

ĐẶC ĐIỂM CHỦNG VI KHUẨN *Lactobacillus plantarum* UL487 ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ CHAO (HUẾ)

Nguyễn Thị Anh Đào¹, Hoàng Văn Vinh², Nguyễn Quỳnh Uyên³

CHARACTERISTICS OF THE STRAIN *Lactobacillus plantarum* UL487 ISOLATED FROM TOFU (HUE)

Nguyen Thi Anh Dao¹, Hoang Van Vinh², Nguyen Quynh Uyen³

Tóm tắt – *Lactobacillus plantarum* đã được ứng dụng rộng rãi, đặc biệt là trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe cho con người và vật nuôi. Trong bài báo này, bên cạnh nghiên cứu hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào, chúng tôi thực hiện nghiên cứu khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh và trình tự gen mã hóa cho bacteriocin PlnA, PlnEF cũng như gen mã hóa cho protein sốc lạnh (cold shock protein, csp) của chủng *L. plantarum* UL487 phân lập từ mẫu chao (Huế) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và tách dòng gen. Kết quả cho thấy: i) hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng UL487 đặc trưng cho vi khuẩn lactic; ii) chủng vi khuẩn UL487 có hoạt tính ức chế các vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus* VTCCB 658, *Bacillus cereus* VTCCB 613 và *Salmonella enterica* VTCCB 480; và iii) trình tự các gen PlnA, PlnEF và amino acid của Csp có độ tương đồng lần lượt là 96%, 99%, 94% với các gen và pro-

tein tương ứng của vi khuẩn *L. plantarum* có trong cơ sở dữ liệu từ ngân hàng gen.

Từ khóa: bacteriocin, *Lactobacillus plantarum*, protein sốc lạnh, tách dòng gen, vi khuẩn lactic.

Abstract – *Lactobacillus plantarum* is widely used in many fields, especially in medicine. In this study, besides the strain's morphology (i.e, the colony and the cell under microscope and scan electronic microscope), antibacterial activities against some pathogenic bacteria and the nucleotide sequences encoded for bacteriocin PlnA, PlnEF and the cold shock protein (Csp) of *L. plantarum* UL487 isolated from Tofu (Hue) were studied by agar diffusion method and cloning. The results showed that: i) the morphology of the colony and the cell of the strain were typical for lactic acid bacteria; ii) UL487 owned antibacterial activities against some pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* VTCCB 658, *Bacillus cereus* VTCCB 613 and *Salmonella enterica* VTCCB 480; and iii) the nucleotide sequences encoded for bacteriocin PlnA, PlnEF and the amino acid of the cold shock protein (Csp) of the strain were 96%, 99% and 94% identical

^{1,2,3}Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài: 26/8/2020; Ngày nhận kết quả bình duyệt: 26/10/2020; Ngày chấp nhận đăng: 25/12/2020

Email: daona@vnu.edu.vn

^{1,2,3}VNU - Institute of Microbiology and Biotechnology
Received date: 26th August 2020; Revised date: 26th October 2020; Accepted date: 25th December 2020

to those of the *L. plantarum* in the Gen Bank, respectively.

Keywords: *antibacterial activity, bacteriocin, cold shock protein, lactic acid bacteria, Lactobacillus plantarum.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lactobacillus nói chung và *Lactobacillus plantarum* nói riêng đã cho thấy những ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến/bảo quản thực phẩm cũng như trong lĩnh vực y tế. Trong hai lĩnh vực trên, vi khuẩn này đã được sử dụng với vai trò là giống khởi động (starter culture) và trong vai trò probiotic [1]. Một trong những đặc tính nổi bật ở các chủng vi khuẩn lactic nói chung và *Lb. plantarum* nói riêng là khả năng sinh tổng hợp bacteriocin. Bacteriocin là chất kháng khuẩn được sinh tổng hợp bằng con đường ribosome và được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như y dược và công nghệ thực phẩm [2]. Đối với *Lb. plantarum*, bacteriocin được công bố trong nhiều nghiên cứu là dạng hai pep-tit (two-peptide bacteriocin) như PlnEF, PlnJK [3], [4]. Cũng như các vi khuẩn liên quan đến thực phẩm, *Lactobacillus* nói chung và *Lb. plantarum* nói riêng chứa gen mã hóa cho cold shock protein (Csp). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy vai trò của gen này trong việc tăng độ sống sót của vi khuẩn lactic khi thay đổi nhiệt độ [5], [6]. Đối với *Lb. plantarum* NC8, ba gen CspL, CspP, và CspC mã hóa cho các cold shock protein có độ tương đồng cao đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu [7].

Do Pln regulon là đặc trưng của nhiều loài *Lb. plantarum*, trong đó PlnA là yếu tố cảm ứng quá trình phiên mã và locus PlnEF phân bố rộng rãi ở các loài này [8] nên trình tự nucleotide mã hóa cho PlnA,

PlnEF được chúng tôi trình bày trong nghiên cứu ở đây. Ngoài ra, để đóng góp thêm thông tin về chủng *Lb. plantarum* UL487, trình tự amino acid của Csp ở chủng này cũng được chúng tôi nghiên cứu bước đầu. Kết quả cho thấy, trình tự các gen PlnA, PlnEF và amino acid của Csp có độ tương đồng lần lượt là 96%, 99% và 94% với các gen và protein tương ứng của vi khuẩn *L. plantarum* có trong cơ sở dữ liệu từ ngân hàng gen. Để góp phần mở rộng các ứng dụng, đặc điểm hình thái (hình ảnh khuẩn lạc, tế bào dưới kính hiển vi phản pha và kính hiển vi điện tử quét) và khả năng kháng một số loại vi khuẩn gây bệnh của chủng vi khuẩn này cũng được trình bày trong nghiên cứu này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Vật liệu nghiên cứu

L. plantarum UL487 phân lập từ mẫu chao của Huế được lưu giữ tại Phòng Công nghệ Enzym và Protein – Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các chủng vi sinh vật gây bệnh sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam.

Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

B. Phương pháp nghiên cứu

1) *Quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào:* Sau khi hoạt hóa trên đĩa thạch MRS (hãng LAB, Neogen Company USA), hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn được mô tả dựa trên các quan sát trên đĩa thạch MRS này. Hình thái tế bào được quan sát dưới vật kính soi dầu 100 X của kính hiển vi phản pha Axio Zeiss tại

Bảng 1: Các cặp môi sử dụng

Tên môi	Trình tự 5' – 3'	Mục đích
PlnA F	GTACAGTACTAATGGGAC	Khuếch đại đoạn 450 bp và 428 bp trong gen mã hóa cho PlnA và PlnEF tương ứng [9]
PlnA R	CTTACGCCAATCTATACG	
PlnEF F	GGCATAGTAAAAATCCCCCC	
PlnEF R	CAGGTTGCCGCAAAAAAAG	
Csp1a F	GGTTTAATGTAGACAARGGNTTYGGNTTYAT	Khuếch đại đoạn 178 bp trong gen Csp mã hóa cho cold shock protein [5]
Csp1a R	TAGTAGGTACCRTTNGCNGCYTGNGGNCC	
M13 F	GTAAACGACGGCCAGT	Cặp môi thương phẩm dựa trên trình tự vector pGEM (Promega)
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

2) *Tách dòng đoạn gen mã hóa cho PlnA, PlnEF và Csp trong vector pGEM:* Tách chiết DNA genome sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp của Sambrook [10]. Hỗn hợp phản ứng PCR 25 μ l gồm: 0,5 μ l DNA (\sim 100 ng), 1 μ l mỗi xuôi (10 pmol), 1 μ l mỗi ngược (10 pmol), 12,5 μ l master mix 2x, 10 μ l H₂O. Chương trình PCR là 95°C: 03 phút, tiếp sau là 30 chu kỳ (95°C: 30 giây, 55°C: 30 giây và 72°C: 30 giây) và kết thúc bằng 72°C: 10 phút. Sau khi kiểm tra trên gel agarose 1%, sản phẩm PCR được tinh sạch và biến nạp vào vector pGEM (Promega) theo đúng hướng dẫn của hãng Promega. Các khuẩn lạc biến nạp được kiểm tra sự có mặt của đoạn chèn theo phương pháp PCR với cặp môi đặc hiệu cho từng gen và cặp môi thương phẩm M13. Sau đó, những plasmid có sản phẩm PCR với kích thước phù hợp theo lý thuyết

được gửi đến Hãng 1st Base (Singapore) để xác định trình tự.

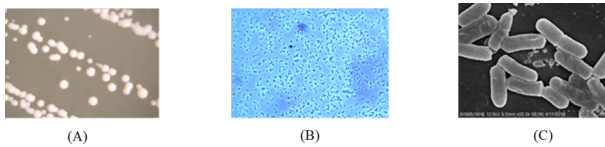
3) *Hoạt tính kháng khuẩn:* Hoạt tính kháng khuẩn được phát hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn UL487 sau khi chỉnh pH đến 5,5 – 6 được nhỏ vào các giếng trên môi trường LB (Hãng LAB, Neogen Company USA) đã chứa vi khuẩn thử nghiệm và được ủ ở 37°C. Hoạt tính kháng khuẩn được quan sát sau 48 giờ và đường kính vòng kháng khuẩn được xác định theo công thức: $D_k(mm) = D - d$; trong đó: D_k : đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh giếng, D: đường kính vòng kháng khuẩn (bao gồm cả đường kính giếng thạch), d: đường kính giếng thạch. Đường kính vòng kháng khuẩn được lấy theo giá trị trung bình của ba lần lặp lại thí nghiệm [2].

4) *Phương pháp tin sinh:* Chương trình phần mềm BLAST được sử dụng để so sánh trình tự tương đồng giữa các đoạn gene. Kết quả trình tự đoạn gene trong nghiên cứu được tải trên trang web và chương trình này hiển thị phần trăm tương đồng với các trình tự gene tương ứng đã có

trong cơ sở dữ liệu [11].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1) *Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào*: Với mục đích mở rộng ứng dụng chủng vi khuẩn UL487 trong thực tế, các nghiên cứu về hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng này được chúng tôi tiến hành và kết quả được trình bày trong Hình 1. Thanh tỉ lệ 5 μm được sử dụng



Hình 1: Hình thái khuẩn lạc (A) và hình thái tế bào (B) của chủng UL487 dưới kính hiển vi phản pha và kính hiển vi điện tử quét (C)

trong các ảnh. Kết quả quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng UL487 dưới kính hiển vi phản pha cũng như hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét như sau:

- (A): Khuẩn lạc lồi, có hình dạng hình tròn, mép và bề mặt trơn nhẵn, màu trắng sữa, kích thước 0,5 – 1,0 mm, không tiết sắc tố ra môi trường
- (B): Tế bào bắt màu Gram dương, có hình que ngắn, không kết chuỗi
- (C): Tế bào trực khuẩn ngắn, kích thước 0,4 – 0,5 $\mu\text{m} \times 1 - 2 \mu\text{m}$, không có roi.

Kết quả cho thấy, chủng UL487 có đặc điểm hình thái đại diện cho nhóm vi khuẩn lactic. Những kết quả này cung cấp thêm thông tin cơ bản nhằm ứng dụng rộng rãi hơn chủng UL487 trong thực tế.

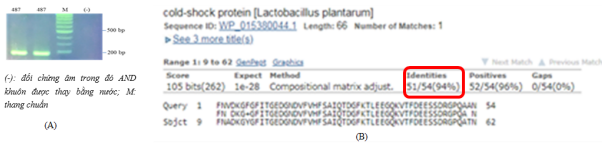
A. Khả năng kháng một số vi sinh vật gây bệnh

Hoạt tính kháng ba chủng vi sinh vật gây bệnh của dịch nuôi cấy chủng UL487 được trình bày trong Bảng 2. Nhiều nghiên

Bảng 2: Hoạt tính kháng một số chủng vi sinh vật gây bệnh của chủng UL487

STT	Chủng vi sinh vật gây bệnh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
1	<i>Salmonella enterica</i> VTCCB 480	5,5 \pm 0,10
2	<i>Staphylococcus aureus</i> VTCCB 658	7,5 \pm 0,2
3	<i>Bacillus cereus</i> VTCCB 613	6,0 \pm 0,1

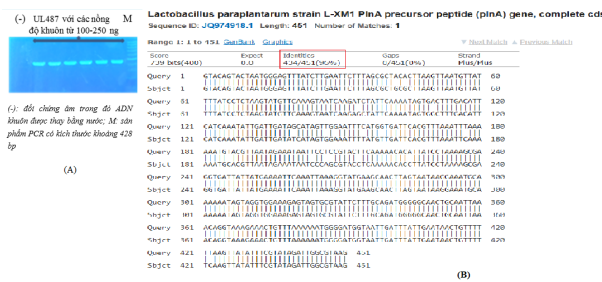
cứu đã cho thấy, một số bacteriocin, ngoài khả năng ức chế các chủng có quan hệ gần gũi, còn có khả năng ức chế cả các vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương và nấm [12], [13]. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, dịch nuôi cấy từ chủng UL487 có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh Gram dương như *S. aureus*, *B. cereus* và Gram âm như *S. enterica*. Như vậy, bên cạnh khả năng ức chế các chủng có quan hệ gần gũi, dịch nuôi cấy từ chủng UL487 còn có khả năng ức chế một số vi sinh vật gây bệnh. Kết quả định tính này cung cấp thêm thông tin để có thể phát triển hướng nghiên cứu ứng dụng của chủng này trong thực tế.



Hình 2: Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa cho Csp (A) và so sánh trình tự amino acid được mã hóa bởi gen này với cơ sở dữ liệu BLAST (B) [11]

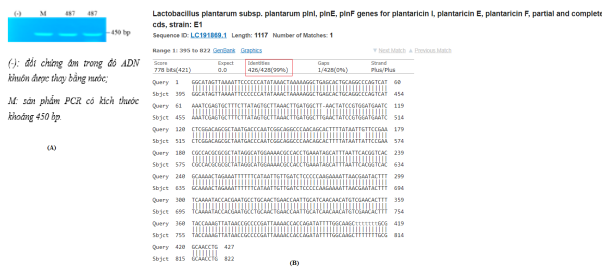
B. Trình tự các gen mã hóa cho PlnA, PlnEF và Csp

Sản phẩm PCR khuếch đại các gen mã hóa cho PlnA, PlnEF và Csp (Hình 2A, 3A và 4A) cũng như so sánh trình tự amino acid hay nucleotide mã hóa cho các gen này với trình tự tương ứng trong cơ sở dữ liệu BLAST được trình bày lần lượt ở Hình 2B, Hình 3B và Hình 4B. Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR khuếch đại các gen mã hóa cho PlnA, PlnEF và Csp đều là sản phẩm đặc hiệu với một băng duy nhất có kích thước như dự đoán. Trình tự các gen (PlnA, PlnEF) và protein Csp có độ tương đồng cao với các giá trị lần lượt là 96%, 99% và 94% (phần vòng đỏ) đối với các gen và protein tương ứng của vi khuẩn *Lb. plantarum* có trong cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen.



Hình 3: Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa cho PlnA (A) và so sánh trình tự nucleotide mã hóa cho gen này với cơ sở dữ liệu BLAST (B) [11]

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy Pln regulon là đặc trưng của nhiều loài *Lb. plantarum*, trong đó, PlnA là yếu tố cảm ứng quá trình phiên mã [3]. Trình tự PlnEF ở 23 chủng trong số 29 chủng *Lb. plantarum* có độ tương đồng là 100% với trình tự này của chủng C11 [14]. Trình tự amino acid (dựa trên trình tự amino acid suy diễn từ trình tự nucleotide) của Csp ở chủng UL487 có 94% giống với trình tự tương ứng của chủng *Lb. plantarum* có trong cơ sở dữ liệu. Trong khi đó, Csp ở chủng *Lb. plantarum* UL485 đã được sơ bộ xác định là CspC với 91,23% trình tự amino acid giống với trình tự tương ứng ở chủng *Lb. plantarum* NC8 [15]. Điều này góp phần củng cố giả thuyết của chúng tôi là các gen PlnA, PlnEF và csp là những gen phổ biến ở các chủng vi khuẩn *Lb. plantarum*.



Hình 4: Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa cho PlnEF (A) và so sánh trình tự nucleotide mã hóa cho gen này với cơ sở dữ liệu BLAST (B) [11]

IV. KẾT LUẬN

- Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng vi khuẩn UL487 đặc trưng cho vi khuẩn lactic.

- Chủng vi khuẩn UL487 có hoạt tính ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* VTCCB 658, *Bacillus cereus* VTCCB 613 và *Salmonella enterica* VTCCB 480.

- Trình tự các gen PlnA, PlnEF và amino acid của Csp có độ tương đồng (với các giá trị lần lượt là 96%, 99% và 94%) với các gen và protein tương ứng của vi khuẩn *Lb. plantarum* có trong cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Nhà nước "Nghiên cứu đánh giá vai trò cải thiện tích cực hệ vi sinh vật đường ruột và tăng cường miễn dịch của chế phẩm probiotic", mã số: ĐTĐL.CN-61/19 do TS. Hoàng Văn Vinh chủ trì.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Khalid K. An overview of lactic acid Bacteria. *International Journal of Biosciences*. 2011; 1(3):1–13.
- [2] De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2007; 13(4):194–199.
- [3] Diep D. B, Myhre R, Jhonsborg O, Aakra A, Nes I. F. Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the Pln operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Molecular Microbiology*. 2003; 47(2):483–494.
- [4] Maldonado A, Ruiz-Barba J. L, Jimenez-Diaz R., Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:383–389.
- [5] Kim W.S, Khunajakr N, Ren J, Dunn N.W, Conservation of the Major Cold Shock Protein in Lactic Acid Bacteria. *Current Microbiology*. 1998; 37(5):333–336.
- [6] Wouters J. A, Rombouts F. M, Kuipers O. P, de Vos W. M., Abee T., The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 2000 ; 23(2):165–73.
- [7] Derzelle S, Hallet B, Ferain T, Delcour J, Hols P. Improved Adaptation to Cold-Shock, Stationary-Phase, and Freezing Stresses in *Lactobacillus plantarum* Overproducing Cold-Shock Proteins. *Applied and Environmental microbiology*. 2003;4285–4290.
- [8] Tai F. H, Foo L. H, Rahim A. R, Loh C. T, Abdullah P. M, Yoshinobu K. Molecular characterisation of new organisation of PlnEF and plw loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb Cell Fact*. 2015; 14:89–102.
- [9] Remiger A, Ehrmann M. A, Vogel R. F, Identification of bacteriocin-encoding genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). *Systematic and Applied Microbiology*. 1996; 19(1):28–34.
- [10] Sambrook J, Russell D W. *Molecular*

- cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 2001.
- [11] Nation Center for Biotechnology Information. *Blastn suite*. 2021. Truy cập từ: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome [Ngày truy cập 11/12/2020].
- [12] Müller D. M, Carrasco M. S, Tonarelli G. G, Simonetta A. C. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 106(6):2031–2040.
- [13] Smaoui S, Elleuch L, Bejar W, Karray-Rebai I, Ayadi I, Jaouadi B, Mathieu F, Chouayekh H, Bejar S, Mellouli L. Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied Chemistry and Biotechnology*. 2010; 23:1132–1146.
- [14] Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Navarro L, Díez L, Somalo S, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C, Genetic diversity of the pln locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Microbiology*. 2009; 134(3):176–183.
- [15] Uyen Q. N, Anh H. T. D, Le M. T. N. Some characteristics of the bacteriocin and cold shock protein of the strain *Lactobacillus plantarum* UL485 isolated from chao of Hue province in Vietnam. *BioTechnology: An Indian Journal*. 2018; 14(5):171–175.