on the surface. Nisin was incorporated into PLA films at 1415 IU/cm². In addition, the antibacterial effect of PLA-nisin film was performed using semi-agar and liquid medium. The results showed that PLA-nisin films were able to inhibit the growth of tested bacteria belong to Gram positive bacteria, especially the food-borne pathogenic bacteria including *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*. At the same time, the PLA-nisin films were able to completely against *B. cereus* after 16 h cultivation in LB medium with initial concentration 10⁶ CFU/ml. This study demonstrates the potential application of antibacterial films in food packaging and food preservation.

Keywords: antibacterial films, PLA-nisin film, nisin, polylactic acid, food-borne pathogenic bacteria.