

**BỘ GIÁO DỤC**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC**

**VÀ ĐÀO TẠO**

**VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

**PHẠM THỊ THU PHƯƠNG**

**ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN CỦA MÀNG AXIT POLYLACTIC  
– NISIN VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG BẢO QUẢN THỰC PHẨM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

Hà Nội – 2014

BỘ GIÁO DỤC

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ ĐÀO TẠO

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

PHẠM THỊ THU PHƯƠNG

**ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN CỦA MÀNG AXIT POLYLACTIC  
– NISIN VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG BẢO QUẢN THỰC PHẨM**

*Chuyên ngành* : Vi Sinh Vật Học

*Mã số* : 60 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

*Người hướng dẫn khoa học:* PGS. TS. LÊ THANH BÌNH

**Hà Nội – 2014**

## MỞ ĐẦU

Những vấn đề nan giải đối với thực phẩm hiện nay không những phải đối mặt với thực trạng mất an toàn vệ sinh nghiêm trọng mà còn phải đáp ứng các nhu cầu tiêu dùng ngày càng cao về đảm bảo chất lượng, tươi, ngon và cung cấp toàn cầu. Trước thực trạng đó, nghiên cứu nhằm tạo ra các loại bao bì có khả năng kháng khuẩn là một ưu tiên trong xu hướng “đóng gói tích cực, active packaging”. Đóng gói tích cực là giải pháp trong đó có sự tương tác giữa vật liệu bao gói, thực phẩm và môi trường để gia tăng thời gian bảo quản, độ an toàn, trong khi vẫn bảo đảm chất lượng, các tính chất cảm quan, độ tươi ngon của thực phẩm.

Trong hơn thập kỷ vừa qua, đã có nhiều công trình nghiên cứu, tìm kiếm, các loại chất bảo quản có nguồn gốc sinh học và vật liệu thay thế các polymer dầu mỏ, giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Sử dụng các chất kháng khuẩn có nguồn gốc sinh học như bacteriocin, trong đó, đặc biệt là nisin trong bảo quản, chế biến thực phẩm đang được quan tâm nhiều. Nisin có khả năng kìm hãm sự sinh trưởng của một số nhóm vi sinh vật gây bệnh, gây hỏng thối hỏng thực phẩm được xem là an toàn (GRAS). Hiện nay, nisin nằm trong danh mục các chất phụ gia an toàn có ký hiệu quốc tế E234, đã và đang được dùng để bảo quản thực phẩm ở hơn 50 quốc gia. Sử dụng nisin để bảo quản thực phẩm đã khắc phục các nhược điểm của các phương pháp bảo quản bằng hoá chất, chất kháng sinh, chiếu xạ. Ngoài ra, nisin có nhiều tính chất ưu việt như có bản chất protein, không độc, hoạt tính cao, phổ kháng khuẩn tương đối rộng, khả năng chịu được nhiệt độ và chịu áp suất cao. Vì vậy, nisin là ứng cử viên hàng đầu cho hướng nghiên cứu này.

Trong số các polymer phân hủy sinh học, axit polylactic (PLA) được tổng hợp từ axit L-lactic, một loại axit được sản xuất từ quá trình lên men vi sinh vật. Vì thế, PLA được xem là lựa chọn hàng đầu trong số các polymer sinh học có khả năng thay thế các polymer từ dầu mỏ. Hiện nay, một số loại sản phẩm nhựa sinh học PLA đã ra đời như Biota<sup>TM</sup>-Chai đựng nước bằng nhựa PLA, Noble<sup>TM</sup>- Bình đựng nước hoa quả bằng nhựa PLA, Dannon<sup>TM</sup>-hộp đựng sữa chua bằng nhựa PLA.

Hướng nghiên cứu tạo vật liệu từ các polymer sinh học và chất kháng khuẩn nguồn sinh học, để tạo ra sản phẩm bao bì thực phẩm có khả năng kháng khuẩn và phân hủy sinh học- rõ ràng là một giải pháp “thân thiện môi trường” và là lựa chọn căn cơ cho sự phát triển bền vững.

Xuất phát từ những thực tiễn trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: “**Đánh giá tác dụng kháng khuẩn của màng axit polylactic – nisin và khả năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm**”. với mục tiêu :

- Đánh giá khả năng kháng khuẩn của màng axit polylactic – nisin
- Đánh giá khả năng phân hủy sinh học của màng axit polylactic – nisin
- Nghiên cứu điều kiện, thời gian bảo quản màng axit polylactic – nisin
- Ứng dụng màng axit polylactic – nisin để bảo quản thực phẩm lên men (nem chua) và bánh cốm

## PHẦN I. TỔNG QUAN

### 1.1. HIỆN TRẠNG VÀ XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU BAO BÌ THỰC PHẨM KHÁNG KHUẨN VÀ PHÂN HỦY SINH HỌC

Tình trạng thực phẩm hiện nay đang đứng trước các nguy cơ mất an toàn vệ sinh cao trong khi lại phải đáp ứng các nhu cầu tiêu dùng các loại thực phẩm đảm bảo chất lượng, tươi, ngon và cung cấp toàn cầu. Xu hướng đó đã dẫn tới những thay đổi mạnh mẽ của ngành công nghiệp bao bì và đóng gói thực phẩm [18; 71]. Các loại bao bì an toàn và thân thiện môi trường được phát triển. Các loại chất bảo quản có nguồn gốc sinh học đang dần thay thế các chất bảo quản hóa học và chất kháng sinh. Hướng nghiên cứu tạo ra các loại bao bì có khả năng kháng khuẩn, có khả năng ức chế, tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh, gây ngộ độc thực phẩm, bảo đảm chất lượng, độ tươi ngon của thực phẩm, an toàn cho người sử dụng và thân thiện với môi trường đang thu hút nhiều nghiên cứu [12; 46; 47; 48; 51; 56; 58; 82]. Trong thập kỷ vừa qua, đã có nhiều công trình nghiên cứu, tìm kiếm, sử dụng các vật liệu có nguồn gốc sinh học để dần thay thế các polyme dầu mỏ và giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Hiện nay, các loại vật liệu phân hủy sinh học như axit polylactic (PLA), polyhydroxybutyrate (PHB) được xem là các ứng cử viên cho hướng phát triển này. Bởi vì, PLA, PHB có khả năng phân hủy trong tự nhiên, không gây ô nhiễm môi trường, không phụ thuộc vào tăng giá do quá trình khan hiếm của dầu mỏ... Trong số các polymer phân hủy sinh học, PLA là loại được tổng hợp từ axit L-lactic, loại axit được sản xuất từ quá trình lên men vi sinh vật từ các nguồn nguyên liệu rẻ, có sẵn như ngô, khoai, sắn hoặc từ sinh khối thực vật. Vì thế, PLA được xem là lựa chọn hàng đầu trong số các polyme sinh học có khả năng thay thế các polyme từ dầu mỏ.

Sử dụng các chất kháng khuẩn có nguồn gốc sinh học như bacterocin, trong đó, đặc biệt là nisin trong quá trình bảo quản, chế biến thực phẩm đang được quan tâm nhiều. Nisin có khả năng kìm hãm sự sinh trưởng của một số nhóm vi sinh vật gây bệnh, gây thối hỏng thực phẩm và được xem là an toàn (GRAS). Nisin là một bacteriocin, cấu tạo gồm 34 axit amin, có khối lượng phân tử 3,5 kDa, được tổng hợp bởi một số chủng thuộc loài *Lactococcus lactis*. Nisin được Tổ chức Nông Lương và Y tế thế giới (FAO/WHO), cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm (FDA) của Mỹ cho phép

sử dụng trong bảo quản và làm phụ gia thực phẩm. Hiện nay, nisin nằm trong danh mục các chất phụ gia có ký hiệu quốc tế E234, đã và đang được dùng để bảo quản thực phẩm ở hơn 50 quốc gia. Phạm vi ứng dụng của nisin khá rộng, từ các sản phẩm tươi sống đến các loại thực phẩm lên men, đóng hộp, dạng rắn cũng như dạng nước. Sử dụng nisin không làm thay đổi cảm quan, không làm biến đổi chất lượng, không để lại dư lượng trong thực phẩm. Sử dụng nisin để bảo quản thực phẩm đóng hộp, sẽ làm giảm nhiệt độ và thời gian thanh trùng. Nisin đã trở thành chất chuyên biệt dùng để bảo quản thực phẩm, là chất bảo quản nguồn gốc sinh học có giá trị, khắc phục được nhược điểm của các phương pháp sử dụng hoá chất, chất kháng sinh, chiếu xạ. Nisin có nhiều tính chất ưu việt như có bản chất protein, không độc, hoạt tính cao, phổ kháng khuẩn tương đối rộng, khả năng chịu được nhiệt độ và chịu áp suất cao [18].

Hướng nghiên cứu tạo vật liệu từ các polyme sinh học và chất kháng khuẩn, để tạo ra sản phẩm bao bì bảo quản thực phẩm có khả năng kháng khuẩn và phân hủy sinh học đang là mục tiêu của nhiều nhóm nghiên cứu. Trong công trình của Kritos và cộng sự [51], đã sử dụng màng natri – casein kết hợp với nisin để tạo ra màng kháng khuẩn. Trong khi đó, Xu và cộng sự [81] lại tạo màng từ glucomana – gellan - nisin, Millette và cộng sự [58] tạo ra màng kháng khuẩn sinh học bản chất alginate - nisin... Gần đây, trong công bố của Liu và cộng sự [56], các tác giả đã sử dụng 80 % PLA, 20 % pectin và kết hợp với 200 IU nisin/g để tạo ra loại polyme sinh học có tính kháng khuẩn.

An toàn vệ sinh thực phẩm ở Việt nam là một vấn đề vô cùng cấp bách, đang gây nhiều bức xúc, vấn nạn cho xã hội. Các loại thực phẩm được chế biến, bảo quản và vận chuyển hầu hết trong điều kiện không an toàn. Thực phẩm chủ yếu chỉ được đựng và bao gói bằng bao giấy và các màng polyme có nguồn gốc dầu mỏ. Những loại màng này được tạo ra từ các loại polyme như polyethylene (PE), polypropylene (PP), polyvinylclorua (PVC). Nhược điểm của các loại màng này và bao giấy là, ngoài việc gây tổn thất chất dinh dưỡng trong quá trình bảo quản, lại không có tác dụng đối với vi sinh vật gây bệnh thực phẩm nội tại hay xâm nhập từ bên ngoài. Mặt khác, các màng này không có khả năng tự phân hủy, nên lại là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường. Ngoài ra, việc bảo quản thực phẩm thường lạm dụng quá mức các chất hóa học và đặc biệt là việc sử dụng các chất kháng sinh trong y học vào bảo quản, chế biến thực

phẩm, đây là một nguyên nhân dẫn đến tình trạng phát tán nhanh tính kháng thuốc, là nguy cơ lớn đối với sức khỏe con người.

Việt Nam chưa có nghiên cứu về bao bì có tính kháng khuẩn và tự phân hủy. Tuy đã có một số nghiên cứu về polyme sinh học như là chitosan, tinh bột biến tính và một số polymer được tách từ tự nhiên nhưng những nghiên cứu về chất kháng khuẩn có nguồn gốc sinh học đầu tiên phải kể đến nhóm nghiên cứu của Lê Thanh Bình và cộng sự [3; 9]. Tuy nhiên, hầu hết các công trình trên chủ yếu tập trung vào vấn đề tạo chủng giống, năng suất, công nghệ sản xuất, sản phẩm, hướng nghiên cứu tạo vật liệu bao bì thực phẩm chưa được đề cập.

## 1.2. NISIN

### 1.2.1. Lịch sử nghiên cứu về nisin

Năm 1877, Pasteur và Joubert đã lần đầu tiên ghi nhận hiện tượng ức chế lẫn nhau giữa các chủng *Bacillus anthracis*, một loại vi khuẩn thường được tìm thấy có mặt trong nước tiểu [73]. Những nghiên cứu tiếp theo của Florey và cộng sự cũng khám phá ra bệnh than (anthrax) và bệnh bạch hầu (diphtheria) bằng các vi sinh vật không gây bệnh, có tính đối kháng. Năm 1925, Gratia đã phát hiện đã ra sự ảnh hưởng lẫn nhau của hai chủng *E. coli*. Đến năm 1928, Roges là người đầu tiên phát hiện ra nisin, một polypeptide do chủng *Lactococcus* tổng hợp có khả năng ức chế chủng *L. lactis*. Năm 1946, Gratia và Frederic đã phân lập thành công một chất sinh ra từ chủng *E. coli* V có khả năng ức chế *E. coli* và gọi tên là “colicine”. Vào năm 1953, Jacob và cộng sự đã sử dụng “bacteriocin” làm thuật ngữ chung cho các chất kháng khuẩn có bản chất protein được sinh ra từ vi sinh vật. Năm 1982 theo Konisky thì thuật ngữ colicine ngày nay được dùng để chỉ các bacteriocin được sản xuất bởi một số chủng thuộc loài *E. coli* và có quan hệ gần họ với họ *Enterobacteriaceae*. Chính vì thế mà ý nghĩa ban đầu của thuật ngữ bacteriocin có đặc trưng phổ biến của colicine như: có phổ kháng khuẩn hẹp và có khả năng bám lên các thụ thể trên bề mặt tế bào [18]. Sau đó, phát hiện bổ sung về mối liên quan giữa sự tổng hợp bacteriocin và plasmid. Tại đây cho thấy có sự khác nhau giữa colicine và bacteriocin được sinh ra bởi các chủng vi khuẩn Gram dương [18; 73]. Bacteriocin được tổng hợp từ các vi khuẩn Gram dương không có thụ thể đặc biệt để bám trên bề mặt tế bào, thường có khối lượng thấp hơn



colicine, có thể có cơ chế tiêu diệt khác so với colicine, có phổ tác dụng rộng hơn và khác nhau về cách vận chuyển và giải phóng trong tế bào và nó có thể có trình tự đầu được phân chia trong giai đoạn thành thực [18; 45].

Trong suốt 2 thập kỷ gần đây, bacteriocin – một sản phẩm do vi sinh vật sinh ra có khả năng giết hoặc ức chế sự phát triển của các vi sinh vật khác đã được nghiên cứu rất nhiều về các đặc tính sinh hóa cũng như các đặc điểm về di truyền ở cấp độ phân tử bởi vai trò của nó trong vấn đề bảo quản. Bacteriocin có đặc tính giống như một kháng sinh vì nó có khả năng kháng khuẩn nhưng bacteriocin không phải là kháng sinh. Bacteriocin khác với các kháng sinh bởi quá trình tổng hợp, cơ chế tác dụng, phổ tác dụng, tính miễn dịch của chủng sản, đích tấn công... [19]. Bacteriocin có bản chất protein, được tổng hợp ở ribosome và có phổ kháng khuẩn hẹp, có khả năng ức chế các vi khuẩn có quan hệ họ hàng với nó [21; 25; 73]. Theo Joger và cộng sự năm 2000, bacteriocin là một polypeptide được tổng hợp ở ribosome và bị phân hủy rất nhanh bởi enzym phân hủy protein trong hệ tiêu hóa của người. Vì vậy, để nghiên cứu bản chất protein của những bacteriocin mới người ta thường thử khả năng nhạy cảm của chúng với các enzym phân hủy protein.

### **1.2.2. Cấu trúc của nisin**

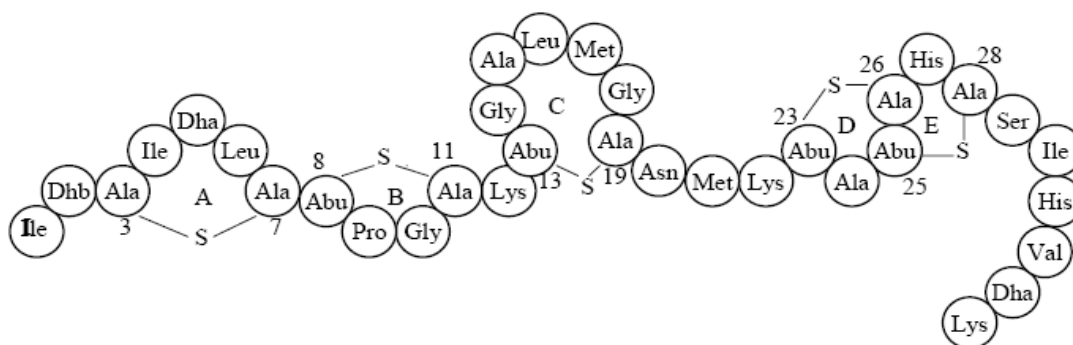
Nisin có công thức C<sub>143</sub>H<sub>230</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>7</sub>, là một bacteriocin thuộc nhóm I- còn gọi là nhóm lantibiotic trong hệ thống phân loại 4 nhóm. Nisin cấu tạo gồm 34 axit amin, có khối lượng phân tử 3,5 kDa, được tổng hợp bởi một số chủng thuộc dưới loài *L. lactis* subsp. *lactis*, thường được viết là *L. lactis* [18; 44; 77]. Nisin được phát hiện từ năm 1928. Tuy nhiên, phải mãi tới năm 1957 mới xuất hiện nisin đầu tiên trong các phân xưởng sản xuất pho mát quy mô nông trại, để bảo quản các sản phẩm làm ra. Cũng trong năm này, hãng Aplin và Barrett đã đưa ra chế phẩm nisin thương mại sử dụng trong thực phẩm. Mặc dù vậy, giá trị của nisin trong bảo quản thực phẩm cũng chỉ được xác lập trong khoảng ba thập kỷ lại đây. Trong khi những nghiên cứu cơ bản và công nghệ ngày càng được quan tâm nhiều hơn [18; 67; 77; 85]. Dạng chế phẩm của nisin sẵn có nhất hiện nay trên thị trường là Nisaplin, với thành phần 2,5 % nisin.

Cấu trúc của nisin được Gross và Morell làm sáng tỏ năm 1971. Nisin là một chuỗi polypeptide gồm 34 axit amin tạo thành 5 vòng cấu trúc A, B, C, D, E, được nối

với nhau bằng cầu nối disulfide (hình 1.1). Có ít nhất 6 dạng nisin đã được phát hiện, ký hiệu từ A đến E và Z. Đến nay, 4 loại nisin đã được nghiên cứu đặc tính là nisin A, Z, Q và nisin U. Trừ trường hợp nisin U được tổng hợp bởi loài *Streptococcus uberis*, tất cả các nisin còn lại đều do loài *L. lactis* sinh ra.

Phân tử nisin không chứa các axit amin thơm, nên không hấp thụ ở bước sóng 280 nm. Các axit amin dị thường đóng vai trò như một nhóm ái nhân (nucleophile), được xác định thông qua khả năng phản ứng với các mercaptan. Có thể vì các nhóm này rất quan trọng để đảm bảo nisin có khả năng xâm nhập vào màng tế bào đích. Cấu trúc gồm 5 vòng của nisin giúp cho nó có độ vững chắc, đồng thời góp phần đề kháng lại các tác dụng của enzym proteinase và sự biến tính do nhiệt.

Phân tử nisin có thể tồn tại ở dạng monome với khối lượng phân tử 3500 Dal. Tuy nhiên, do các phân tử nisin có thể tương tác, liên kết với nhau thông qua các nhóm axit dehydroamin và các nhóm amin. Vì vậy, nisin có thể tồn tại ở dạng dime hay tetrame, với khối lượng phân tử tương ứng là 7000 Dal và 14000 Dal.



**Hình 1.1.** Cấu trúc phân tử nisin

Những thành tựu nghiên cứu sinh học phân tử gần đây, chứng minh nisin bao gồm một số peptide có tính kháng khuẩn, một sản phẩm dị gen, bao gồm 11 gen như sau: Nis A, Nis B, Nis T, Nis C, Nis I, Nis P, Nis R, Nis K, Nis F, Nis E và Nis Z.

Trong tự nhiên, tồn tại chủ yếu 2 dạng nisin là A và Z, chúng khá bền vững. Cấu tạo của nisin A và Z chỉ khác nhau bởi một axit amin ở vị trí thứ 27, histidine trong cấu trúc của nisin A, trong khi axit aspartic ở nisin Z.

Do có bản chất là một protein, nên hầu hết các đặc điểm hóa lý của nisin phụ thuộc nhiều vào pH của môi trường xung quanh. Mức độ hoà tan của nisin phụ thuộc