

LÊN MEN MALOLACTIC CỦA *STREPTOCOCCUS MUTANS* VÀ VAI TRÒ BẢO VỆ VI KHUẨN KHỎI TỔN THƯƠNG OXI HÓA

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG

Viện Công nghệ sinh học

ROBERT E. MARQUIS

Đại học Rochester, Hoa Kỳ

Lên men malolactic (malolactic fermentation - MLF) do vi khuẩn *Oenococcus oeni* thực hiện đã được nghiên cứu khá chi tiết do vai trò quan trọng của nó trong công nghiệp sản xuất rượu [5]. Đây là quá trình lên men thứ cấp sau quá trình lên men rượu do nấm men thực hiện. Trong quá trình lên men này, axit L-malic dicarboxylic được chuyển hóa thành axit monocarboxylic L-lactic và giải phóng CO₂, giúp làm tăng hương vị và làm giảm độ axit của rượu. Sự lên men này còn được phát hiện ở nhiều chủng vi khuẩn lactic (LAB) khác như các thành viên của chi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, và *Streptococcus* [1-3]. Quá trình decarboxyl hóa của L-malic được thực hiện nhờ enzym malolactic (MLE) với sự có mặt của NAD⁺ và Mn²⁺ [11]. Sự lên men cũng đi kèm với quá trình sinh tổng hợp ATP được xúc tác bởi enzym F(H⁺)-ATPase trên màng, vì quá trình lên men dẫn đến sự kiềm hóa tế bào chất do L-lactic hình thành có độ axit thấp hơn L-malic. Điều này cho phép proton được vận chuyển từ bên ngoài vào tế bào chất thông qua hoạt động của enzym F-ATPase theo cơ chế synthetase. Kết quả là ATP được hình thành. Mặt khác, sự sinh tổng hợp ATP có thể còn liên quan đến hệ thống vận chuyển đối ngược malate/lactate (antiport) cũng có sự tham gia của F(H⁺)-ATPase [9]. Gần đây, Sheng và Marquis [10] đã phát hiện thấy chủng *Streptococcus mutans* UA159 có mang các gene mã hoá cho quá trình lên men malolactic trong đó có SMu 0121 mã hoá cho MLE có trình tự base tương tự như trình tự của enzym này ở các chủng LAB [1, 4]. Khi nghiên cứu về sinh lý của quá trình này, các tác giả đã phát hiện thấy MLF có vai trò làm kiềm hóa mảng bám răng (dental plaque), vì vậy làm tăng khả năng chịu stress axit của vi khuẩn *S. mutans*. Bài báo này

trình bày những phát hiện của chúng tôi về vai trò của MLF ở vi khuẩn *S. mutans* và có thể ở cả những chủng vi khuẩn *Streptococcus* xoang miệng khác trong việc bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa gây ra bởi các gốc oxy hoạt động (ROS) là O₂⁻, H₂O₂ và OH⁻.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Streptococcus mutans UA159 được nuôi giữ và cấy chuyển hàng tuần trên môi trường thạch chứa bovine heart infusion - BHI agar (Difco Laboratories, Detroit, MI). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường TYM chứa 3% tryptone, 0,5% cao nấm men, 25 mM glucose và 50 mM L-malic để cảm ứng hoạt tính enzym malolactic (MLE).

2. Đo sự lên men L-malic

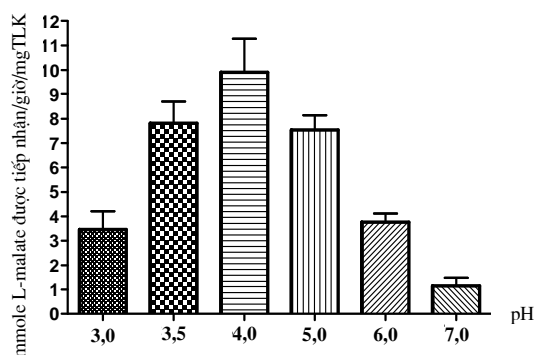
Tế bào được thu hoạch ở giai đoạn đầu của phase ổn định và được rửa 2 lần bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 g trong 15 phút ở 4°C với dung dịch muối có chứa 50 mM KCl và 1 mM MgCl₂. Tế bào sau đó được hòa trở lại với dung dịch muối ở mật độ tế bào khoảng 1,1 mg trọng lượng khô/ml. Axit L-malic ở pH 4,0 được thêm vào ở nồng độ cuối cùng là 10 mM để bắt đầu phản ứng. Sự tiếp nhận L-malic tại mỗi thời điểm nhất định được đo bằng việc xác định hàm lượng L-malic đã được chuyển hóa thành axit L-lactic sử dụng kit của hãng Boehringer Mannheim (Darmstadt, Germany) có chứa enzym L-malic dehydrogenase. Đây là phương pháp đặc hiệu để xác định axit L-malic. Khả năng tiếp nhận L-malic của tế bào từ quá trình MLF được biểu diễn bằng đơn vị nanomole L-malic decarboxylated/phút/mg trọng lượng khô tế bào.

3. Tác dụng bảo vệ tế bào

Các gốc oxi hoạt động (ROS) được nghiên cứu ở đây bao gồm H_2O_2 (Sigma), OH^- (tạo thành từ phản ứng Fenton của H_2O_2 kết hợp với ion kim loại có khả năng chuyển đổi là Cu^{2+}) và O_2^- (tạo thành từ hệ thống xanthine-xanthine oxidase). Cụ thể, tế bào *S. mutans* sau khi nuôi cấy trong môi trường TYM được thu hoạch, rửa và hòa lại trong dung dịch muối có chứa 50 mM KCl và 1 mM $MgCl_2$ ở nồng độ 0,4 mg trọng lượng khô tế bào. L-malic ở pH 4,0 được thêm vào dung dịch tế bào để đạt nồng độ cuối cùng là 30 mM. Sau đó, H_2O_2 , tổ hợp chất $H_2O_2/CuCl_2$ (để tạo OH^-) hay tổ hợp chất xanthine/xanthine oxidase (để tạo O_2^-) được tiếp tục thêm vào. Ở những thời điểm nhất định, 100 μ L mẫu được lấy ra, pha loãng 10 lần liên tiếp với dung dịch peptone 1% (Difco Laboratories, Detroit, MI) ở pH 7,0 và được cấy trải trên đĩa thạch BHI. Các đĩa này được ủ trong tủ ấm 37°C trong vòng 48 giờ cho đến khi khuẩn lạc hình thành rõ rệt, có thể đếm được bằng mắt thường [8].

4. Xác định hàm lượng ATP có trong tế bào chất

Hàm lượng ATP trong tế bào chất của *S. mutans* được xác định theo phương pháp đo ATP bằng huỳnh quang (bioluminescence) đã được Sheng & Marquis mô tả (2006). ATP được chiết ra từ tế bào bằng đệm Tris-HCl 20 mM nóng có chứa EDTA 2 mM, pH 7,75. Hàm lượng ATP trong dịch chiết sau đó được xác định sử dụng kit Luciferase/Luciferin của hãng Promega (Madison, WI) trên máy đo huỳnh quang Luminometer Turner Designs (Sunnyvale, CA), Model DT-20/20.

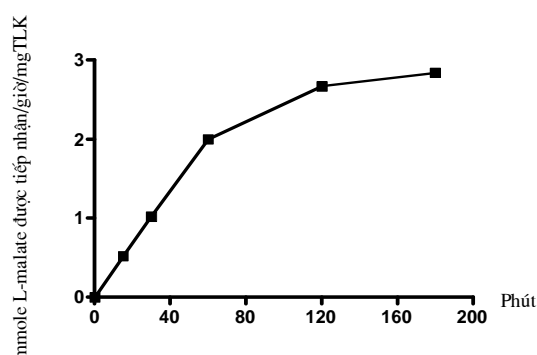


Hình 1. MLF của *S. mutans* tại các giá trị pH khác nhau

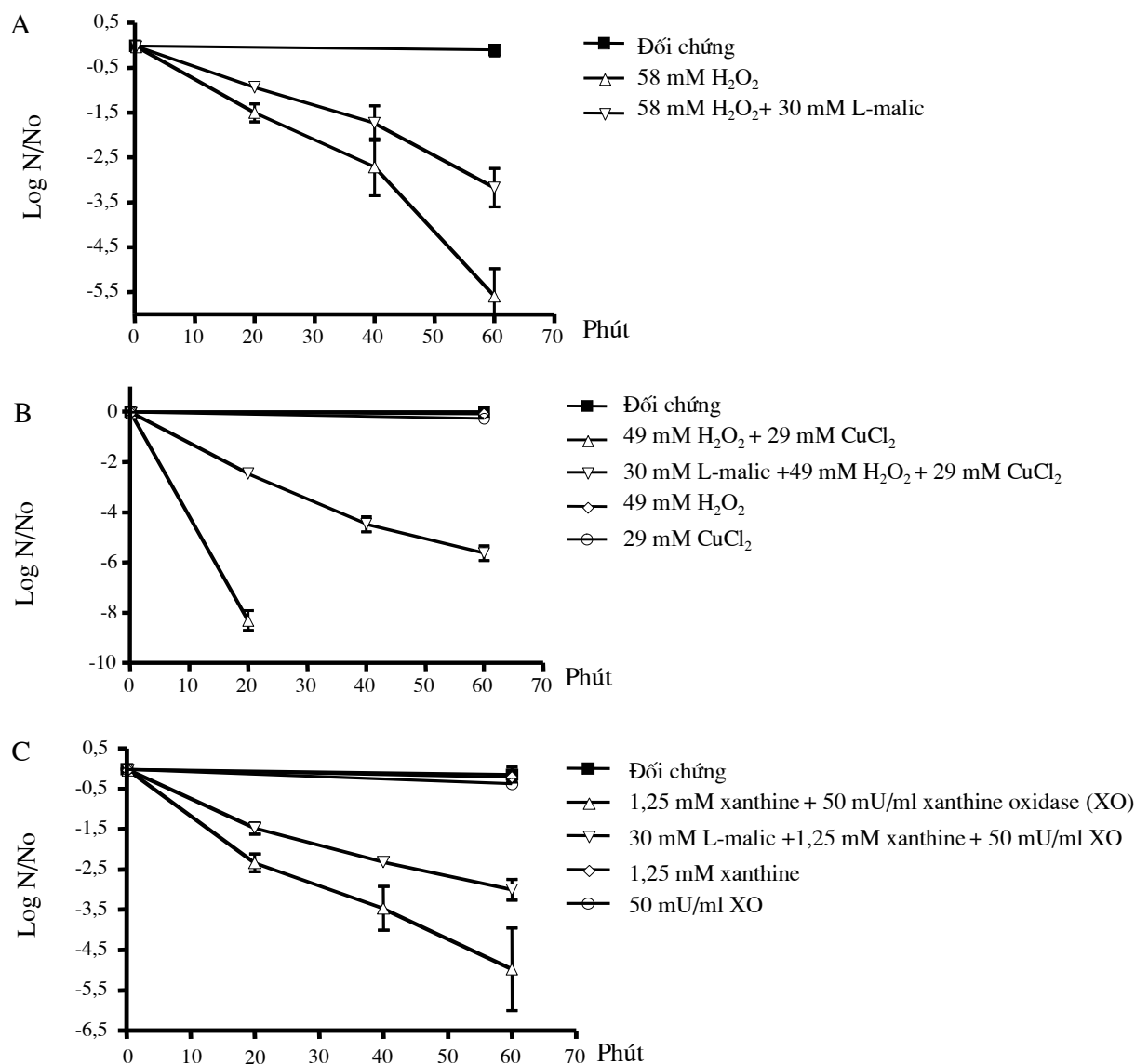
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. MLF và khả năng tiếp nhận L-malic ở vi khuẩn *S. mutans*

Hệ thống lên men L-malolactic mới được phát hiện và nghiên cứu ở *S. mutans* rất gần đây [10]. Hệ thống này được xem là có vai trò bảo vệ tế bào *S. mutans* khỏi tổn thương do stress axit gây ra. MLF được bắt đầu bằng việc tiếp nhận L-malic nhờ enzym permease nằm trên màng (Smu 0125) và sau đó cơ chất này được chuyển hóa thành axit L-lactic và CO_2 nhờ MLE nằm trong tế bào chất. Ở các chủng vi khuẩn có MLF đã biết như LAB, MLF xảy ra mạnh tại các giá trị pH thấp hơn 3,0 [5, 11]. Để tìm hiểu khả năng tiếp nhận L-malic ở *S. mutans*, chúng tôi đã tiến hành xác định khả năng đồng hóa L-malic tại các giá trị pH khác nhau để tìm ra điều kiện pH tối thích cho quá trình lên men này ở *S. mutans*. Kết quả trình bày ở hình 1 cho thấy, MLF ở *S. mutans* có thể diễn ra ở các giá trị pH khác nhau từ 3,0 đến 7,0. Tuy nhiên, giá trị pH 4,0 là thích hợp nhất cho hoạt động MLF của *S. mutans*, đồng nghĩa với việc vi khuẩn có khả năng tiếp nhận L-malic tốt nhất. MLF tại pH 4,0 đạt tới 10,2 mmole/phút/mg trọng lượng khô (TLK) tế bào so với các giá trị 3,2 ở pH 3,0; 7,8 ở pH 5,0; 4,0 ở pH 6,0 và 1,6 ở pH 7,0. Động học của quá trình tiếp nhận L-malic tại pH 4,0 cũng đã được xác định (hình 2) và cho thấy, tại giá trị pH 4,0, quá trình tiếp nhận đạt mức độ tuyến tính trong khoảng thời gian 60 phút đầu tiên và sau đó tiến dần đến giá trị bão hòa. Những kết quả thu được ở đây là cơ sở để chúng tôi lựa chọn những điều kiện thích hợp cho các nghiên cứu về MLF tiếp theo.



Hình 2. Động học của quá trình tiếp nhận L-malic của *S. mutans* tại giá trị pH 4,0



Hình 3. LMF bảo vệ *S. mutans* khỏi tác dụng gây chết của các gốc tự do. A. H₂O₂; B. OH; C. O₂⁻

2. MLF bảo vệ *S. mutans* khỏi tác dụng gây chết của các gốc tự do

MLF được phát hiện có vai trò bảo vệ *S. mutans* khỏi tổn thương do axit [10], nhưng cho đến nay chưa có công bố nào đề cập đến vai trò của nó trong các quá trình sinh lý khác của tế bào trong đó có stress oxi hóa, cùng với stress axit là hai stress rất phổ biến trong mảng bám răng.

Các vi khuẩn xoang miệng trong đó có *S. mutans* trên mảng bám răng phải thường xuyên tiếp xúc với các gốc ROS [7]. Các gốc

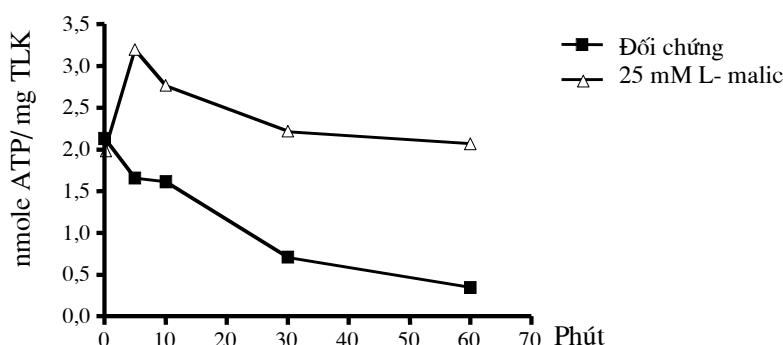
ROS này có khả năng tấn công các đại phân tử sinh học của tế bào như protein, ADN và lipid, gây chết tế bào [6]. Vậy hệ thống MLF có vai trò như thế nào trong việc bảo vệ tế bào khỏi tác dụng gây tổn thương oxi hóa do các ROS gây ra? Để tìm hiểu vấn đề này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tác dụng gây chết tế bào *S. mutans* khi có mặt của các gốc tự do và L-malic (cơ chất của quá trình lên men MLF). Kết quả thu được ở hình 3A cho thấy rằng, khi không có mặt của L-malic, H₂O₂ có tác dụng gây chết mạnh tế bào với giá trị D (thời gian gây chết 90% quần thể tế bào) là khoảng 15 phút.

Tuy nhiên, khi có mặt của L-malic và quá trình MLF diễn ra, giá trị D tăng lên đến 27 phút, đồng nghĩa với việc tế bào đã được bảo vệ một phần khỏi tác dụng của ROS này. Một bức tranh tương tự cũng được tìm thấy khi tế bào được xử lý với OH⁻ (tạo ra từ phản ứng của H₂O₂ và CuCl₂) và O₂⁻ (tạo ra từ phản ứng của xanthine và xanthine oxidase). Đặc biệt, trong trường hợp có mặt của OH⁻, tác dụng bảo vệ của MLF là rất rõ rệt nhất với các giá trị D lần lượt đạt 10 và 26 phút (hình 3B). Tương tự như vậy, tác dụng bảo vệ của MLF là khá rõ ràng trong trường hợp của O₂⁻ với giá trị D = 9 và 13 phút (hình 3C). Như vậy có thể thấy rằng, MLF có tác dụng bảo vệ tế bào khỏi tác dụng tấn công của các gốc ROS. Đây là một phát hiện mới về mối liên quan giữa MLF và stress oxy hóa ở vi khuẩn nói chung và ở *S. mutans* nói riêng.

3. Sinh tổng hợp ATP trong quá trình MLF

Hàm lượng ATP trong tế bào chất của *S. mutans* trong quá trình MLF tại pH 4,0 đã

được xác định để tìm hiểu mối liên quan giữa tác dụng bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa do ROS của MLF và quá trình sinh tổng hợp ATP. Kết quả trình bày ở hình 4 cho thấy, hàm lượng ATP nội sinh đã tăng lên rõ rệt trong quá trình lên men này so với đối chứng. Tế bào sinh tổng hợp ATP mạnh trong khoảng 10 phút đầu của quá trình tiếp nhận L-malic và duy trì hàm lượng ATP cao trong suốt thời gian 60 phút thí nghiệm. Trong khi đó, hàm lượng ATP ở mẫu đối chứng lại bị giảm dần do được sử dụng vào các hoạt động sống sinh lý của tế bào khi môi trường bị đói cơ chất và gần như biến mất sau 60 phút. Phát hiện này cũng đã được Sheng và Marquis [10] mô tả khi tế bào được xử lý với stress axit trong điều kiện có mặt của L-malic. Như vậy, các số liệu thu được trong nghiên cứu này đã cho thấy sự tăng cường sinh tổng hợp ATP trong MLF có vai trò bảo vệ tổn thương oxy hóa ở vi khuẩn *S. mutans* và có thể là một thành phần quan trọng của đáp ứng với tổn thương oxy hóa ở vi khuẩn này.



Hình 4. Hàm lượng ATP trong quá trình MLF tại pH 4,0

III. KẾT LUẬN

Lên men malolactic ở vi khuẩn *S. mutans* có vai trò trong việc bảo vệ vi khuẩn khỏi tác dụng gây chết do các gốc oxy hoạt động gây ra thông qua việc tăng cường sinh tổng hợp ATP trong quá trình lên men này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ansanay V., Dequin S., Blondin B. & Barre P., 1993: Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. FEBS Lett, 332: 74-80.
2. Arthurs C. E. & Lloyd D., 1999: Kinetics, stereospecificity, and expression of the malolactic enzyme. Appl. Environ. Microbiol, 65: 3360-3363.
3. Battermann G. & Radler F., 1991: A comparative study of malolactic enzyme and malic enzyme of different lactic acid bacteria. Can. J. Microbiol, 37: 211-217.
4. Denayrolles M., Aigle M. and Lonvaud-Funel A., 1994: Cloning and sequence analysis of the gene encoding *Lactobacillus lactis* malolactic enzyme: relationships with malic enzymes. FEMS Microbiol. Lett, 116: 79-86.

5. **Herrero M., García L. A. and Díaz M.,** 2003: Malolactic bioconversion using a *Oenococcus oeni* strain for cider production: effect of yeast extract supplementation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 699-704.
6. **Imlay J. A.,** 2003: Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 395-418.
7. **Marquis R. E.,** 2004: Applied and ecological aspects of oxidative-stress damage to bacterial spores and to oral microbes. *Sci. Prog.*, 87: 153-177.
8. **Phan T. N., Reidmiller J. S. and Marquis R. E.,** 2000: Sensitization of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus sanguis* biofilms and suspensions to acid damage by fluoride and other weak acids. *Arch. Microbiol.*, 174: 248-255.
9. **Poolman B., Molenaar D., Smid E. D., Ubbink T., Abee T., Renault P. P. & Konings W. N.,** 1991: Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.*, 173: 6030-6037.
10. **Sheng J. & Marquis R. E.,** 2006: Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 262: 93-98.
11. **Strasser de Saad A. M., Pesce de Ruiz Holgado A. A. and Oliver G.,** 1988: Malolactic enzyme in *Lactobacillus murinus*. *Biochimie.*, 70: 357-365.

MALOLACTIC FERMENTATION BY *STREPTOCOCCUS MUTANS* AND PROTECTION AGAINST OXIDATIVE DAMAGE

NGUYEN THI MAI PHUONG, ROBERT E. MARQUIS

SUMMARY

Streptococcus mutans is the primary etiological agent of human dental caries. The extraordinary ability of *S. mutans* to adapt and survive the environmental stresses in human mouth, particularly oxidative stress even though it does not have catalase, a key protective enzyme against oxidative damage, make it be an attractive subject for dental research. In the oral cavity, *S. mutans* is routinely exposed to reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radical (OH^{\bullet}) generated by aerobic respiration, by H_2O_2 net secretors in plaque dental such as *Streptococcus sanguis* and *S. gordonii*, or by exposure to H_2O_2 -containing dental care products. Alkali production by oral streptococci is considered important for dental plaque ecology and caries moderation. Recently, malolactic fermentation (MLF) was identified as a major system for alkali production by oral streptococci, including *Streptococcus mutans*. Malolactic fermentation is inducible by L-malate, involving decarboxylation of L-malate to yield L-lactic acid and concomitant reduction in acidity. Our major objectives in the work described in this paper were to further define the physiology of MLF of *S. mutans* and its roles in protection against oxidative stress damage. For the first time, L-malic, was found to enhance the protection of *S. mutans* against oxidative damage by reactive oxygen species including $O_2^{\bullet-}$ generated by xanthine-xanthine oxidase system; H_2O_2 and OH^{\bullet} produced via Fenton reaction between H_2O_2 and metal cations at pH values of 4.0. Protection involved L-malic uptake with the significantly enhanced production of ATP from malate fermentation, to maintain ATP pool levels for physiological activities in the cells. In general, oxidative protection by malolactic fermentation against ROS damage involving catabolism of L-malic and ATP production is likely to be an important virulent trait of *S. mutans*.

Key words: *Streptococcus mutans*, malolactic fermentation (MLF), oxidative damage.

Ngày nhận bài: 4-5-2011