VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LÊ XUÂN CÔNG

NGHIÊN CỨU THU NHẬN ENZYME ENDOLYSIN TÁI TỔ HỢP LYSSA VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TRONG BẢO QUẢN SỮA

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:
PGS.TS. KHUẤT HỮU TRUNG

HÀ NỘI – NĂM 2018

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP

***Đề tài*:**

NGHIÊN CỨU THU NHẬN ENZYME ENDOLYSIN TÁI TỔ HỢP LYSSA VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TRONG BẢO QUẢN SỮA

Người hướng dẫn : PGS.TS. KHUẤT HỮU TRUNG

Học viên thực hiện : LÊ XUÂN CÔNG

Lớp : K20

Hà Nội - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn này là kết quả nghiên cứu của cá nhân tôi dưới sự hướng dẫn của ***PGS.TS. Khuất Hữu Trung****. Các số liệu và tài liệu được trích dẫn trong luận văn là trung thực. Kết quả nghiên cứu này không trùng với bất cứ công trình nào đã được công bố trước đó.*

Tôi xin chịu trách nhiệm với lời cam đoan của mình.

Hà Nội, 06 tháng 8 năm 2018

Học viên

Lê Xuân Công

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành khóa luận này, tôi xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS Khuất Hữu Trung, ThS. Nguyễn Thị Hồng Hải cùng toàn thể các cán bộ Bộ môn Vi sinh – Viện Di truyền Nông nghiệp đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn quý Thầy, Cô trong khoa Công Nghệ sinh học, Viện Sinh Thái và Tài Nguyên Sinh Vật đã tận tình truyền đạt kiến thức trong hai năm tôi học tập. Với vốn kiến thức được tiếp thu trong quá trình học không chỉ là nền tảng cho quá trình nghiên cứu luận văn mà còn là hành trang quí báu để tôi bước vào đời một cách vững chắc và tự tin.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình và bạn bè, những người đã luôn ở cạnh tôi, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian qua.

Cuối cùng tôi kính chúc quý Thầy, Cô dồi dào sức khỏe và thành công trong sự nghiệp cao quý. Đồng kính chúc các Cô, Chú, Anh, Chị trong Bộ môn Vi sinh – Viện Di truyền Nông nghiệp luôn dồi dào sức khỏe, đạt được nhiều thành công tốt đẹp trong công việc.

Hà Nội, ngày 6 tháng 8 năm 2018

Học viên

Lê Xuân Công

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN
LỜI CẢM ƠN

MỞ ĐẦU 1
Chương 13: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1.Tình hình ngộ độc thực phẩm do *Staphylococcus aureus* 3
1.1.1. Tình hình ngộ độc thực phẩm do Staphylococcus aureus trên thế giới.....3
1.1.2. Tình hình ngộ độc thực phẩm do Staphylococcus aureus ở Việt Nam 5
1.2. Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.....6
1.2.1. Giới thiệu vê Staphylococcus.....6
1.2.2. Hình thái và đặc điểm sinh hóa 10
1.2.3. Điều kiện tăng trưởng và sự phân bố 14
1.2.4. Tính kháng thuốc kháng sinh.....15
1.3. Enzym tái tổ hợp 15
1.3.1. Hệ thống biểu hiện:.....15
1.3.2.18*Các vector biểu hiện* 18
1.4. Tổng quan về enzym endolysin 21
1.4.1. Giới thiệu về enzym endolysin 21
1.4.2. Vai trò và ứng dụng 23
1.4.3. Tổng hợp nhân tạo endolysin kháng khuẩn.....24
1.4.4. Ứng dụng của endolysin trong công nghệ sinh học thực phẩm 26
1.5. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh enzym endolysin 27
1.5.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy 27
1.5.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy 27
1.5.3. Ảnh hưởng của pH.....28
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP28 NGHIÊN CỨU 28
2.1. Vật liệu.....29
2.2. Hóa chất và thiết bị 29
2.3. Phương pháp nghiên cứu 30
2.3.1. Phương pháp biểu hiện gen LysSA trong vi khuẩn E.coli 30
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu tối ưu các điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn E.coli BL21 tái tổ hợp đến sinh trưởng và biểu hiện endolysin.....31
2.3.3. Phương pháp xác định hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh của enzyme endolysin LysSa tái tổ hợp 31
2.3.4. Phương pháp điện di SDS-PAGE 32
2.3.5. Phương pháp tinh sạch enzyme endolysin bằng cột sắc ký ái lực.....34
2.3.6. Xác định hoạt độ của enzym endolysin tái tổ hợp 34

2.3.7. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng của endolysin LysSa với vi khuẩn gây bệnh có trong sữa với các nồng độ endolysin và các thời gian bổ sung endolysin LysSa khác nhau 35
2.3.8. Phương pháp đánh giá chất lượng sữa tươi nguyên liệu sau khi bổ sung enzyme endolysin LysSa 35
2.3.9. Phương pháp đánh giá chất lượng sữa tươi thanh trùng sau khi bổ sung enzyme endolysin LysSa 35
Chương 3: KẾT QUẢ 36
3.1. Nghiên cứu tối ưu các điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn E.Coli BL21 tái tổ hợp và biểu hiện 36
3.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ 36
3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy 37
3.1.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng 39
3.1.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian cảm ứng và thu hồi sinh khối 40
3.2. Nghiên cứu thu hồi enzym endolysin tái tổ hợp bằng phương pháp phá tế bào... 41
3.3. Kết quả nghiên cứu tinh sạch enzyme endolysin tái tổ hợp. 42
3.4. Đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh *Staphylococus aureus* của enzym endolysin LysSa tái tổ hợp 44
3.4.1. Đánh giá hoạt tính kháng bằng phương pháp đếm khuẩn lạc 46
3.4.2. Phổ kháng khuẩn của enzym endolysin 47
3.5. HoNK \l "_Toc3793088"vi khuẩn gây bệnh của endolysin LysSapháp phá tế bàodolysin LysSan LysSa với 49
3.6. Chất lượng sữa tươi nguyên liệu sau khi bổ sung enzyme endolysin LysSa 51
3.7. Hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh có trong sữa tươi thanh trùng của endolysin LysSa 52
3.8. Chất lượng sữa tươi thanh trùng sau khi bổ sung enzyme endolysin LysSa 53
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 55
1. KẾT LUẬN 55
2. KIẾN NGHỊ 55
TÀI LIỆU THAM KHẢO 56

M5AGER

Hiện nay ngộ độc thực phẩm đã và đang là mối lo ngại nghiêm trọng cho sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Nguyên nhân là do con người sử dụng các loại thực phẩm đã bị nhiễm các loài vi khuẩn gây bệnh hay độc tố của chúng. Mặc dù đã có công nghệ hiện đại, các phương pháp thực hành sản xuất tốt (GMP), kiểm soát chất lượng và vệ sinh cũng như an toàn sản xuất và đánh giá rủi ro (HACCP), nhưng số lượng các trường hợp bị ngộ độc và bị bệnh do thực phẩm vẫn tăng lên trong suốt thập kỷ qua. Ở châu Âu, mỗi năm ước tính có hơn 380.000 người dân bị bệnh do sử dụng các sản phẩm thực phẩm nhiễm vi khuẩn, các loại vi khuẩn gây bệnh như: *Staphylococcus aureus, Salmonella, Listeria*.

Staphylococcus aureus là tác nhân phổ biến gây nhiễm trùng bệnh viện cũng như trong cộng đồng dân cư với tỷ lệ mắc và tử vong cao trên toàn thế giới. *S. aureus* khi nhiễm độc thức ăn, đồ uống do tiếp xúc giữa người mang mầm bệnh sẽ có thể dẫn đến và viêm ruột cấp do các thức ăn có chứa độc tố ruột của *S. aureus*, gây mất nước và điện giải có thể dẫn tới sốc. *S. aureus* là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây nhiễm khuẩn bệnh viện. Những chủng *S. aureus* gây nhiễm khuẩn bệnh viện thường có khả năng kháng lại nhiều kháng sinh. *S.aureus* còn gây hội chứng sốc nhiễm độc do tiết ra độc tố gây sốc. Theo một số cơ quan quản lý thực phẩm châu Âu, các vi sinh vật gây bệnh phổ biến có nguồn gốc từ thực phẩm bao gồm *Salmonella, Escherichia coli O157:H7, S. aureus* và *Listeria* cùng với một số loài khác. Sử dụng các chất hóa học để bảo quản thực phẩm ít được chấp nhận vì nhiều chất bảo quản hóa học đã làm ảnh hưởng lâu dài tới sức khỏe cộng đồng. Trong số các chất bảo quản sinh học được biết hiện nay, endolysin hiện đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học do nó có khả năng diệt và ức chế các vi sinh vật gây bệnh.

Endolysins (hay tên gọi khác là lysins) là các enzym thủy phân có nguồn gốc từ thực khuẩn thể (bacteriophage) có tác dụng phá hủy peptidoglycan của

thành tế bào vi khuẩn trong giai đoạn cuối chu trình sinh sản của thực khuẩn thể. Các enzyme này làm giảm độ mạnh cơ học của thành tế bào dẫn đến dung giải tế bào và giải phóng ra các thực khuẩn thể thế hệ tiếp theo. Do đó khi có mặt endolysins chúng có thể phân hủy lớp peptidoglycan của thành tế bào của mọi vi sinh vật khi chúng tiếp xúc, dẫn đến vi sinh vật bị chết. Do vậy chúng được coi như là một chất thay thế kháng sinh thực phẩm có tính tác động chọn lọc, không thay đổi đặc điểm cảm quan, kết cấu của thực phẩm và rất an toàn cho con người.

Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: "**Nghiên cứu thu nhận enzym Endolysin tái tổ hợp LysSa và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* trong bảo quản sữa.**"

1. MỤC ĐÍCH CỦA ĐỀ TÀI:

Nghiên cứu tối ưu các điều kiện nhân nuôi chủng tái tổ hợp *E.coli* BL21, thu nhận enzyme endolysin LysSa và đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* của endolysin LysSa tái tổ hợp trong bảo quản sữa.

2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU:

2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng, xác định các điều kiện tối ưu cho chủng *E.coli* BL21 sinh trưởng và biểu hiện enzym endolysin LysSa:

- Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy
- Ảnh hưởng của nhiệt độ
- Ảnh hưởng của pH
- Ảnh hưởng của chất cảm ứng IPTG

2.2. Nghiên cứu thu hồi và enzyme endolysin LysSa

- Nghiên cứu phương pháp thu hồi enzyme endolysin LysSa
- Nghiên cứu tinh sạch enzyme endolsin LysSa.

2.3. Đánh giá được hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* trong bảo quản sữa

Chương 1

Thương 1N TÀI LIsữ

1.1.Tình hình ngu LIsữaus tính khán*Staphylococcus aureus*

1.1.1. Tình hình ngus aureusc ph hình ngus aureuscus aureus trên theusius

Theo WHO/FAO (tháng 5/2005), ngộ độc thực phẩm ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người và kinh tế, làm 1,5 tỉ lượt người bệnh, ở các nước công nghiệp 30% dân số bị ngộ độc thực phẩm hàng năm. Trên thế giới, vụ ngộ độc lớn đầu tiên có liên quan đến tụ cầu xảy ra vào năm 1884 ở Michigan (Mỹ) do phomai. Tiếp đến là ở Pháp vào năm 1894 do thịt từ bò bị bệnh. Khô bò bị nhiễm tụ cầu cũng từng gây ngộ độc ở Kalamazoo, Michigan vào năm 1907. Năm 1914, ở Philippines, Barbert xác định rằng sữa lấy từ bò bị viêm vú đã gây ra ngộ độc ở người. Năm 1930, Dark lại xác định được vụ ngộ độc do *S. aureus* từ bánh giáng sinh (Reginald Bennett, 2001). Ở Pháp, số vụ ngộ độc báo cáo từ năm 1999-2000 cho thấy: 32% số vụ là do sản phẩm sữa và đặc biệt là phô mai, 22% do thịt, 15% do xúc xích, bánh pate; 11% do các và hải sản; 11% do trứng và sản phẩm trứng; 9,5% do gia cầm (Haeghebaert và cs., 2002). Ngộ độc do *S. aureus* đứng hàng thứ hai sau *Salmonella* (bảng 1.1). Những thực phẩm bị nhiễm tụ cầu và gây ngộ độc thường gặp là thịt, cá, gà và sản phẩm của chúng, rau cải, trứng, nấm, sữa và sản phẩm từ sữa, kem, phomai, thực phẩm lên men…(Normanno G. và cs, 2004). Ở Đài Loan, *S. aureus* chiếm 30% trong số các vụ dịch từ năm 1986 đến năm 1995. Vào tháng 6 năm 2000, vụ ngộ độc thực phẩm do tụ cầu tại một trường trung học ở Taichung County làm 10 trong số 356 học sinh có biểu hiện ngộ độc 2-3 giờ sau khi ăn sáng (Wei H.L. và Chiou C.S., 2001). Tại Brazil, vào tháng 2 và tháng 5 năm 1999 đã xảy ra hai vụ dịch làm 378 người bị ngộ độc do dùng phomai và sữa tươi có nhiễm tụ cầu (Simeão L.C và cs, 2001). Tại Pháp, năm 1997 người ta tìm thấy *S. aureus* là tác nhân gây ra 569 trong tổng số 1142 vụ ngộ độc thực phẩm (Rosec J.P. và Gigaud O., 2002). Ở Nhật, từ năm 1994 đến năm 1998, số trường hợp ngộ độc do tụ cầu chiếm 3,1-11,9% tổng số các vụ

ngộ độc thực phẩm do vi khuẩn. Ngày 17/6/1999, 21 trong số 53 công nhân sau khi ăn trưa tại căn tin công ty ở Shizuoka Prefecter thì có biểu hiện bệnh, trong đó có 8 trường hợp phải nhập viện (Norinaga M. và cs, 2000).

Bảng 1.1. Các tác nhân vi sinh vật gây ngộ độc thực phẩm ở Pháp năm 1999-2000 (%)

Tác nhân	số vụ n=530	số trường hợp n=6451	Số nhập viện n=872	Số chết n=7
Salmonella sp. (Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg và một số serotype khác)	63,8	47,7	16,8	100
Staphylococcus aureus	**16**	**25,6**	**17,1**	**0**
Clostridium perfringens	5,1	12,3	0,5	0
Bacillus cereus	2,8	3,7	10,0	0
Histamin	3,8	1,4	30,4	0

Các loại thực phẩm liên quan đến ngộ độc thực phẩm do *S.aureus* cũng rất khác nhau ở mỗi quốc gia. Chẳng hạn ở Mỹ, 50% số vụ ngộ độc được báo cáo từ năm 1969-1990 là từ các sản phẩm thịt, các món ăn từ thịt và đặc biệt là thịt muối; 22% trường hợp là do gia cầm, các món ăn từ gia cầm, 8% từ sữa và sản phẩm sữa; 7% do cá và tôm cua, ghẹ; 3,5% do trứng. Số vụ ngộ độc báo cáo từ năm 1975-1982 cho thấy: 36% do thịt; 12,3% do salad; 11,3% do gia cầm; 5,1% do bánh nướng, bánh bao và chỉ có 1,4% do sữa và sản phẩm hải sản. 17,1% thực phẩm liên quan vụ ngộ độc không được biết (Genigeorgis, 1989). Sự khác biệt này là do thói quen ăn uống cũng rất khác nhau theo từng nước. Tụ cầu gây ra khoảng 14% trong các vụ ngộ độc thực phẩm; và hàng năm, Mỹ mất khoảng 1,5 tỉ đô la cho những vụ ngộ độc do tụ cầu. Trong các loại độc tố gây ra các vụ ngộ độc thì SEA là loại độc tố chiếm tỷ lệ cao nhất (77,8%), SED (37,5%) và SEB (10%) (Normanno G.và ctv, 2004).