

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH THU NHẬN BACTERIOCIN TỪ CHỦNG *Bacillus safensis* NBRC 100820

Đến tòa soạn 21-11-2022

Nguyễn Thị Thanh Huyền, Trần Thị Thanh Thảo, Bùi Đình Nhi*, Nguyễn Thị Hiền

Khoa Công nghệ Hóa học và Môi Trường, Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

*Email: nhibd@vui.edu.vn

SUMMARY

STUDY ON BACTERIOCIN COLLECTION FROM *Bacillus safensis* NBRC 100820

*In this paper, the process of bacteriocin collection from Bacillus safensis NBRC 100820 was studied. By using this procedure, 20 ml of the purified bacteriocin was recovered from 1.0 l of the initial culture medium. The product has a protein concentration of 17.5 ± 0.2 mg/ml, a pH of about 5.0 ± 0.2 and active unit of 732.2 AU/mg. Physico-chemical and microbiological parameters of the recovered bacteriocin after purification showed that product did not contain pathogenic microorganisms *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, coliforms, yeasts and molds, and heavy metals Hg, As, Pb, Cd. The product conform to the standards on food additives according to TCVN 10637:2015.*

Keywords: bacteriocin, activity unit, *Bacillus safensis*, procedure

1. MỞ ĐẦU

Bacteriocin là phức hợp kháng khuẩn không đồng nhất, khác nhau về hoạt tính, cơ chế hoạt động, trọng lượng phân tử, tính chất hóa lý, nhưng tóm lại thành phần protein là thành phần hoạt động sinh học chính của tất cả các loại bacteriocin [1]. Nó có thể ức chế một cách hiệu quả các vi sinh vật làm hư hỏng thực phẩm và nhiều loại vi sinh vật gây bệnh khác [2-4].

Các bacteriocin có thể được tạo ra bởi một số lượng lớn các loài vi khuẩn bao gồm cả vi khuẩn Gram dương cũng như vi khuẩn Gram âm [5]. Tuy nhiên được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi nhất là các bacteriocin được chiết xuất từ các chủng thuộc chi *Bacillus* và *Lactobacillus* do chúng có chứng nhận an toàn GRAS của FDA, cho phép ứng dụng để làm chất bảo quản sinh học trong ngành công nghiệp thực phẩm [6, 7]. Trong đó chi *Bacillus* đang ngày càng được nhiều nhà khoa học quan tâm trong việc nghiên cứu để sản xuất

bacteriocin như *Bacillus subtilis* [8, 9], *Bacillus amyloliquefaciens* [10], *Bacillus thuringiensis* [11]...

Chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820 được phân lập từ bề mặt hành tây [12], khi nuôi cấy trong các điều kiện tối ưu [13] đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn khá cao. Do đó mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng quy trình chiết xuất và tinh chế bacteriocin từ chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820, đồng thời đánh giá tính chất của bacteriocin thu hồi được

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820 được phân lập từ bề mặt hành tây [12] và được nuôi cấy trong các điều kiện tối ưu [13].

2.2. Hóa chất và thiết bị

2.2.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng cho nghiên cứu là các hóa chất tinh khiết (Trung Quốc), được sử dụng ngay không qua tinh chế.

2.2.2. Thiết bị

- Máy đo quang phổ
- Nồi hấp tiệt trùng ALP
- Tủ ẩm Memmert
- Máy đo vòng vô khuẩn IUL.
- Tủ cấy vô trùng Sanyo
- Máy ly tâm lạnh varispin
- Máy lắc Vortex IKA
- Hệ thống tinh sạch protein AKTA FPLC
- Thiết bị lên men 5 Lít Liflax GX

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Bổ sung phương pháp phân lập vi khuẩn trên hành tây.

Sử dụng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch theo Zokaeifar et al. [14] có hiệu chỉnh để kiểm tra khả năng kháng khuẩn của bacteriocin. Các chủng vi sinh vật kiểm định để xác định khả năng kháng khuẩn gồm *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *coliforms*, nấm men *S. cerevisiae* và nấm mốc *A. fumigatus*.

Xác định hoạt tính của bacteriocin [15]: Một đơn vị hoạt tính (activity unit (AU)) của bacteriocin được định nghĩa là 1 đơn vị diện tích của vùng ức chế (mm²) mà 1 mL dịch thử nghiệm tạo ra. Công thức tính:

$$\text{Đơn vị hoạt tính (AU/mL)} = (S_1 - S_2)/V_1$$

Trong đó:

S₁: diện tích vòng kháng khuẩn (mm²);

S₂: diện tích lỗ giếng (mm²)

V₁: thể tích mẫu cho vào lỗ giếng (μL)

Xác định protein tổng số theo phương pháp Bradford [16]: 1 mL thuốc thử (0,01 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 hòa tan trong 5 mL ethanol 95% và 10 mL phosphoric acid 85%) được bổ sung vào ống nghiệm có chứa 20 μL mẫu, lắc đều và để ở nhiệt độ phòng khoảng 5 - 10 phút. Sau đó, tiến hành đo độ hấp thụ quang của các mẫu ở bước sóng 595 nm. Dụng đường chuẩn protein từ dung dịch Albumin có nồng độ gốc 1 mg/mL. Các chỉ số đo được của mẫu thí nghiệm được đối chiếu với đồ thị chuẩn để xác định hàm lượng protein.

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Quy trình thu nhận chế phẩm bacteriocin từ chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820

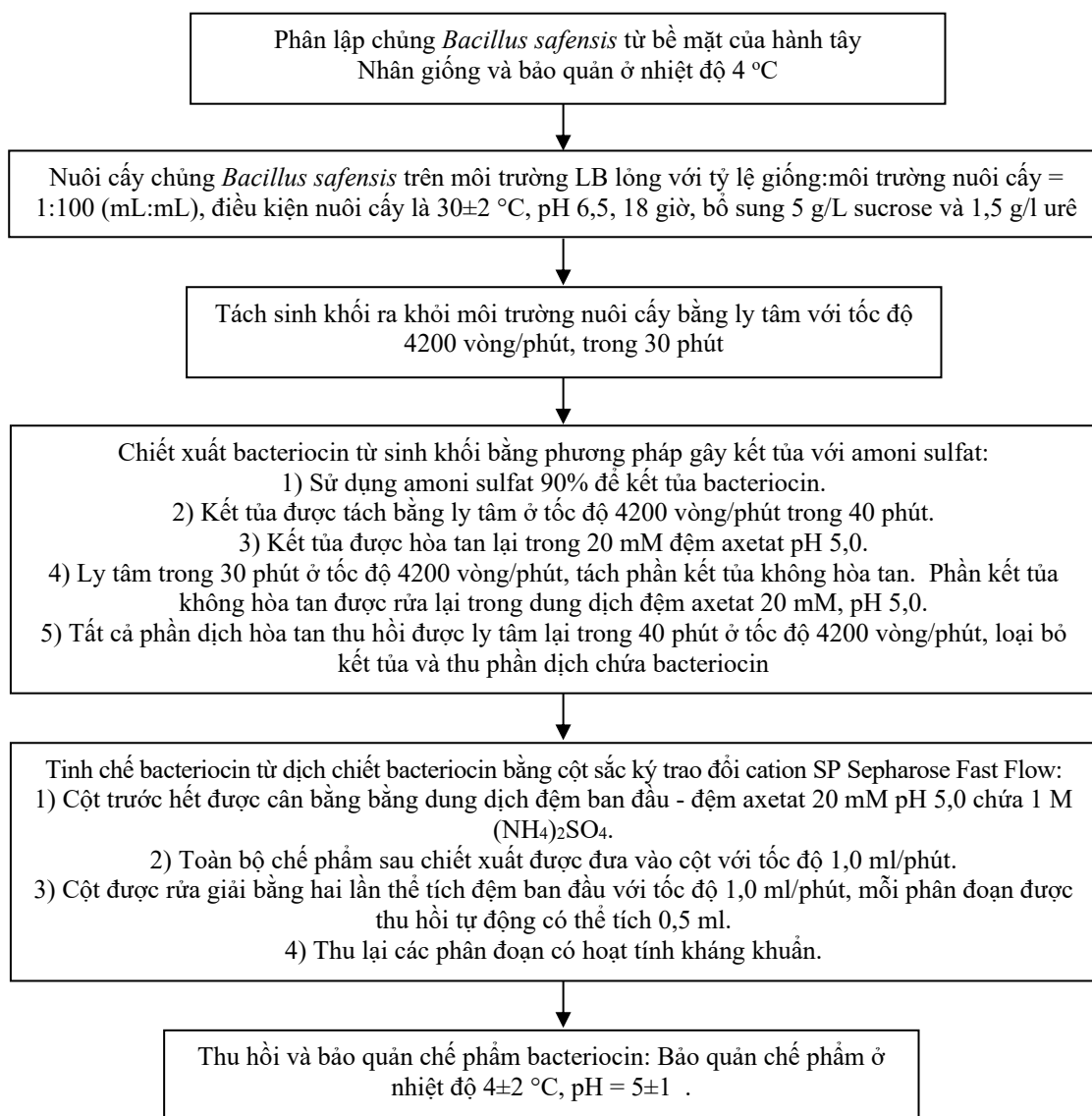
Dựa vào kết quả đã nghiên cứu, tiến hành xây dựng quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm bacteriocin giúp bảo quản rau củ tươi, quy trình được thực hiện theo sơ đồ 1.

Quy trình công nghệ sản xuất bao gồm các bước sau:

+ Bước 1. Phân lập, nhân giống và bảo quản chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820 từ bề mặt của hành tây: hành tây được rửa kỹ bằng nước cất, cắt nhỏ trong điều kiện vô trùng. Sử dụng mẫu nhỏ đã rửa sạch chà nhẹ phần vỏ ngoài lên bề mặt của đĩa Petri chứa môi trường dinh dưỡng thạch LB. Các đĩa được ủ tĩnh ở nhiệt độ 30±2 °C trong 24 giờ. Quá trình sàng lọc được thực hiện và tiến hành đến khi thu được chủng vi sinh vật thuần khiết [12].

+ Bước 2. Nuôi cấy và thu nhận sinh khối chủng *Bacillus safensis*: chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820 được nuôi cấy trên môi trường LB với tỷ lệ giống:môi trường nuôi cấy = 1:100 (mL:mL), điều kiện nuôi cấy là 30±2 °C, pH 6,5, 18 giờ, bổ sung 5 g/L sucrose và 1,5 g/L urê. Sau đó sinh khối của chủng *Bacillus safensis* được tách ra khỏi môi trường dinh dưỡng bằng phương pháp ly tâm với tốc độ 4200 vòng/phút trong 30 phút [13].

+ Bước 3. Chiết xuất bacteriocin từ sinh khối của chủng *Bacillus safensis* bằng phương pháp gây kết tủa với amoni sulfat: Cho amoni sulfat 90% vào sinh khối để kết tủa bacteriocin. Kết tủa được tách ra bằng phương pháp ly tâm ở tốc độ 4200 vòng/phút trong 40 phút. Kết tủa sau đó được hòa tan lại trong 20 mM đệm axetat pH 5,0. Ly tâm dung dịch hòa tan trong 30 phút ở tốc độ 4200 vòng/phút, tách phần kết tủa không hòa tan. Sau đó, phần kết tủa không hòa tan được rửa lại trong dung dịch đệm axetat 20 mM, pH 5,0. Cuối cùng, tất cả phần dịch hòa tan thu hồi được ly tâm lại trong 40 phút ở tốc độ 4200 vòng/phút, loại bỏ kết tủa và thu phần dịch chứa bacteriocin...



Sơ đồ 1. Sơ đồ công nghệ thu nhận chế phẩm bacteriocin từ chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820

+ Bước 4. Tinh chế bacteriocin từ dịch chiết bacteriocin bằng cột sắc ký trao đổi cation SP Sepharose Fast Flow: Cột trước hết được cân bằng bằng dung dịch đệm ban đầu - đệm axetat 20 mM pH 5,0 chứa 1 M (NH₄)₂SO₄. Toàn bộ chế phẩm sau chiết xuất được đưa vào cột với tốc độ 1,0 mL/phút. Cột được rửa giải bằng hai lần thể tích đệm ban đầu với tốc độ 1,0 mL/phút, mỗi phân đoạn được thu hồi tự động có thể tích 0,5 mL. Thu lại các phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn.

+ Bước 5. Thu hồi và bảo quản chế phẩm bacteriocin: Bảo quản chế phẩm ở nhiệt độ 4±2 °C, pH = 5±1.

3.2. Thu nhận cách đánh giá tính chất chế phẩm sinh học bảo quản rau củ

Theo như quá trình thu nhận chế phẩm sinh học bảo quản rau củ được thực hiện theo như Sơ đồ 1, việc nuôi cấy chủng *Bacillus safensis* NBRC 100820 trên môi trường dinh dưỡng lỏng LB với tỷ lệ giống:môi trường nuôi cấy = 1:100 (mL:mL). Với mỗi 1000 ml môi trường nuôi cấy ban đầu với nồng độ protein là 4,86 mg/mL, sau khi chiết xuất bằng phương pháp ngâm tạo kết tủa bằng muối amoni sulfat sẽ thu được 60 mL dịch chiết có nồng độ protein là 30,3 mg/mL và đơn vị hoạt tính là 21,6 AU/mg,

dịch chiết sau đó được tinh chế bằng cột sắc ký trao đổi cation SP Sepharose Fast Flow thu được 20 mL dịch bacteriocin tinh (chế phẩm sinh học).

Một số đặc tính cảm quan, lý hóa của chế phẩm bacteriocin tinh thu được từ quá trình trên được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc tính cảm quan, lý hóa của chế phẩm bacteriocin

STT	Tên chỉ số	Giá trị
1	Trạng thái vật lý	Chất lỏng trong mờ
2	Mùi, vị	Không có mùi và vị rõ rệt
3	Màu sắc	Màu vàng nhạt
4	Nồng độ protein, mg/ml	17,5±0,2
5	Độ pH	5,0±0,2
6	Đơn vị hoạt tính, AU/mg	732,2

Phân tích dữ liệu Bảng 1 cho thấy, chế phẩm sinh học thu nhận được là chất lỏng trong mờ, không có mùi và vị rõ rệt, và có màu vàng nhạt. Nồng độ protein trong chế phẩm là 17,5±0,2 mg/mL, độ pH của chế phẩm khoảng 5,0±0,2 và đơn vị hoạt tính là 732,2 AU/mg. Chế phẩm thu hồi có hoạt tính gần tương đương với hoạt tính của bacteriocin thu hồi từ chủng *Lactobacillus plantarum* ZJ316 [17] và cao hơn khá nhiều so với bacteriocin thu hồi từ chủng *Lactobacillus plantarum* ZJ217 [18].

Tiếp theo, tiến hành nghiên cứu về các thông số vi sinh của chất bảo quản sinh học nhằm xác định sự hiện diện của vi khuẩn đường ruột *E. coli*, vi sinh vật gây bệnh *Salmonella*, *Staphylococcus*, cũng như sự hiện diện của nấm men và nấm mốc (Bảng 2).

Bảng 2. Chỉ tiêu vi sinh của chế phẩm bacteriocin

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Tiêu chuẩn cho phép (TCVN 10637:2015)	Giá trị thực tế
1	<i>Coliform</i> tổng số	CFU/g	≤ 30	KPH
2	<i>Escherichia coli</i>	CFU/25g	KPH	KPH
3	<i>Salmonella</i>	CFU/25g	KPH	KHP
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/g	-	KPH
5	Nấm men, nấm mốc	CFU/g	-	KPH

Ghi chú: dấu – thể hiện việc chỉ tiêu không quy định trong TCVN

Theo kết quả nghiên cứu về các thông số vi sinh được trình bày trong Bảng 2, có thể kết luận rằng chất bảo quản sinh học được sản xuất không chứa vi khuẩn đường ruột *Escherichia*

coli và các vi sinh vật gây bệnh như *Salmonella* và *Staphylococcus aureus*. Các chỉ tiêu còn lại đều đạt theo TCVN 10637:2015 như hàm lượng *Coliform* tổng số, nấm men và nấm mốc.

Bảng 3. Hàm lượng kim loại nặng trong chế phẩm bacteriocin

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Tiêu chuẩn cho phép (TCVN 10637:2015)	Giá trị thực tế
1	Cd	mg/kg	-	KPH
2	Pb	mg/kg	≤ 50	KPH (< 0,002)
3	As	mg/kg	-	KPH (< 0,003)
4	Hg	mg/kg	-	KPH (< 0,002)

Để xác định mức độ an toàn của sản phẩm và xác định sự phù hợp của sản phẩm với các tiêu chuẩn về phụ gia thực phẩm theo TCVN 10637:2015, hàm lượng các kim loại nặng đã được nghiên cứu, kết quả được thể hiện trong

Bảng 3. Dữ liệu thu được chỉ ra rằng chất bảo quản sinh học không chứa hoặc chứa ở nồng độ cho phép đối với các kim loại nặng độc hại được nghiên cứu.

Bảng 4. Sự thay đổi chỉ tiêu vi sinh của chế phẩm bacteriocin vào thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản, tháng	Chỉ tiêu vi sinh				
	<i>Coliform</i> tổng số, CFU/g	<i>Escherichia coli</i> , CFU/25g	<i>Salmonella</i> , CFU/25g	<i>Staphylococcus aureus</i> , CFU/g	Nấm men, nấm mốc, CFU/g
0	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
2	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
4	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
6	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
8	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
10	<10 ²	<10 ¹	KPH	KPH	<10 ¹

Kết quả nghiên cứu thời gian bảo quản chế phẩm bacteriocin (Bảng 4) cho thấy, chỉ số *Coliform* tổng số trong 8 tháng bảo quản chế phẩm sinh học đáp ứng các tiêu chuẩn yêu cầu, nhưng bắt đầu vượt quá giá trị cho phép sau 10 tháng lưu trữ. Nấm men, nấm mốc và vi khuẩn thuộc nhóm *Escherichia coli* cũng bắt đầu được quan sát thấy sau 10 tháng bảo quản. Các vi sinh vật gây bệnh *Salmonella* và *Staphylococcus aureus* không phát hiện thấy trong quá trình bảo quản. Do đó, có thể xác định được rằng thời hạn sử dụng cho phép của chế phẩm sinh là 10 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 ± 2 °C.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình tổng quát thu nhận chế phẩm bacteriocin. Từ quy trình xây dựng được tiến hành sản xuất bacteriocin từ 1,0 L môi trường nuôi cấy ban đầu, kết quả đã thu hồi được 20 mL chế phẩm bacteriocin sau tinh chế. Đã tiến hành phân tích các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật của chế phẩm bacteriocin sau tinh chế thu hồi được. Kết quả cho thấy chế phẩm không chứa các vi sinh vật gây bệnh như *E. coli*, *Salmonella*, *S. arueus*, *coliforms*, nấm men và

nấm mốc, đồng thời chế phẩm cũng không chứa các kim loại nặng như Hg, As, Pb, Cd.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin gửi lời chân thành cảm ơn đến Bộ Công Thương đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S.Q. Ovais, Y. Basharat, K.S. Abhaya, (2015). Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks—A review. *Cogent Food & Agriculture*, **1**, 1121606.

[2] J.Lorenzo, (2018). Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability. *Innovative Technologies for Food Preservation*, **1**, 53–107.

[3] H. Zhang, (2021). Unravelling the fruit microbiome: The key for developing effective biological control strategies for postharvest diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*, **20(5)**, 4906-4930.

[4] T.P. Mamphogoro, (2020). Bacterial communities associated with the surface of fresh sweet pepper (*Capsicum annum*) and

their potential as biocontrol. *Scientific Reports*, **10**, 8560.

[5] J. Juan, (2021). Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria Against Phytopathogenic Fungi Isolated from Cherry Tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). *Curr Microbiol*, **78**(4), 1399-1408.

[6] S.A. Shinkafi, H. Dauda, (2013). Antibacterial Activity of *Allium Cepa* (Onion) On Some Pathogenic Bacteria Associated With Ocular Infections. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, **3**, 147-151.

[7] R. Koffi-Nevry, (2012). Antibacterial Activity of Two Bell Pepper Extracts: *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens*. *International Journal of Food Properties*, **15**, 961-971.

[8] L. Cheng, (2014). Microbial diversity and flavor formation in onion fermentation. *Food & Function*, **5**(9), 2338-47.

[9] M.J. Foysala, A.K. Lisa, (2018). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *J Genet Eng Biotechnol.*, **16**(2), 387–392.

[10] B. Taroub, (2019). Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and in vitro detoxification of ochratoxin A. *Annals of Microbiology*, **69**, 17–27.

[11] D.N. Suhartiningsih, L.W. Dipta, (2020). The exploration of *Bacillus* spp. as antagonist agents against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* from the weed phyllosphere in soybean plantation. *J. of Trop. Ind. Agr. and Rural Development*, **1**, 17-26.

[12] Bùi Đình Nhi, Vũ Đình Ngo, Đàm Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Kim Thoa, (2022).

Nghiên cứu phân lập chủng vi khuẩn *Bacillus* từ bề mặt hành tây, cà chua và ớt chuông. *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **27** (1), 128-133.

[13] Bùi Đình Nhi, Trần Thị Hằng, Trần Thị Thủy Nga, Ngô Hồng Nghĩa, (2022). Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy giúp tăng khả năng sản xuất sinh khối của một số chủng *Bacillus* spp. *Tạp chí Phân tích Hóa, lý và sinh học*, **27** (1), 143-147.

[14] Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A. and Saad, C. R., (2012). Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. *The Journal of Antibiotics*, **65**(6), 289-294.

[15] Alagu Thirumurugan, Rajaguru Sheela, and Amaresh Kumar Singh, (2019.) Growth profile and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ATM11 isolated from slaughterhouse soil. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **41** (1), 37-44.

[16] Bradford, M.M, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, **72**, 248–254.

[17] Lin Chen et. al., (2018). Purification and Characterization of Plantaricin ZJ316, a Novel Bacteriocin against *Listeria monocytogenes* from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Journal of Food Protection*, **81**(12), 1929–1935.

[18] Xuan Zhu, Lei Shen, Jiao Liu, Chen Zhang and Qing Gu, (2015). Purification of a Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* ZJ217 Active Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Eng.*, **11**(1), 51–59.