

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SẢN SINH HỢP CHẤT KHÁNG KHUẨN CỦA *Lactobacillus plantarum*

Lê Ngọc Thùy Trang*, Phạm Minh Nhựt

Trường Đại học Công nghệ tp. Hồ Chí Minh, *thuytranglengoc@gmail.com

TÓM TẮT: Từ các sản phẩm lên men truyền thống như sữa chua, nem chua, cải chua, kim chi, măng chua và một số chủng vi khuẩn lactic đã phân lập được, sau khi sàng lọc, đã chọn ra được chủng SC01 có khả năng đối kháng mạnh, đồng thời tạo ra các hợp chất kháng khuẩn có tính ức chế mạnh đối với các vi khuẩn chỉ thị *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* và *Bacillus subtilis*. Định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA, chủng SC01 được xác định là *Lactobacillus plantarum*. Tiến hành khảo sát khả năng sản sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01 trên các môi trường khác nhau đã cho thấy môi trường MRS có cải tiến là tốt nhất. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl và thành phần môi trường MRS đã xác định được môi trường MRS OPTSC01 thích hợp nhất bao gồm cao thịt bò (10 g/l), cao nấm men (5 g/l), trypton (10 g/l), sucrose (20 g/l), sodium acetate (5 g/l), K_2HPO_4 (4 g/l), ammonium citrate (2 g/l), $MgSO_4$ (0,2 g/l), $MnSO_4$ (0,05 g/l), Tween 80 (1 ml/l), pH môi trường 6,0 và nhiệt độ ủ 37°C. Trên môi trường tối ưu này, đường cong tăng trưởng đã được thiết lập để đánh giá khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn. Kết quả chỉ ra rằng, ở 28 giờ là thời điểm tối ưu cho sự tăng trưởng và bắt đầu sản sinh các hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính cao của *L. plantarum* SC01. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu về tách chiết hợp chất kháng khuẩn từ *L. plantarum* nhằm ứng dụng trong lĩnh vực bảo quản thực phẩm cũng các ứng dụng trong phòng bệnh trên vật nuôi.

Từ khóa: *Lactobacillus plantarum*, kháng khuẩn, vi khuẩn lactic.

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, có rất nhiều công trình nghiên cứu về ứng dụng vi sinh vật có lợi trong phòng bệnh, trồng trọt, chăn nuôi, thủy sản và bảo quản thực phẩm.

Một trong những nhóm vi khuẩn có lợi được quan tâm nhiều nhất là nhóm vi khuẩn lactic, đây là nhóm vi khuẩn lên men chua đã được con người sử dụng từ rất lâu. Vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng khuẩn diện rộng do có khả năng sản xuất ra các chất ức chế: như một số acid hữu cơ, hydrogen peroxide, diacetyl, các chất có khối lượng phân tử thấp và bacteriocin là chất có khả năng ức chế cả vi khuẩn gram (+) và vi khuẩn gram (-). Các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sản sinh acid hữu cơ, đặc biệt là acid lactic trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Đối với hydroxy peroxide thì khả năng kháng khuẩn là do việc tạo ra các chất oxy hóa mạnh như oxygen nguyên tử, các gốc tự do superoxide và các gốc tự do hydroxyl. Đối với bacteriocin, cơ chế kháng khuẩn do vi khuẩn lactic tổng hợp đã được nghiên cứu đầu tiên ở nisin, bacteriocin gram (+) [13]. Dựa trên bản chất cation và tính kỵ nước, hầu hết các peptide hoạt động như

màng tế bào thấm. Bacteriocin có khả năng tiêu diệt các vi khuẩn khác do sự tạo thành các kênh làm thay đổi tính thấm của màng tế bào, nhiều loại bacteriocin còn có khả năng phân giải DNA, RNA và tấn công vào lớp peptidoglycan để làm suy yếu thành tế bào [9].

Việc sử dụng các hợp chất sinh học chiết xuất từ vi sinh vật là một hướng tiếp cận tương đối khả thi trong lĩnh vực bảo quản nông sản thực phẩm và trong lĩnh vực nuôi trồng. Chính vì thế, việc phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính đối kháng mạnh với vi khuẩn gây bệnh, đồng thời tìm ra môi trường tối ưu để chúng sản sinh các hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính cao nhất là mục tiêu của nghiên cứu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn mẫu và vi khuẩn chỉ thị là các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ các sản phẩm lên men chua truyền thống: sữa chua thủ công, nem chua, kim chi, cải chua, măng chua, cà pháo muối chua được thu tại khu vực quận 2, tp. Hồ Chí Minh.

Các chủng vi khuẩn chỉ thị sử dụng trong thí nghiệm này bao gồm vi khuẩn *E. coli*,

Salmonella, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Listeria monocytogenes* được cung cấp bởi Trường Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh.

Phân lập và định danh sơ bộ vi khuẩn lactic

Cân chính xác 10 g mẫu cho vào erlen chứa 90 ml môi trường MRS bổ sung nystatin với nồng độ 50 mg/l [5]. Sau đó đem ủ lactic với tốc độ 150 vòng/phút ở 37°C trong vòng 24 giờ.

Sau khi tăng sinh, pha loãng mẫu ở độ pha loãng 10^{-5} , 10^{-6} và 10^{-7} . Hút 0,1 ml dịch ở các độ pha loãng cấy vào môi trường MRS agar có bổ sung nystatin với nồng độ 50 mg/l và ủ ở 37°C trong 48 giờ. Chọn lọc vi khuẩn lactic dựa vào hình thái khuẩn lạc, sau đó làm thuần và bảo quản. Tiến hành một số thử nghiệm để định danh sơ bộ vi khuẩn lactic gồm nhuộm gram, nhuộm bào tử, thử nghiệm catalase theo Ashmaig et al. (2009) [2] và Karthikeyan & Santhosh (2009) [6].

Sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic sinh các hợp chất kháng khuẩn ức chế mạnh với vi khuẩn chỉ thị

Từ các chủng vi khuẩn lactic đã phân lập, tăng sinh vi khuẩn lactic rồi xác định mật độ 10^7 cfu/ml và cấy vào erlen chứa 100 ml môi trường MRS, ủ ở 37°C trong 48 giờ. Tiến hành li tâm 4000 vòng/phút trong 20 phút, loại bỏ sinh khối, thu dịch nổi và điều chỉnh pH về 6,0. Tiến hành đánh giá khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn thông qua khả năng ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn chỉ thị bằng phương pháp đồng nuôi cấy được mô tả bởi Vaseeharan và Ramasamy (2003) [15]. Hút 2 ml dịch sau li tâm cho vào ống nghiệm chứa 2 ml môi trường TSB rồi hút 200 μ l dịch vi khuẩn chỉ thị ở mật độ 10^7 cfu/ml. Ủ ở 37°C trong 24 giờ rồi đo OD_{600nm}. Đối chứng là môi trường không bổ sung vi khuẩn, mỗi công thức lặp lại 3 lần.

Định danh chủng vi khuẩn lactic bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA.

Sau khi sàng lọc, đã chọn được chủng vi khuẩn SC01, chủng này được định danh tại Công ty Nam Khoa Biotek theo phương pháp giải trình tự 16S rDNA và tra cứu trên Blast search.

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của vi khuẩn lactic

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng

Qua thí nghiệm sàng lọc, chủng vi khuẩn *L. plantarum* SC01 được đánh giá khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn trên các môi trường khác nhau: MRS, TSB, BHI, M17 và LAPTg (HiMedia, Ấn Độ).

Đầu tiên, tiến hành tăng sinh vi khuẩn *L. plantarum* SC01 trong bình chứa 10 ml môi trường MRS ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Sau đó, tiến hành li tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch nổi và hòa cạn vào nước cất vô trùng. Tiến hành đo OD_{600nm} để xác định mật độ. Hút dịch vi khuẩn vào các bình chứa môi trường MRS, TSB, BHI, M17 và LAPTg sao cho đạt mật độ 10^7 cfu/ml. Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ.

Đánh giá khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01 trên các môi trường thông qua khả năng ức chế vi khuẩn chỉ thị đã được mô tả.

Khảo sát ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và nồng độ NaCl

Để xác định ảnh hưởng pH đến khả năng đối kháng của vi khuẩn lactic, sử dụng 5 bình chứa môi trường MRS và điều chỉnh pH lần lượt là 3, 4, 5, 6 và 7. Mật độ vi khuẩn ở các bình là 10^7 cfu/ml, mỗi công thức lặp lại 3 lần [10].

Để xác định ảnh hưởng nhiệt độ đến khả năng đối kháng của vi khuẩn lactic, tiến hành thí nghiệm cũng được thực hiện tương tự như trên, thực hiện trong 3 bình chứa môi trường MRS. Tiến hành ủ các bình có bổ sung vi khuẩn với mật độ 10^7 cfu/ml ở 30°C, 37°C và 44°C trong 48 giờ, sau đó tiến hành xác định tỷ lệ ức chế với vi khuẩn chỉ thị [10].

Đối với việc khảo sát nồng độ NaCl ảnh hưởng đến khả năng đối kháng của vi khuẩn *L. plantarum* SC01 bằng cách chuẩn bị 4 bình chứa môi trường MRS chứa các nồng độ muối khác nhau gồm 0%, 0,5%, 1%, 1,5% và 2%. Mật độ vi khuẩn *L. plantarum* SC01 ở mỗi công thức là 10^7 cfu/ml. Ủ ở 37°C trong 48 giờ [10], sau đó tiến hành xác định tỷ lệ ức chế với vi

khuẩn chỉ thị theo Vaseeheran và Ramasamy, 2003 [15].

Khảo sát ảnh hưởng của các thành phần dinh dưỡng trong môi trường

L. plantarum SC01 được nuôi cấy trong bình chứa 10 ml môi trường MRS, ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ, tiến hành đo OD_{600nm} và pha loãng để có được mật độ vi khuẩn là 10⁷ cfu/ml. Tiến hành cấy canh trường vi khuẩn vào môi trường MRS cải tiến như sau: MRS1 (không chứa các thành phần hữu cơ; bổ sung cao thịt bò và cao nấm men; cao thịt bò và tryptone; cao nấm men và tryptone; cao thịt bò, cao nấm men và peptone); MRS2 (không bổ sung đường; bổ sung sucrose, lactose, maltose và glucose); MRS3 (đường với nồng độ từ 0, 10, 20, 30, 40 và 50 g/l); MRS4 (K₂HPO₄ với nồng độ từ 0, 1, 2, 4 và 8 g/l); MRS5 (không bổ sung muối ammonium citrate và bổ sung muối ammonium citrate với nồng độ 0, 2, 4 và 6 g/l); MRS6 (không bổ sung Tween 80 và bổ sung Tween 80 với nồng độ 0, 0,5, 1, 1,5 và 2 ml/l) [3, 7, 8, 14].

Ở các công thức, sau khi bổ sung vi khuẩn được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ, tiến hành đánh giá mức độ kháng khuẩn với vi khuẩn chỉ thị ở mỗi công thức, mỗi công thức lặp lại 3 lần theo Todorov et al. (2012) [11].

Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn chỉ thị của môi trường tối ưu

L. plantarum SC01 sau khi tăng sinh được

vào môi trường MRS tối ưu, đồng thời cấy vào môi trường MRS thông thường, ủ ở 37°C trong 48 giờ. Sau đó tiến hành đánh giá khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn trong 2 môi trường đối với vi khuẩn chỉ thị theo phương pháp đã mô tả của Vaseeheran & Ramasamy (2003) [15], mỗi công thức lặp lại 3 lần.

Xây dựng đường cong tăng trưởng của *L. plantarum* SC01

Chủng vi khuẩn *L. plantarum* SC01 được tăng sinh, pha loãng và cấy vào môi trường MRS tối ưu để có được mật độ ban đầu trong bình môi trường là 10⁶ cfu/ml. Sau đó tiến hành khảo sát sự tăng trưởng của *L. plantarum* SC01 tại các thời điểm 0, 4, 8, 12, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 giờ. Tại mỗi thời điểm tiến hành thu mẫu và khảo sát các chỉ tiêu mật độ vi khuẩn bằng cách đo OD_{600nm}, sự thay đổi pH, tỷ lệ ức chế vi khuẩn chỉ thị và tổng vi khuẩn lactic trong môi trường tối ưu.

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu trong thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và Statgraphics Centurion XVI.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập và định danh sơ bộ

Sau khi tăng sinh, một số chủng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường có bổ sung nystatin đồng thời định danh sơ bộ theo Ashmaig et al. (2009) [2], kết quả chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn lactic phân lập

Nguồn phân lập	Ký hiệu mẫu	Đợt	Gram	Hình dạng tế bào	Sinh bào tử	Thử nghiệm catalase
Cải chua	CC01	1	+	Que ngắn	-	-
Kim chi	KC01	1	+	Que dài	-	-
Nem chua	NC01	1	+	Que ngắn	-	-
	NC02	1	+	Que dài	-	-
Sữa chua	SC01	1	+	Que ngắn	-	-
	SC02	1	+	Que dài	-	-
Cà pháo	CP	2	+	Que dài	-	-
Măng chua	MC	2	+	Que ngắn	-	-

Kết quả sàng lọc vi khuẩn lactic có khả năng sinh hợp chất kháng khuẩn

Tám chủng vi khuẩn lactic đã phân lập được

tiến hành sàng lọc khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn thông qua sự ức chế đối với vi khuẩn chỉ thị, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn lactic đối với vi khuẩn chỉ thị (%)

	SC01	SC02	NC01	NC02	CC01	KC01	CP	MC
<i>E. coli</i>	64,82 ^a	61,57 ^a	44,06 ^{bc}	66,30 ^a	38,26 ^c	62,30 ^a	43,68 ^{bc}	49,38 ^b
<i>Salmonella</i>	76,47 ^a	66,86 ^b	34,49 ^e	61,19 ^b	42,90 ^{cd}	61,93 ^b	36,53 ^{de}	46,70 ^c
<i>S. aureus</i>	68,27 ^{ab}	70,00 ^a	49,78 ^d	73,37 ^a	49,85 ^d	61,08 ^{bc}	41,72 ^{de}	55,04 ^{cd}
<i>B. subtilis</i>	66,06 ^a	57,69 ^b	39,39 ^d	69,03 ^a	43,48 ^{cd}	58,36 ^b	46,28 ^{cd}	49,45 ^c
<i>L. monocytogenes</i>	67,63 ^{ab}	63,03 ^{bc}	38,99 ^e	70,28 ^a	40,59 ^{de}	60,26 ^c	39,39 ^e	46,92 ^d

*a, b, c, d, e thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức.

Bảng 2 cho thấy, dịch li tâm của các chủng vi khuẩn lactic sau khi được trung hòa đã thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn chỉ thị. Điều này chứng tỏ, ngoài sản phẩm là acid hữu cơ, các chủng vi khuẩn lactic có thể tạo ra các hợp chất kháng khuẩn khác.

Xét về tỷ lệ ức chế đối với vi khuẩn *E. coli*, dịch li tâm sau trung hòa của cả 8 chủng đều thể hiện sự đối kháng nhưng với mức độ khác nhau, trong đó dịch li tâm của chủng SC01, SC02, NC02 và KC01 cho tỷ lệ ức chế mạnh hơn hẳn và có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với 4 chủng còn lại. Dịch li tâm sau trung hòa của 4 chủng này cũng cho tỷ lệ ức chế vi khuẩn *S. aureus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* cao hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với 4 chủng còn lại ($P < 0,05$). Riêng đối với vi khuẩn *Salmonella*, tỷ lệ ức chế của dịch li tâm sau trung hòa của chủng SC01 là mạnh nhất và có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với 7 chủng còn lại.

Từ kết quả này đã cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn đều tạo ra các hợp chất kháng khuẩn bao gồm acid hữu cơ và các hợp chất kháng khuẩn khác. Các hợp chất kháng khuẩn này có thể là bacteriocin, hydroxy peroxide, diacetyl, reuterin [16]. Chính các thành phần này tạo nên khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn chỉ thị của dịch vi khuẩn. Từ kết quả thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy, chủng SC01 và chủng NC02 đều có khả năng sản sinh ra các hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính ức chế mạnh hơn so với các chủng còn lại. Tuy nhiên, chủng SC01 thể hiện sự vượt trội hơn so với chủng NC02 khi đánh giá tỷ lệ ức chế đối với 5 chủng vi khuẩn chỉ thị, đặc

biệt là khả năng ức chế vi khuẩn *Salmonella*, vì thế chủng này đã được chúng tôi chọn lựa để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả giải trình tự 16S rDNA của chủng SC01

Chủng SC01 được gửi định danh tại Công ty Nam Khoa Biotek bằng kỹ thuật giải trình tự 16S rDNA và đã xác định được là *Lactobacillus plantarum*.

Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01

Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng, phát triển và tạo ra các hợp chất kháng khuẩn. Vì vậy, chúng tôi đã khảo sát khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01 trên các môi trường MRS, TSB, BHI, M17 và LAPTg, kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả đánh giá khả năng tạo ra các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01 trong các môi trường khác nhau cho thấy, dịch sau li tâm của *L. plantarum* SC01 trên 5 loại môi trường dinh dưỡng sau khi trung hòa bằng acid hữu cơ đều thể hiện tính đối kháng với 5 chủng vi khuẩn chỉ thị nhưng tỷ lệ ức chế khác nhau và tỷ lệ ức chế của dịch vi khuẩn *L. plantarum* SC01 trên các môi trường đối với từng chủng vi khuẩn chỉ thị đều thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Trong 5 loại môi trường dinh dưỡng, trên môi trường MRS, *L. plantarum* SC01 sinh hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính ức chế cao nhất với 5 chủng vi

khuẩn chi thị so với 4 môi trường còn lại (tỷ lệ ức chế cao hơn 60%). Trong môi trường LAPTg và BHI, SC01 tạo ra hợp chất kháng khuẩn cho tỷ lệ ức chế thấp nhất.

Bảng 3. Tỷ lệ ức chế của dịch SC01 trên các môi trường với vi khuẩn chi thị

	MRS	LAPTg	TSB	BHI	M17
<i>E. coli</i>	64,94 ^a	5,43 ^c	13,76 ^b	8,47 ^c	6,52 ^c
<i>Salmonella</i>	60,03 ^a	17,42 ^c	2,32 ^d	18,99 ^c	27,34 ^b
<i>S. aureus</i>	61,75 ^a	0,19 ^d	29,48 ^d	34,33 ^c	53,00 ^b
<i>B. subtilis</i>	59,73 ^a	15,24 ^c	31,56 ^b	27,33 ^c	56,07 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	65,69 ^a	20,70 ^d	14,55 ^b	43,68 ^b	38,61 ^c

*a, b, c, d thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức.

Theo Todorov & Dicks (2005) [10], khi khảo sát khả năng sinh bacteriocin của vi khuẩn *L. plantarum* trên các môi trường MRS, BHI và M17, trên môi trường MRS, chủng nghiên cứu cũng cho hoạt tính của bacteriocin cao nhất. Mặt khác nghiên cứu của Tomas & Nader-Macias (2007) [12] về khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của vi khuẩn lactic trên môi trường MRS và LAPTg các chủng *Lactobacillus* tạo ra các hợp chất kháng khuẩn

có hoạt tính như nhau trên hai môi trường. Như vậy, tương tự như các nghiên cứu khác về vi khuẩn lactic, đối với chủng SC01, MRS là môi trường tốt nhất cho sự sinh trưởng, tạo ra các hợp chất kháng khuẩn và có hoạt tính ức chế vi khuẩn chi thị mạnh nhất.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của vi khuẩn *L. plantarum* SC01 được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ ức chế của dịch SC01 với vi khuẩn chi thị ở nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl khác nhau (%)

		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Môi trường MRS	30°C	55,80 ^b	63,09 ^a	55,03 ^b	55,66 ^b	58,42 ^b
	37°C	59,88 ^a	60,76 ^a	57,88 ^a	58,98 ^a	61,00 ^a
	44°C	33,86 ^c	18,76 ^b	22,38 ^c	15,34 ^c	21,18 ^c
	pH3	4,60 ^d	2,48 ^d	9,91 ^d	0,07 ^e	6,59 ^d
	pH4	47,25 ^c	49,43 ^c	48,34 ^c	49,16 ^d	52,10 ^c
	pH5	67,80 ^a	69,22 ^a	61,10 ^{ab}	67,39 ^b	70,55 ^a
	pH6	67,12 ^a	71,33 ^a	66,67 ^a	64,15 ^a	71,70 ^a
	pH7	55,87 ^b	63,09 ^b	55,03 ^b	55,66 ^c	58,42 ^b
	0,0% NaCl	62,41 ^b	63,09 ^b	61,33 ^a	62,05 ^a	65,03 ^b
	0,5% NaCl	59,95 ^c	67,25 ^a	58,28 ^{ab}	60,76 ^{ab}	64,21 ^b
	1,0% NaCl	66,73 ^a	64,34 ^{ab}	57,18 ^b	58,44 ^b	67,93 ^a
	1,5% NaCl	62,35 ^b	65,64 ^{ab}	58,67 ^{ab}	61,46 ^a	63,71 ^b
	2,0% NaCl	68,11 ^a	62,85 ^b	60,58 ^{ab}	61,41 ^a	64,48 ^b

*a, b, c, d, e thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức.

Kết quả này cho thấy rằng nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl có ảnh hưởng đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của SC01 trong môi trường MRS. Dịch li tâm sau khi trung hòa của *L. plantarum* SC01 ở 3 điều kiện nhiệt độ đều thể hiện tính đối kháng với 5 chủng vi khuẩn chi

thị nhưng tỷ lệ ức chế khác nhau và tỷ lệ ức chế đối với từng chủng vi khuẩn chi thị đều thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong 3 điều kiện nhiệt độ, ở nhiệt độ 37°C, SC01 sinh hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính ức chế cao nhất với 4 chủng vi khuẩn chi thị (*E.*

coli, *S. aureus*, *B. subtilis* và *L. monocytogenes*) so với ở nhiệt độ 30°C và 44°C.

Dịch li tâm sau khi trung hòa của SC01 ở 5 giá trị pH đều thể hiện tính đối kháng với 5 chủng vi khuẩn chỉ thị nhưng tỷ lệ ức chế khác nhau và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Trong 5 giá trị pH, SC01 sinh hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính ức chế cao nhất với 4 chủng vi khuẩn chỉ thị (*Salomonella*, *S. aureus*, *B. subtilis* và *L. monocytogenes*) khi nuôi cấy ở pH 6,0.

Khi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaCl, kết quả cho thấy, ở tất cả các công thức khảo sát, vi khuẩn SC01 đều sản sinh ra các hợp chất kháng khuẩn, tuy nhiên, giữa các công thức không thể hiện rõ ràng sự khác biệt về tỷ lệ ức chế đối với các chủng vi khuẩn chỉ thị và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Kết quả này đã chỉ ra rằng sự hiện diện của NaCl không ảnh hưởng nhiều đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của SC01 trong môi trường MRS.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các thành phần trong môi trường MRS đến sự sinh các hợp chất kháng khuẩn của SC01

		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
MRS + nguồn nitrogen	BE - TR	45,36 ^d	54,98 ^d	42,97 ^c	52,45 ^d	47,76 ^d
	BE - YE	34,27 ^e	35,67 ^e	26,76 ^d	23,20 ^e	36,33 ^e
	YE - TR	58,23 ^c	59,65 ^c	56,40 ^b	57,62 ^c	58,30 ^c
	BE - YE - PE	61,63 ^b	64,01 ^b	63,73 ^a	63,29 ^b	64,29 ^b
	BE - YE - TR	64,29 ^a	70,32 ^a	64,27 ^a	70,11 ^a	68,90 ^a
	Không TPHC	0,09 ^f	0,84 ^f	2,41 ^e	0,14 ^f	0,45 ^f
MRS + nguồn carbon	Không đường	6,67 ^d	5,91 ^d	8,81 ^d	18,41 ^d	9,71 ^d
	Glucose	57,91 ^c	63,71 ^b	56,37 ^b	61,90 ^{bc}	62,21 ^{bc}
	Sucrose	71,10 ^a	73,81 ^a	73,28 ^a	71,75 ^a	72,45 ^a
	Lactose	57,72 ^c	60,57 ^c	54,55 ^c	58,21 ^c	60,29 ^c
	Maltose	64,95 ^b	65,11 ^b	64,01 ^b	64,62 ^b	64,00 ^b
MRS + hàm lượng đường	0 g/l	29,67 ^c	24,09 ^c	29,85 ^b	19,84 ^c	24,19 ^b
	10 g/l	64,43 ^a	64,34 ^a	65,80 ^a	67,63 ^a	64,20 ^a
	20 g/l	67,62 ^a	67,49 ^a	66,64 ^a	68,99 ^a	67,35 ^a
	30 g/l	35,79 ^b	31,17 ^b	19,70 ^c	28,98 ^b	28,69 ^b
	40 g/l	15,06 ^d	9,97 ^e	11,93 ^d	19,99 ^c	24,00 ^b
	50 g/l	17,97 ^d	19,70 ^d	16,99 ^c	20,94 ^c	16,81 ^c
MRS + dipotassium phosphate	0 g/l	31,16 ^d	36,90 ^c	28,23 ^c	33,96 ^e	37,05 ^{cd}
	1 g/l	57,05 ^b	46,15 ^b	47,65 ^b	51,32 ^b	49,10 ^b
	2 g/l	34,02 ^d	34,77 ^c	25,16 ^c	36,24 ^d	35,00 ^d
	4 g/l	67,71 ^a	63,16 ^a	52,61 ^a	62,14 ^a	66,26 ^a
	8 g/l	42,22 ^c	35,16 ^c	45,96 ^b	47,22 ^c	42,13 ^c
MRS + ammonium citrate	0 g/l	49,05 ^{bc}	37,46 ^b	31,85 ^b	48,40 ^b	40,10 ^b
	2 g/l	54,05 ^a	46,89 ^a	42,15 ^a	56,81 ^a	42,53 ^{ab}
	4 g/l	50,14 ^b	45,00 ^a	35,74 ^{ab}	55,39 ^a	44,22 ^a
	6 g/l	47,05 ^c	45,78 ^a	37,38 ^{ab}	49,07 ^b	42,97 ^{ab}
MRS + Tween 80	0 ml/l	52,35 ^a	34,98 ^c	55,39 ^a	52,10 ^{ab}	51,64 ^b
	0,5 ml/l	42,39 ^b	36,96 ^c	29,94 ^b	45,67 ^c	39,54 ^c
	1 ml/l	54,15 ^a	44,70 ^a	56,31 ^a	51,76 ^b	61,75 ^a
	1,5 ml/l	53,43 ^a	40,63 ^b	56,41 ^a	54,42 ^{ab}	52,97 ^b
	2 ml/l	51,80 ^a	42,27 ^b	54,13 ^a	55,04 ^a	54,12 ^b

BE. cao thịt bò; TR. trypton; YE. cao nấm men; PE. pepton; TPHC. thành phần hữu cơ; *a, b, c, d, e thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức.

Đối với ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng trong môi trường MRS, đây là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng, phát triển và sản sinh các hợp chất thứ cấp, trong đó thành phần môi trường ảnh hưởng nhiều đến việc sản sinh các hợp chất kháng khuẩn (bảng 5).

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, thành phần hữu cơ trong môi trường MRS broth ảnh hưởng khá nhiều đến sự tăng trưởng và sản sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01 nhất là môi trường bổ sung cao thịt bò, cao nấm men và trypton. Về ảnh hưởng của nguồn đường, khi bổ sung đường sucrose, *L. plantarum* SC01 sinh hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính cao hơn môi trường bổ sung glucose, maltose và lactose vì sucrose là nguồn đường rất phổ biến và khá dễ sử dụng nên khả năng tăng trưởng của *L. plantarum* SC01 mạnh hơn. Ở các nồng độ đường sucrose khảo sát, hoạt tính của hợp chất kháng khuẩn do SC01 sinh ra mạnh nhất trong môi trường bổ sung nồng độ 20 g/l.

Đối với ảnh hưởng của các thành phần vô cơ trong môi trường MRS đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01, chỉ tiến hành khảo sát nồng độ muối K_2HPO_4 và ammonium citrate.

Trong các nồng độ muối K_2HPO_4 khảo sát, ở nồng độ 4 g/l, *L. plantarum* SC01 tạo ra được hợp chất kháng khuẩn đối kháng tương đối đồng đều ở cả 5 chủng vi khuẩn chỉ thị. Còn đối với ảnh hưởng của muối ammonium citrate, ở nồng độ bổ sung 2 g/l chủng SC01 cũng tạo ra hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính đối kháng đồng đều ở cả 5 chủng. Như vậy, việc không bổ sung các muối vô cơ hoặc bổ sung với nồng độ cao cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính cao của chủng SC01.

Thành phần cuối cùng được khảo sát trong môi trường MRS là nồng độ Tween 80. Tween 80 là thành phần rất quan trọng vì Tween 80 là một chất hoạt động bề mặt, giúp cho quá trình hấp thu chất dinh dưỡng cũng như sản sinh các hợp chất thứ cấp của vi khuẩn lactic [4]. Đối với vi khuẩn *L. plantarum* SC01, nồng độ Tween 80 1,0 ml/l thích hợp nhất cho sự sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn có hoạt tính cao đối với vi khuẩn chỉ thị.

Như vậy, sau khi đánh giá sự ảnh hưởng của các thành phần dinh dưỡng trong môi trường MRS cũng như nhiệt độ, giá trị pH và nồng độ muối NaCl tối ưu, đã xác định được thành phần môi trường và các yếu tố phù hợp đối với chủng SC01 nhằm thu được sản phẩm là các hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính cao nhất. Thành phần môi trường MRS OPTSC01 như sau: cao thịt bò (10 g/l), cao nấm men (5 g/l), trypton (10 g/l), sucrose (20 g/l), sodium acetate (5 g/l), K_2HPO_4 (4 g/l), ammonium citrate (2 g/l), $MgSO_4$ (0,2 g/l), $MnSO_4$ (0,05 g/l), Tween 80 (1 ml/l), pH 6,0.

Đường cong tăng trưởng của *L. plantarum* SC01 trên môi trường tối ưu được thực hiện nhằm mục đích xác định thời điểm mà *L. plantarum* SC01 tăng trưởng mạnh nhất đồng thời sinh các hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính mạnh nhất (hình 1).

Kết quả trên hình 1 cho thấy có sự biến động khá rõ rệt về các yếu tố khảo sát của vi khuẩn *L. plantarum* SC01 trên môi trường MRS OPTSC01, đó là các yếu tố về pH, OD_{600nm} , mật độ vi khuẩn sống và tỷ lệ ức chế vi khuẩn chỉ thị.

Yếu tố khảo sát đầu tiên là giá trị pH. Tại 0 giờ, pH môi trường ở mức trung tính và thời gian khảo sát càng tăng dần thì pH càng giảm xuống. Giá trị pH bắt đầu giảm mạnh tại thời điểm 16 giờ, lúc này giá trị pH khoảng 4,0 đồng thời từ thời điểm này đến thời điểm 48 giờ, giá trị pH giảm rất chậm. Điều này chứng tỏ vi khuẩn *L. plantarum* SC01 lên men nguồn đường sucrose làm cho pH môi trường giảm.

Yếu tố khảo sát thứ hai là sự tăng trưởng của vi khuẩn *L. plantarum* SC01 trong môi trường MRS OPTSC01 được xác định bằng giá trị OD bước sóng 600 nm và mật độ vi khuẩn lactic sống trong môi trường. Tại thời điểm 0 giờ, giá trị OD_{600nm} rất thấp, bắt đầu tăng lên từ thời điểm 12 giờ và tăng lên rất mạnh vào thời điểm 16 giờ. Giá trị OD_{600nm} đạt cao nhất tại thời điểm 28 giờ và sau đó bắt đầu giảm dần.

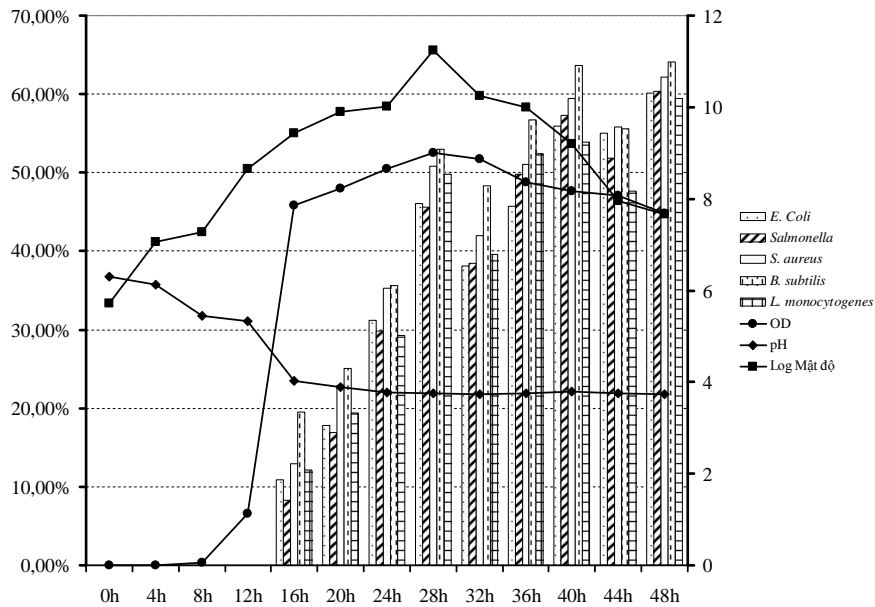
Đối với mật độ vi khuẩn sống, mật độ vi khuẩn *L. plantarum* SC01 ban đầu bổ sung vào là 10^6 cfu/ml và theo thời gian khảo sát thì mật độ sống của vi khuẩn tăng dần và đạt mật độ

cao nhất tại thời điểm 28 giờ rồi giảm dần ở các thời điểm còn lại.

Đối với khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01 trong môi trường MRS OPTSC01 theo thời gian thông qua tỷ lệ ức chế các chủng vi khuẩn chỉ thị, khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn tăng dần theo thời gian khảo sát và hoạt tính bắt đầu cao vào thời điểm 28 giờ. Từ thời điểm 28 giờ đến thời điểm 48 giờ, hoạt tính kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01 tăng dần.

Như vậy, theo đường cong tăng trưởng của vi khuẩn *L. plantarum* SC01 trong môi trường MRS OPTSC01, có thể nhận thấy, có hai thời điểm ảnh hưởng quan trọng đến sự sinh trưởng,

phát triển và sản sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01. Đầu tiên là thời điểm 16 giờ, đây là thời điểm vi khuẩn *L. plantarum* SC01 phát triển mạnh nhất và chính là giai đoạn chuyển tiếp từ phase lag sang phase log. Chính sự phát triển mạnh này làm cho pH của môi trường giảm mạnh từ mức trung tính xuống pH acid, đồng thời tại thời điểm này, vi khuẩn *L. plantarum* SC01 bắt đầu sản sinh các hợp chất kháng khuẩn. Thời điểm thứ hai là 28 giờ, đây là thời điểm mà sinh khối cũng như mật độ tế bào sống của *L. plantarum* SC01 trong môi trường cao nhất và hoạt tính của các hợp chất kháng khuẩn mà chúng sản sinh ra có khả năng ức chế mạnh đối với vi khuẩn chỉ thị so với các thời điểm trước đó.



Hình 1. Đường cong tăng trưởng của *L. plantarum* SC01 trên môi trường tối ưu

KẾT LUẬN

Từ sữa chua đã phân lập, tuyển chọn và định danh được chủng vi khuẩn *L. plantarum* SC01. Từ kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đã xác định được MRS OPTSC01 (bao gồm cao thịt bò (10 g/l), cao nấm men (5 g/l), trypton (10 g/l), sucrose (20 g/l), sodium acetate (5 g/l), K₂HPO₄ (4 g/l), ammonium citrate (2 g/l), MgSO₄ (0,2 g/l), MnSO₄ (0,05 g/l), Tween 80 (1 ml/l), pH môi trường là 6,0) là môi trường tối

ưu cho sự sinh các hợp chất kháng khuẩn của *L. plantarum* SC01. Đồng thời, kết quả khảo sát đường cong tăng trưởng của *L. plantarum* SC01 đã xác định được tại thời điểm 16 giờ, *L. plantarum* SC01 bắt đầu tăng trưởng mạnh đồng thời bắt đầu sinh hợp chất kháng khuẩn và thời điểm 28 giờ, hợp chất kháng khuẩn có hoạt tính mạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abbasiliasi S., Ramanan R. N., Ibrahim T. A. T., Mustafa S., Mohamad R., Daud H. H. M., Ariff A. B., 2011. Effect of medium composition and culture condition on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Lactobacillus paracasei* LA07, a strain isolated from budu. *Biotechnol. Biotec. Eq.*, 25(4): 2652-2657.
2. Ashmaig A., Hasan A., El Gaali E., 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss). *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3(8): 451-457.
3. De Carvalho A. A. T., Mantovani H. C., Paiva A. D., De Melo M. R., 2008. The effect of carbon and nitrogen sources on bovicin HC5 production by *Streptococcus bovis* HC5. *J. App. Microb.*, 107(1): 339-347.
4. Huot E., Barrena-Gonzalez C., Petitdemange H., 1996. Tween 80 effect on bacteriocin synthesis by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris J46. *Letters of Application Microbiology*, 22(4): 307-310.
5. Ishola R. O., Adebayo-Tayo B. C., 2012. Screening lactic acid bacteria isolated from Fermented food for Bio-molecules production. *Aust. J. Tech.*, 15(4): 205-217.
6. Karthikeyan V., Santhosh S. W., 2009. Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *Afr. J. Microb. Res.*, 3(5): 233-239.
7. Ogunbanwo S. T., Sanni A. I., Onilude A. A., 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.*, 2(7): 179-184.
8. Patil M. M., Mallesha, Pandey M. C., Ramana, K. V., 2011. Optimization of bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* MPK1 using response surface methodology. *Int. J. Environ. Sci.*, 2(2): 678-685.
9. Rattanachaiakunsopon P., Phumkhachorn P., 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 1(4): 218-228.
10. Todorov S. D., Dicks L. M. T., 2005. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technol. Biotech.*, 43(2): 165-173.
11. Todorov S. D., Oliveirab R. P. S., Vaz-Velho M., 2012. Media optimization of bacteriocin ST22Ch production by *Lactobacillus Sakei* ST22Ch isolated from Salpicao, a traditional meat-product from Portugal. *Chemical Engineering Transactions*, 27: 283-288.
12. Tomas M. S. J., Nader-Macias M. E., 2007. Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic *Lactobacilli*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1: 732-739.
13. Thomas L. V., Ingram R. E., Bevis H. E., Davies A., Milne C. F., Delves-Broughton J., 2002. Effective use of nisin to control *Bacillus* and *Clostridium* spoilage of a pasteurized mashed potato product. *J. Food. Protect*, 65: 1580-1585.
14. Usmiati S., Marwati T., 2009. Selection and optimization process of bacteriocin production from *Lactobacillus* sp. *Indonesian Journal of Agriculture*, 2(2): 82-92.
15. Vaseeharan B., Ramasamy P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *The Society for Applied Microbiology*, 36(2): 83-87.
16. Yang Z., 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Department of Food Technology, University of Helsinki.

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FACTORS AFFECTING
ANTIMICROBIAL COMPOUND PRODUCTION OF
*Lactobacillus plantarum***

Le Ngoc Thuy Trang, Pham Minh Nhut

Ho Chi Minh University of Technology

SUMMARY

Eight strains of lactic acid bacteria were isolated from the traditional fermented foods such as handmade yoghurt, fermented pork roll, pickle, kimchi, sour bamboo shoots and eggplants. The result of screening selected lactic acid bacteria SC01 which have high antagonistic activity and produce strong antibacterial compound against some indicator bacteria such as *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. The result of sequencing 16S rDNA showed the SC01 was *Lactobacillus plantarum*. Studying antibacterial compound production of *L. plantarum* SC01 on some different media revealed the best medium for *L. plantarum* SC01 was modified MRS broth. Studying influence of temperature, pH, NaCl concentration and MRS medium composition identified MRS OPTSC01 medium containing nitrogen sources (beef extract (10 g/l)), yeast extract (5 g/l), trypton (10 g/l), carbon source (sucrose (20 g/l)), sodium acetate (5 g/l), K_2HPO_4 (4 g/l), ammonium citrate (2 g/l), $MgSO_4$ (0.2 g/l), $MnSO_4$ (0.05 g/l) and Tween 80 (1 ml/l), pH=6.0; temperature 37°C. On this optimal medium, the growth curve of *L. plantarum* SC01 was established to evaluate the production of antibacterial compound. The result indicated that *L. plantarum* SC01 grew strongly and produced highly antagonistic antibacterial compound at 28th hour. The research results is a prerequisite for the study of antimicrobial compounds extracted from *L. plantarum* to applications in food preservation and animal disease prevention.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, antagonistic, antibacteria, lactic bacteria.

Ngày nhận bài: 15-7-2013