

NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH *Pediococcus* sp. DH6.4 SINH TỔNG HỢP BACTERIOCIN

Nguyễn Thị Lâm Đoàn^{1,*}, Đặng Thảo Yến Linh²

TÓM TẮT

Bacteriocin được sinh tổng hợp bởi vi khuẩn lactic là chất kháng khuẩn an toàn, không gây dị ứng và không gây hại cho sức khỏe con người, được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như công nghệ thực phẩm, nông nghiệp, y tế... Chính vì vậy, nghiên cứu thực hiện với mục tiêu xác định một số đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân tích trình tự gen *pheS* của chủng *Pediococcus* sp. DH6.4. Kết quả cho thấy, chủng DH6.4 thuộc loài *Pediococcus acidilactici*. *Pediococcus acidilactici* DH6.4 có khả năng sinh chất kháng khuẩn có bản chất là bacteriocin thể hiện hoạt tính kháng mạnh *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 11,41 - 17,30 mm. Nghiên cứu đã xác định nhiệt độ và pH_{bd} nuôi cấy tối ưu *Pediococcus acidilactici* DH6.4 để thu hoạt tính bacteriocin cao nhất là 30°C, pH_{bd} = 7. Chủng này có thể ứng dụng trực tiếp hoặc tách chất kháng khuẩn bacteriocin để ứng dụng trong bảo quản và chế biến thực phẩm.

Từ khóa: *Pediococcus*, bacteriocin, hoạt tính kháng khuẩn, *pheS* gen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacteriocin là chất kháng khuẩn có bản chất là peptide hay protein do vi khuẩn sản sinh được tổng hợp ở ribosome. Chúng có khả năng tiêu diệt các vi khuẩn có liên quan chặt chẽ và cả các vi khuẩn không liên quan [1], được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như sử dụng làm chất bảo quản sinh học trong công nghệ thực phẩm [2], hoặc các chất bổ sung tăng trưởng động vật, thực vật hay các chế phẩm sinh học trong nông nghiệp [3]. Trong lĩnh vực y tế, bacteriocin đang được tập trung nghiên cứu thử nghiệm trong liệu pháp điều trị nhiễm trùng và ung thư [1]. Phần lớn bacteriocin tổng hợp bởi vi khuẩn Gram + đặc biệt là từ vi khuẩn lactic xem là nhóm an toàn [4].

Pediococcus là một trong các chi của vi khuẩn lactic, có khả năng tạo ra một số bacteriocin (pediocin) hoạt động chống lại các vi khuẩn có mối quan hệ họ hàng gần và một số các nhóm vi khuẩn gây bệnh và gây thối hỏng thực phẩm. Chúng không chỉ được sử dụng trong bảo quản

thực phẩm mà còn làm tác nhân trị liệu [5], [6]. Hơn nữa, bacteriocin của chúng có nhiều đặc điểm lý tưởng có thể sử dụng trong bảo quản thực phẩm như bền trong nhiệt độ chế biến cao, hoạt động trong phạm vi pH và nồng độ muối rộng [7], [8]. Do có bản chất là peptide hay protein, bacteriocin bị phân giải dễ dàng trong quá trình tiêu hóa và không gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người [9]. Hơn nữa, bacteriocin thường không gây ra những thay đổi trong sản phẩm thực phẩm và có thể được sử dụng bổ sung trong chế biến thực phẩm, giảm cường độ của các phương pháp xử lý truyền thống như gia nhiệt [10].

Hiện nay, vi khuẩn lactic sinh bacteriocin vẫn được các nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm với hy vọng tìm được chủng loài tạo ra bacteriocin mới, hướng tới những ứng dụng trong bảo quản và chế biến thực phẩm tươi sống, đồ hộp, nhiều sản phẩm lên men và không lên men khác [11]. Chính vì vậy, nghiên cứu định danh chủng *Pediococcus* sp. DH6.4 sinh tổng hợp bacteriocin được thực hiện với mong muốn có thể sử dụng trực tiếp chủng hoặc tách chiết bacteriocin của chúng định hướng ứng dụng trong bảo quản và chế biến thực phẩm.

¹ Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Trung tâm Công nghệ Vật liệu, Viện Ứng dụng công nghệ

*Email:nlldoan@hus.edu.vn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Chúng vi khuẩn

Chúng *Lactobacillus plantarum* JCM 1149, *Bacillus cereus* ATCC 21778, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 và *Samonella typhimurium* ATCC 13076 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chúng *Pediococcus* sp. DH6.4 được bảo quản trong môi trường MRS với 40% glycerol ở - 20°C phân lập từ nem chua.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường dùng để nuôi cấy và hoạt hóa các chủng vi khuẩn lactic MRS (Man Rogosa Sharpe) dịch thể (g/l). Pepton: 10; cao thịt: 10; cao nấm men: 5; glucose: 20; CH₃COONa: 5; K₂HPO₄: 2; Aminocitrate: 2; Mg₂SO₄. 7H₂O: 0,2; nước: 1l; pH = 6,7. Môi trường LB để nuôi cấy vi sinh vật kiểm định [12].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu định danh chủng *Pediococcus* sp. DH6.4

2.2.1.1. Xác định một số đặc điểm của chủng

Chúng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trên môi trường MRS agar, sau 18 - 24 giờ, tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc. Hình dạng tế bào được quan sát trên tiêu bản nhuộm Gram. Ngoài ra, catalase, khả năng di động và lên men một số loại đường cũng được kiểm tra [13].

2.2.1.2. Phân tích trình tự gen *pheS*

Phương pháp xác định trình tự gen *pheS* được dùng để xác định loài vi khuẩn *Pediococcus* sp. DH6.4 được mã hóa (R42607) như miêu tả của Nguyen và cs (2013) [14].

Tách chiết ADN: ADN genomic của chủng được tách chiết theo phương pháp của Gevers và cs (2001) [15]. Chất lượng và độ tinh sạch ADN được kiểm tra bằng cách điện di trên gel 1,0% w/v agarose trong 45 phút ở điện thế 75V của 5,0 μL ADN trộn với 2,0 μL loading dye.

Khuếch đại PCR cho giải trình tự gen *pheS*: Đoạn gen *pheS* được nhân lên với mỗi xuôi là *pheS* 21F (5'-CAYCCNGCHCGYGYATGC-3') và mỗi

ngược *pheS* 22R (5'-CCWARVCCRAARGCAAAR CC-3') [16]. Phản ứng được tiến hành với ADN pha loãng (OD=1,0). Thể tích PCR của 50 μl gồm: 5,0 μl của 10x PCR buffer (15 mM MgCl₂), 5,0 μl deoxynucleoside triphosphates (2 mM của mỗi loại dNTP), 0,5 μL của mỗi môi (50 μM), 1 μL Taq polymerase (1U μl⁻¹), 37 μL nước cất và 1 μl của dung dịch ADN. Sử dụng máy GenAmp PCR 9600 thermocycler (Applied Biosystem). Chu trình nhiệt bao gồm: (1) 5,0 phút ở 95°C, (2) 3 chu trình 1,0 phút ở 95°C + 2,0 phút 15 giây ở 46°C + 1,0 phút 15 giây ở 72°C, 30 chu trình 35 giây ở 95°C + 1,0 phút 15 giây ở 46°C + 1,0 phút 15 giây ở 72°C, (4) cuối cùng 7,0 phút 72°C [16]. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách lấy 5 μl sản phẩm PCR với 2,0 μl của loading dye, điện di trên gel agarose 1,0% ở 75V trong 45 phút. Marker sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing, Bỉ.

Sau khi kiểm tra nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch nhờ hệ thống màng lọc Nucleofast 96 PCR (Macherey - Nagel). Để giải trình tự gen *pheS* sản phẩm PCR vừa tinh sạch ở trên sẽ được chạy PCR lần thứ hai. Sau đó, 10 μl sản phẩm PCR cho mỗi xuôi và 10 μl sản phẩm PCR cho mỗi ngược được chuyển vào 02 giếng của đĩa 96 giếng và thêm 45 μl dung dịch SAM, 10 μl XTerm. Giải trình tự được thực hiện nhờ máy ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem) [14].

Số liệu trình tự thô được chuyển đến AutoAssemble software 1.40 (applied Biosystem), trình tự liên tục của gen *pheS* được xác định bằng chương trình Bionumeric 5.1 (Applied Maths). Trình tự gen so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Đại học Gent (Bỉ), so sánh chuỗi ADN này với ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế để xác định loài có mối liên quan gần nhất [14].

2.2.2. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn kiểm định của chủng *Pediococcus* sp. DH6.4

Khả năng kháng vi khuẩn kiểm định theo phương pháp khuếch tán trên thạch được miêu tả bởi Hernandez và cs (2005) [17] với các vi khuẩn kiểm định *Lactobacillus plantarum* JCM 1149, *Bacillus cereus* ATCC 21778, *Listeria*

monocytogenes ATCC 35152 và *Samonella yphimurium* ATCC 13076 [17]. Khả năng kháng khuẩn của chủng được xác định tại thời điểm nuôi cấy 18 - 20 giờ ở 30°C trong môi trường MRS lỏng. Hoạt tính kháng khuẩn được thể hiện qua vòng kháng khuẩn xuất hiện quanh giếng thạch và được xác định bằng hiệu số giữa đường kính vòng kháng khuẩn và đường kính giếng thạch D - d (D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính giếng thạch (mm)).

2.2.3. Kháng định *Pediococcus* sp. DH6.4 sinh bacteriocin

Dịch nuôi cấy các chủng tại thời điểm nuôi cấy 18 - 20 giờ sau khi đã thử có hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán thạch được xử lý với enzyme protease K theo Marwa và cs (2015) [18], với nồng độ 1 mg/ml dịch nuôi cấy, giữ ở 37°C trong thời gian 2 giờ, sau đó đun nóng ở 100°C trong 3 phút để loại bỏ các tác động còn lại của protease K. Mẫu được kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch như đã mô tả ở mục 2.2.2 với vi khuẩn chỉ thị *Lactobacillus plantarum* JCM 1149. Nếu giếng thạch không thể hiện khả năng kháng khuẩn cho thấy, chất kháng khuẩn có thể có bản chất là protein nên đã bị phân giải bởi protease K. Đối chứng (ĐC) là chỉ có dịch nuôi cấy chủng DH6.4 không bổ sung enzyme.

2.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp bacteriocin của chủng *Pediococcus* sp. DH6.4

2.2.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Chủng DH6.4 được nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể ở các nhiệt độ 10°C; 20°C; 25°C; 30°C; 37°C; 40°C; 45°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, xác

định khả năng sinh trưởng (OD_{620nm}), hoạt tính bacteriocin (AU/mL) [19], [20].

2.2.4.2. pH ban đầu môi trường nuôi cấy

Chủng DH6.4 được nuôi trong môi trường MRS dịch thể có dải pH: 4; 5; 6; 6,7; 7; 8; 9; 10 và nuôi ở điều kiện nhiệt độ tối ưu đã xác định ở thí nghiệm 2.2.5.1. Sau 24 giờ nuôi cấy, lấy dịch nuôi cấy ra và xác định các thông số OD_{620nm}, hoạt tính bacteriocin (AU/mL) [19].

2.2.5. Phương pháp xác định đơn vị hoạt tính bacteriocin

Dịch nuôi cấy vi khuẩn được pha loãng theo hệ số 2 và nhỏ vào các giếng trên đĩa môi trường MRS đã chứa vi khuẩn kiểm định *Lb. plantarum* JCM 1149. Sau 24 giờ, hoạt tính bacteriocin (AU/ml) được tính theo công thức: (AU/ml) = $2^n \times 1000/V$ [21], [22].

Trong đó: 2^n là độ pha loãng theo hệ số 2 lớn nhất của mẫu còn xuất hiện vòng kháng khuẩn; V là thể tích dịch nuôi cấy đã nhỏ (μl).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu định danh chủng *Pediococcus* sp. DH6.4

3.1.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và một số đặc điểm khác của chủng *Pediococcus* sp. DH6.4

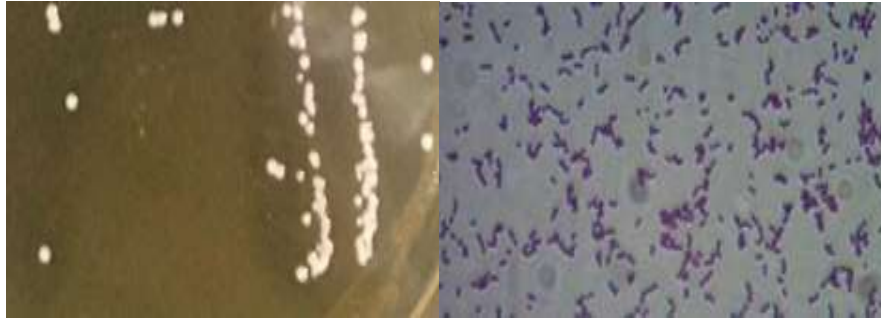
Khuẩn lạc chủng DH6.4 hình tròn lồi, màu trắng, d >1 mm, tế bào hình cầu, sắp xếp đôi, tứ hoặc đám, vi khuẩn Gram +, catalase âm tính, không di động. Có khả năng lên men đường glucose, lactose, ribose không có khả năng lên men đường maltose (Bảng 1 và hình 1). Các đặc điểm trong bảng 1 so sánh với bảng phân loại của Holland và cs (2011) [23], chủng này bước đầu có thể xếp thuộc chi *Pediococcus*.

Bảng 1 Một số đặc điểm của chủng vi khuẩn DH6.4

Các chỉ tiêu		Đặc điểm của chủng DH6.4
1. Khuẩn lạc	- Hình dạng	Tròn lồi
	- Màu sắc	Màu trắng
	- Kích thước	d>1 mm
2. Tế bào	- Hình dạng	Hình cầu
	- Sắp xếp tế bào	Xếp đôi, tứ hoặc đám

3. Nhuộm Gram		+
4. Di động		-
5. Hoạt tính catalase		-
6. Khả năng lên men một số đường	Glucose	+
	Lactose	+
	Ribose	+
	Maltose	-

Ghi chú: + Có khả năng; - không có khả năng.



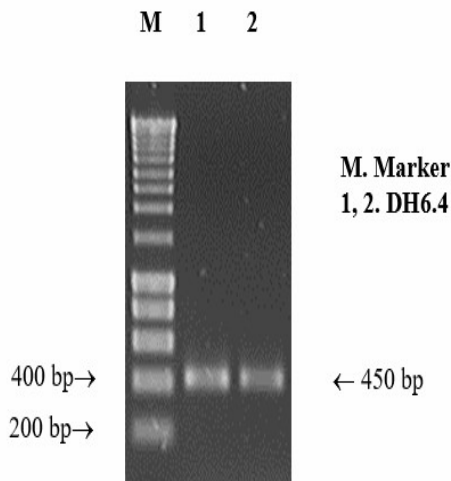
a. Hình thái khuẩn

b. Hình thái tế bào

Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn DH6.4

3.1.2. Phân tích trình tự gen *pheS*

3.1.2.1. Sản phẩm PCR đoạn gen *pheS*



Hình 2. Sản phẩm PCR đoạn gen *pheS* của chủng DH6.4 trên gel agarose 1,0%

Sau khi ADN của chủng DH6.4 được tách chiết, tiến hành nhân đoạn gen *pheS* với các đoạn mồi và theo các bước như ở mục 2.2.1.2.

Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được một băng khoảng 450 bp (Hình 2) tương ứng với kích thước của đoạn gen *pheS* [24].

3.1.2.2. Giải trình tự ADN của chủng *Pediococcus* sp. DH6.4 và xác định loài

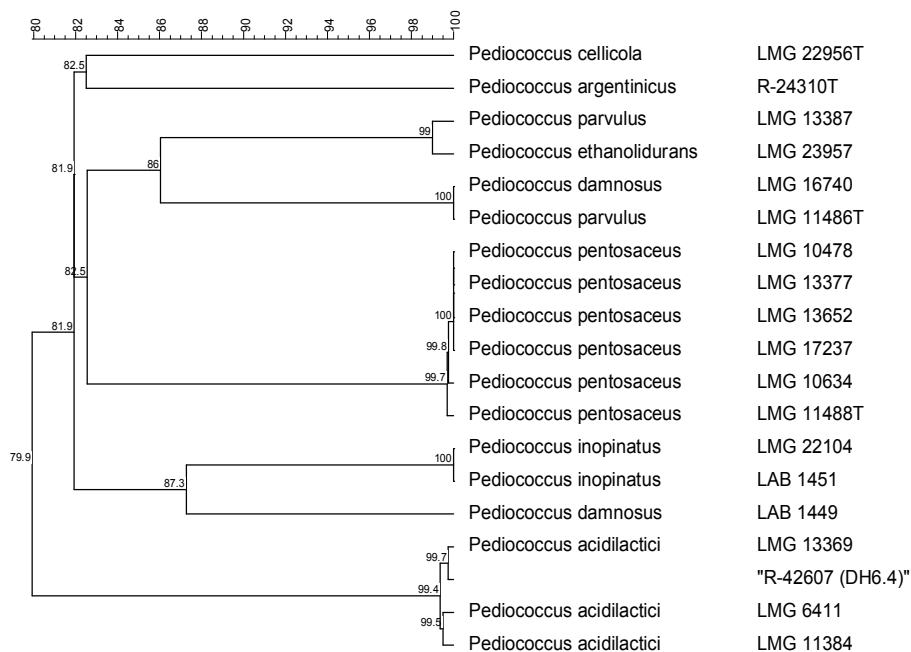
Sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch, chạy PCR với mồi *pheS* 21F và mồi *pheS* 21R tách biệt và sử dụng chương trình nhiệt như đã miêu tả trong mục 2.2.1.2. Trình tự gen *pheS* của vi khuẩn DH6.4 được xác định (Hình 3) so sánh với ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế National center for biotechnology information chủng này có mối quan hệ gần nhất với loài *Pediococcus acidilactici* (Bảng 2).

```
GCAGGATACTTTTACCTTACTGACGAAGTCTTAATGCGTTCGCAAACCTTCTCCAGTACAAGCCCCG
GACAATGGAAAAGCATGACTTTAGTAAGGGACCGCTAAAAATGATTTCTCCAGGCGTGTTTACCG
GCGGGATACGGACGATGCAACTCATTCGCATCAATTCCACCAAATCGAAGGATTGGTAATTGATAA
AAACATTACCATGGGTGATTTGAAGGGGACATTGATTACGATGGCAAAGGAAGTATTTGGCGATCG
TTTTGAAGTTCGCCTGCGTCCTAGTTACTTTCCATTCACCGAACCATCGGTAGAAGCAGACGTAAC
GTGCTTTAACTGCATGGGCAAGGGTTGTTTCAGTTTGCAAAAATACCGGTTGGATTGAAGTGCTC
```

Hình 3. Trình tự nucleotide *pheS* gen của chủng DH6.4

Bảng 2. Định danh loài của chủng DH6.4 nhờ so sánh với ngân hàng trình tự nucleotide (National center for biotechnology information)

Chủng	Loài có mối quan hệ gần nhất	% ID	Accession numbers
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	CP035151.1
DH6.4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99,75	CP035154.1
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99,75	CP021529.1
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99,49	CP033438.1



Hình 4. Cây phát sinh chủng loài của *Pediococcus* sp. DH6.4 so sánh trình tự gen *pheS* trong ngân hàng gen BCCM/LMG

Kết quả ở bảng 2 tương đồng với kết quả ở hình 4 khi so sánh trình tự gen *pheS* của chủng DH6.4 với các chủng trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Đại học Ghent (Bỉ). Cụ thể, chủng có trình tự tương đồng là 99,7% với LMG13369 và 99,4% với LMG6411 và LMG11384 thuộc loài *Pediococcus acidilactici*. Như vậy, chủng DH6.4 được định danh loài *Pediococcus acidilactici*. *Pediococcus* thuộc nhóm vi khuẩn lactic an toàn hay được coi là probiotic [25]. Có nhiều chủng thuộc chi *Pediococcus* tạo ra protein gọi là pediocin và được coi là chất kháng khuẩn hiệu quả [5], [25]. Trong *Pediococcus* có loài *P. acidilactici* hay được sử dụng trong quá trình lên men các sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật và động vật như rau bắp cải muối chua, thịt lên men... [26], [27].

3.1.3. Khả năng tổng hợp bacteriocin của *Pediococcus acidilactici* DH6.4

3.1.3.1. Đánh giá khả năng kháng một số vi khuẩn kiểm định

P. acidilactici DH6.4 được kiểm tra khả năng kháng khuẩn với 4 vi khuẩn kiểm định là *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* và *Salmonella typhimurium*. Kết quả cho thấy, chủng này có khả năng đối kháng được với cả 4 chủng vi khuẩn kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn từ 11,41 - 17,30 mm, đặc biệt kháng với vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm *B. cereus* 16,32 mm và *S. typhimurium* 15,09 mm *L. monocytogenes* 11,41 (Bảng 3 và hình 5).

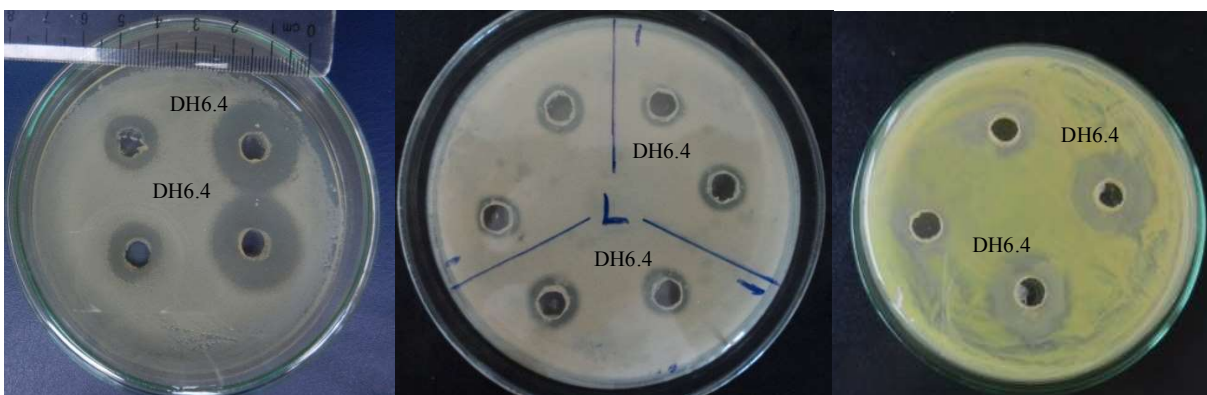
Kết quả ở bảng 3 phù hợp với kết quả nghiên cứu của Qiao và cs (2022), theo đó *P. acidilactici* CCFM18 có khả năng kháng *Listeria*

monocytogenes 12,0 mm. Hoạt tính kháng khuẩn của pediocin từ chủng này chống lại *L. monocytogenes* có trong thịt bò, xúc xích và các sản phẩm thịt, cũng như trong các sản phẩm từ sữa [28]. Theo Holland và cs (2011), bacteriocin của *P. acidilactici* có phổ hoạt động rộng chống lại các chủng thuộc chi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

Micrococcus, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Propionibacteria* và *Listeria* [23]. Nghiên cứu của Võ Ngọc Chi và cs (2021) cho thấy, *Pediococcus pentosaceus* được phân lập từ nem chua Thủ Đức có khả năng kháng *B. cereus* 16,07 mm và *S. typhimurium* là 12,80 mm [10].

Bảng 3. Khả năng kháng một số vi khuẩn kiểm định của chủng *P. acidilactici* DH6.4

Vi khuẩn	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	<i>Samonella typhimurium</i> ATCC 13076
Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	17,30 ± 0,31	16,32 ± 0,25	11,41 ± 0,20	15,09 ± 0,28



a. *Bacillus cereus*

b. *Listeria monocytogenes*

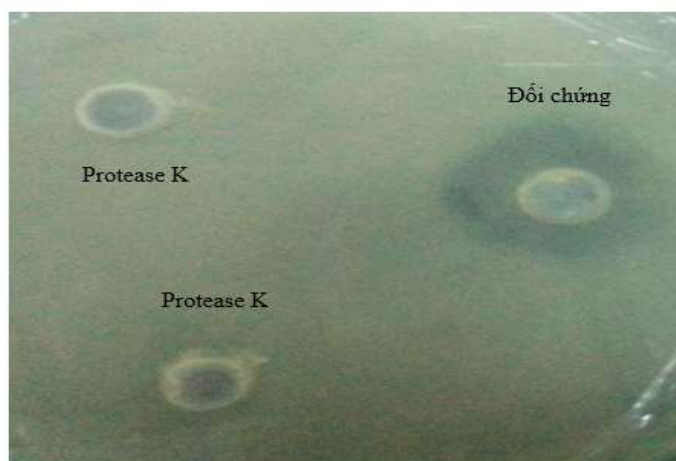
c. *Salmonella typhimurium*

Hình 5. Kháng một số vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm của chủng *P. acidilactici* DH6.4

3.1.3.2. Nhận biết bacteriocin

Do bản chất bacteriocin là peptide hay protein [1] sẽ chịu tác động của enzyme phân hủy protein nên để khẳng định chủng DH4.6 sinh bacteriocin

thí nghiệm được tiến hành như mô tả ở mục 2.2.3. Đối chứng (ĐC) là chỉ có dịch nuôi cấy chủng DH6.4 không bổ sung enzyme.



Hình 6. Ảnh hưởng protease K đến chất kháng khuẩn của *P. acidilactici* DH6.4

Kết quả cho thấy, các mẫu sau khi ủ với protease K đều bị mất hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn kiểm định, trong khi đó, mẫu đối chứng không bổ sung enzyme vẫn xuất hiện vòng kháng khuẩn (Hình 6).

Theo Anastasiadou và cs (2008), chất kháng khuẩn sinh ra bởi *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627 có bản chất là protein nên khi xử lý với protease K thì bị mất hoạt tính kháng khuẩn hoàn toàn [29]. Nghiên cứu của Marwa và cs (2015) cho thấy, chất kháng khuẩn được sinh ra bởi chủng *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 có bản chất là protein [18]. Do đó, khi chất kháng khuẩn này được xử lý với protease K đã bị mất hoàn toàn hoạt tính kháng khuẩn với *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli*. Như vậy, chất

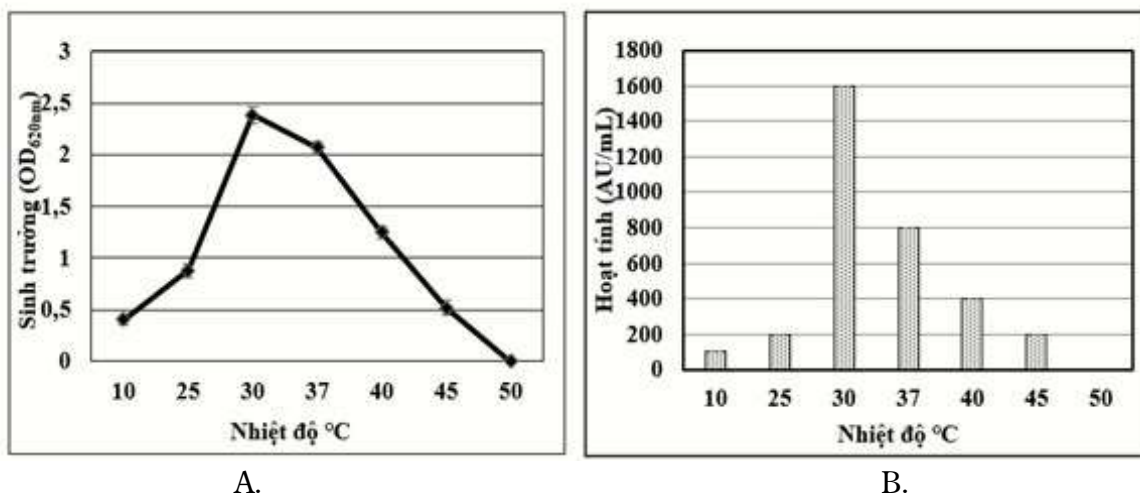
kháng khuẩn được sinh ra bởi chủng DH 6.4 có bản chất là protein và có thể là bacteriocin.

3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp bacteriocin của *P. acidilactici* DH6.4

Khả năng sinh bacteriocin của *Pediococcus* spp chịu ảnh hưởng mạnh của điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, pH và thành phần môi trường [7], [30]. Chính vì vậy, nghiên cứu này bước đầu đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ và pH ban đầu đến sự khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp bacteriocin của chủng *P. acidilactici* DH6.4

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Kết quả cho thấy, khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp bacteriocin của chủng *P. acidilactici* DH6.4 chịu ảnh hưởng khá nhiều của nhiệt độ.



Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp bacteriocin (B) của chủng *P. acidilactici* DH6.4

Chủng có khả năng sinh trưởng, phát triển từ dải nhiệt độ 10 - 45°C. Ở 50°C, chủng DH6.4 không có khả năng sinh trưởng và sinh bacteriocin. Tại nhiệt độ 10°C, chủng vẫn sinh trưởng và sinh bacteriocin, tuy nhiên khả năng sinh trưởng và sinh bacteriocin rất yếu (OD=0,40, AU=100).

Khả năng sinh trưởng của chủng DH6.4 đạt cực đại ở 30°C (OD=2,38), cũng ở nhiệt độ này, khả năng sinh bacteriocin là cực đại (AU/mL=1600). Như vậy, nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng và sinh tổng hợp bacteriocin của chủng DH6.4 là 30°C được dùng cho nghiên cứu tiếp theo. Một số nghiên cứu đã chỉ ra nhiệt độ tối ưu cho sản sinh pediocin AcH từ *P. acidilactici* H là

30°C [31], pediocin SA1 từ chủng *P. acidilactici* NRRL B5627 cũng ở 30°C [29], pediocin từ *P. pentosaceus* ACCEL ở nhiệt độ 37°C [32]. Tuy nhiên, theo Papagianni và Anastasiadou (2009), nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng của *P. acidilactici* phân lập từ sữa và thực vật lên men có thể lên tới 40°C [5].

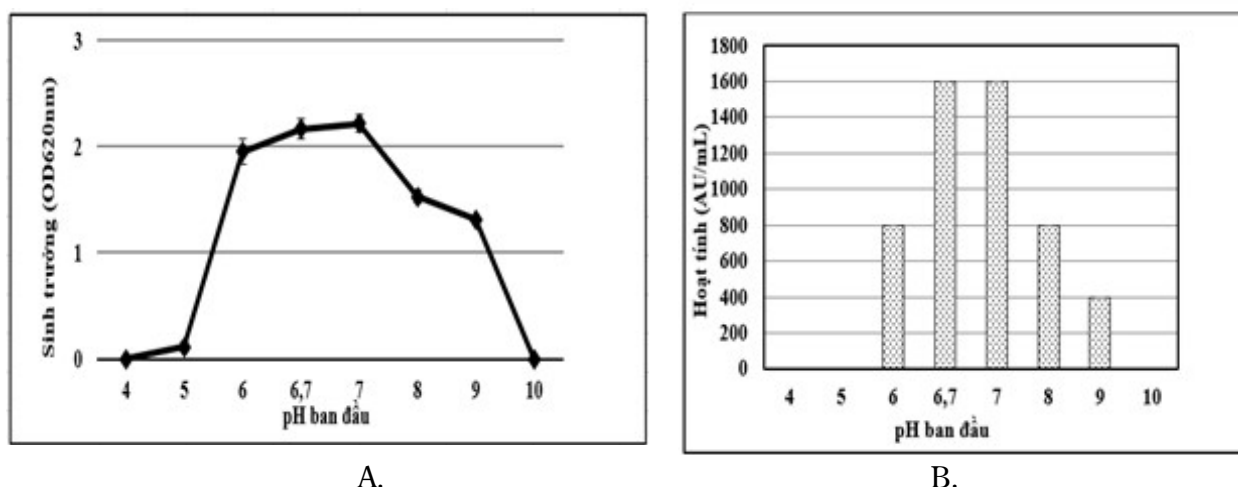
3.2.2. Ảnh hưởng của pH ban đầu môi trường nuôi cấy

Việc sản sinh bacteriocin của chủng cũng chịu ảnh hưởng lớn bởi pH ban đầu môi trường nuôi cấy (pH_{bd}), vì pH ảnh hưởng đến sự tiêu thụ chất dinh dưỡng và đến sự sinh trưởng của các chủng sinh bacteriocin [33], [34]. Theo Guerra và Pastrana

(2002), việc sản sinh bacteriocin thường liên quan đến sự tăng trưởng của các chủng, nên các điều kiện tối ưu hóa quá trình sinh trưởng sẽ tối ưu hóa việc sản xuất bacteriocin [35].

Kết quả chủng DH6.4 ở $pH_{bd} = 4$ hoặc $pH_{bd} = 10$ không phát triển, $pH_{bd} = 5$ chủng phát triển yếu, không tổng hợp bacteriocin ($OD = 0,17$, $AU = 0$). Khoảng pH_{bd} thích hợp cho sinh trưởng và tổng hợp bacteriocin của chủng DH6.4 từ 6,7 ($OD = 2,34$, $AU = 1600$) đến 7 ($OD = 2,39$, $AU = 1.600$). Khả năng sinh trưởng và tổng hợp bacteriocin của chủng DH6.4 đạt cực đại tại pH_{bd} bằng 7. Ở $pH_{bd} = 9$, chủng sinh trưởng yếu nhưng vẫn sinh bacteriocin ($OD = 1,2$, $AU = 400$). Vì vậy, pH_{bd} môi

trường nuôi cấy bằng 7 là pH thích hợp cho chủng DH6.4. Đây cũng là dải pH thích hợp cho một số chủng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin, kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Biswas và cs (1991), theo đó hoạt tính bacteriocin pediocin cao nhất của chủng *P. acidilactici* H ở pH ban đầu là 6,5 [36]. Nghiên cứu của Nel và cs (2001) cho thấy, hoạt tính bacteriocin cao nhất của chủng *P. damnosus* NCFB 1832 đạt được pH 6,7, trong đó hoạt tính thấp nhất pH ban đầu là 4,5 [37]. Theo Mandal và cs (2008), pediocin NV5 được sinh ra từ chủng *P. acidilactici* LAB có mức bacteriocin tối ưu đạt được khi pH ban đầu là $6,6 \pm 0,2$ [19].



Hình 8. Ảnh hưởng của pH_{bd} đến khả năng sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp bacteriocin (B) của chủng *P. acidilactici* DH6.4

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Pediococcus* sp. DH6.4 đã thể hiện khả năng sinh chất kháng khuẩn bacteriocin kháng mạnh *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 11,41 - 17,30 mm. Với một số đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc, đặc điểm sinh hóa và phân tích trình tự gen *pheS* cho thấy, chủng này thuộc loài *Pediococcus acidilactici*. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp để chủng *Pediococcus acidilactici* DH6.4 sinh bacteriocin tốt nhất là 30°C , pH 7.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yang S. C., Lin C. H., Sung C. T., Fang J. Y (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*. 5: 241.
2. Abbasiliasi S., Tan J. S., Ibrahim T. A. T., Bashokouh F., Ramakrishnan N. R., Mustafaab S., Ariff A. B (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *RSC Advances*. 7: 29395 - 29420.
3. Hernández - González J. C., Martínez - Tapia A., Lazcano-Hernández G., García - Pérez B. E., Castrejón - Jiménez N. S (2021). Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*. 11 (4): 979.
4. Simons A., Alhanout K., Duval R. E (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial

origin: Overview of their biology and their impact against multidrug - resistant bacteria. *Microorganisms*. 8 (5): 639.

5. Papagianni, M., Anastasiadou, S (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*. 8 (3): 1 - 16.

6. Eun-Ji Y., Ae-Jung K (2023). Antimicrobial and antibiofilm effect of bacteriocin-producing *Pediococcus inopinatus* K35 isolated from kimchi against multidrug - resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 12: 676.

7. Rubén A. P., Elisa A. G., Ana T. A., Nelson P. G. (2014). A Review on some important factors affecting bacteriocin production by *Lactococci*, *Lactobacilli* and *Pediococci*. *Current Biochemical Engineering*. 1: 9 - 24.

8. Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers O. P (2012). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: 881 - 888.

9. Yang E., Fan L., Yan J., Jiang Y., Doecette C., Fillmore S., Walker B (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*. 8: 10 - 24.

10. Võ Ngọc Chi, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Đinh Anh Khoa, Phan Bích Tuyên, Hoàng Diễm Hằng, Lê Thị Thủy và Kha Chấn Tuyên (2021). Khảo sát khả năng sinh bacteriocin của vi khuẩn lactic phân lập trên nem chua Thủ Đức. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*. 20 (2): 62 - 68.

11. Thiwanya C., Bhagavathi S. S., Sasithorn S., Sartjin P., Yvan C., Hanitra R., Thomas H., Chaiyavat C (2020). Screening and identification of bacteriocin-like inhibitory substances producing lactic acid bacteria from fermented products. *Food Sci. Technol, Campinas*. 40 (3): 571 - 579.

12. Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy (2018). Đánh giá đặc tính probiotic và xác định một số đặc điểm của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ ruột gà ri. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. Số 7 (92): 104 - 111.

13. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (1997). *Vĩ Sinh vật học*. Nxb Giáo dục, Hà Nội.

14. Nguyen T. L. D., Van H. K., Cnockaert M., De B. E., Maarten A., Le T. B., Vandamme P. (2013). A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. *Journal of Food Research International*, 50: 232 - 240.

15. Gevers D., Huys G., Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205 (1): 31 - 36.

16. De Bruyne K., Franz C. M. A. P., Vancanneyt M., Schillinger U., Mozzi F., Valdez G. F. D., De Vuyst L. and Vandamme P (2008). *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (12): 2909 - 2916.

17. Hernandez D., Cardell E., Zarate V. (2005). 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: 77 - 84.

18. Marwa A. S., Hamdi M. A, Ekbal M. I. A., Adham M. A. & Sobhy A. El. S (2015). Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin. *Benha Veterinary Medical Journal*, 28(1): 210 - 215.

19. Mandal. V., Sen. S. K., Mandal, N. C (2008). Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* LAB 5 and its characterization. *Indian J. Biochem. Biophys*, 45: 106 - 110.

20. Hoa Thị Minh Tú, Nguyễn Thị Đà, Lê Thanh Bình (2009). Đặc điểm sinh học của chủng

vi khuẩn lactic sinh tổng hợp bacteriocin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 47 (5): 7 - 25.

21. Hashium A. J., Hamza S. J., Aldujaili N. H (2010). Antimicrobial activity of bacteriocin produced by *Weissella cibaria* NRIC0136. *Al-Kufa Journal for Biology*, 2 (1): 1 - 10.

22. Đồng Thị Hoàng Anh, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Quỳnh Uyển (2017). Khảo sát một số đặc điểm của bacteriocin ở chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* UL487 phân lập từ mẫu chao của Huế. *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 33 (1S): 1 - 6.

23. Holland R., Crow V., Curry B (2011). Lactic acid bacterial. *Pediococcus* spp. Elsevier Ltd: (4): 149 - 152.

24. Naser S. M., Thompson F. L., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M., Swings J (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151: 2141 - 2150.

25. Porto, M. C., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O., Vitolo, M., Oliveira, R. P (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnol. Adv* 35 (3): 361 - 374.

26. Sire J. M., Donnio P. Y., Mesnard R., Pouëdras P., Avril J. L (1992). Septicemia and hepatic abscess caused by *Pediococcus acidilactici*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11: 623 - 625.

27. Widodo W., Hanna R. P. K., Hevi.W., Anggi L. W (2023). Milk fermented with *Pediococcus acidilactici* strain BE improves high blood glucose levels and pancreatic beta - cell function in diabetic Rats. *Food Science of Animal Resources*, 43 (1): 170 - 183.

28. Qiao. Y., Zhichang. Q., Fengwei T., Leilei Y., Jianxin Z., Hao Z., Qixiao Z., Wei C. (2022). Effect of bacteriocin - producing *Pediococcus acidilactici* strains on the immune system and intestinal flora of normal mice. *Food Science and Human Wellness*, 11: 238 - 246.

29. Anastasiadou. S., Maria . P., George. F., Ioannis. A., Pavlos K (2008). Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99: 5384 - 5390.

30. García-Toledo. J. A., Torrestiana-Sánchez. B., Martínez-Sánchez. C. E., Tejero-Andrade. J. M., García-Bórquez. A., Mendoza-García. P. G. (2019). Nanoencapsulation of a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* ITV26 by microfluidization. *Food and Bioprocess Technology*, 12: 88 - 97.

31. Ray B (1995). *Pediococcus* in fermented foods. In *Food Biotechnology: Microorganisms*. Wiley-VCH, USA: 745 - 795.

32. Wu C. W., Yin L. J., Jiang S. T (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *J Agr Food Chem*, 52: 1146 - 1151.

33. Cabo M. L., Murado M. A., González M. P. and Pastoriza L. (2001). Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model, *Enzyme Microb. Technol*, 29: 264 - 273.

34. Bibal B., Goma G., Vayssier Y., Pareilleux A. (1988). Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 28: 340 - 344.

35. Guerra N. P., Pastrana L. (2002). Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. *Proc. Biochem* 37: 1005 - 1015.

36. Biswas S. R., Ray P., Johnson M. C. and Ray B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H⁺. *Appl. Environ. Microbiol*, 57: 1265 - 1267.

37. Nel H. A., Bauer R., Vandamme E. J., Dicks L. M (2001). Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol* 91: 1131 - 1138.

IDENTIFICATION RESEARCH *Pediococcus* sp. DH6.4 BACTERIOCIN BIOSYNTHESIS**Nguyen Thi Lam Doan¹, Dang Thao Yen Linh²**¹*Faculty of Environmental Sciences, University of Science,
Vietnam National University, Hanoi*²*Center for Advanced material and environmental technology,
National Center for technological progress.***Summary**

Bacteriocins are biosynthesized by lactic bacteria that are a safe antibacterial substance. They do not cause allergies and harm to human health. They can be applied in many different fields such as food technology, agriculture, health... Therefore, the research was conducted to identify some morphological, biochemical characteristics and analysed *pheS* gene sequencing of *Pediococcus* sp. DH6.4. The results have shown this strain belong to *Pediococcus acidilactici*. *Pediococcus acidilactici* DH6.4 has the ability to produce bacteriocin with strong antibacterial activity against *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* antibacterial ring diameters from 11.41 - 17.30 mm. Besides, this study identified the optimal temperature 30°C, pH_{bd} = 7 for the growth and maximal bacteriocin activity of *Pediococcus acidilactici* DH6.4. This strain or extracted bacteriocin compound have potential apply for preserving and processing food.

Keywords: *Pediococcus*, *bacteriocin*, *antibacterial activity*, *pheS* gene.**Người phản biện:** PGS.TS. Lê Thanh Bình**Ngày nhận bài:** 21/11/2023**Ngày thông qua phản biện:** 15/12/2023**Ngày duyệt đăng:** 22/12/2023