

Khảo sát hiệu quả quang phân li sắc tố staphyloxanthin từ vi khuẩn *Staphylococcus aureus* bởi ánh sáng LED bước sóng 460 nm

Vũ Văn Vân*, Ngô Nguyên Vũ

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành.

*vanvu@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Staphyloxanthin là một sắc tố màu vàng sáng thuộc nhóm carotenoid do vi khuẩn *Staphylococcus aureus* tổng hợp trên màng tế bào. Staphyloxanthin mang đặc tính kháng oxi hóa, do đó có tác dụng giúp vi khuẩn *Staphylococcus aureus* chống lại các tác nhân oxi hóa có khả năng phá hủy và giết chết vi khuẩn. Ánh sáng bước sóng 460 nm được chứng minh có khả năng gây phân giải quang staphyloxanthin, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng kháng oxi hóa của vi khuẩn *S. aureus*. Kết quả thử nghiệm trên dịch chiết thô staphyloxanthin cho thấy ánh sáng 460 nm ở cường độ 200 mW/cm² gây phân giải quang 41,1 % dịch chiết sau 5 phút chiếu. Mẫu dịch chiết thô tiếp tục bị phân giải quang thêm sau 5 phút chiếu, giảm 74,8 % so với ban đầu. Tuy nhiên khi thử nghiệm chiếu ánh sáng 460 nm trực tiếp lên sinh khối vi khuẩn còn staphyloxanthin trên màng tế bào, hiệu quả tác động của ánh sáng 460 nm bị giảm một phần, và hiệu quả phân giải quang theo thời gian chậm hơn so với tác động trực tiếp của ánh sáng lên dịch chiết. Kết quả của nghiên cứu thể hiện tiềm năng khả dụng của ánh sáng bước sóng 460 nm gây phân giải quang sắc tố staphyloxanthin của vi khuẩn *S. aureus*, là bước khởi đầu cần thiết để nghiên cứu phương án xử lý loài vi khuẩn này bằng ánh sáng 460 nm trong tương lai.

Nhận 18.12.2020
Được duyệt 27.03.2021
Công bố 09.04.2021

Từ khóa

Staphylococcus aureus,
staphyloxanthin,
phân giải quang,
ánh sáng 460 nm.

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Mở đầu

Hơn 90 % mẫu vi khuẩn *S. aureus* phân lập từ người bệnh có khả năng sản xuất một sắc tố với công thức phân tử C₅₁H₇₈O₈ mang tên staphyloxanthin [1]. Hợp chất staphyloxanthin là một hợp chất carotenoid có màu vàng sáng hoặc vàng cam, mang chức năng bảo vệ tế bào *S. aureus* chống lại các tác nhân oxi hóa [2]. Nhiều loại hợp chất carotenoid có đặc điểm nhạy sáng do phân tử của chúng mang nhiều liên kết C=C dễ bị ánh sáng ở các bước sóng khác nhau kích thích dẫn đến đứt gãy các mạch dài của phân tử sắc tố. Đặc biệt là ánh sáng bước sóng 460 nm có khả năng phá vỡ các liên kết C=C của phân tử staphyloxanthin, gây ra sự quang phân li của sắc tố này [3]. Do đó nhiều nghiên

cứ cũng đã chứng minh vi khuẩn *S. aureus* bị mất sắc tố staphyloxanthin trên màng tế bào trở nên yếu hơn trước các tác nhân oxi hóa, do đó việc xử lý *S. aureus* bằng phương pháp chiếu ánh sáng bước sóng 460 nm kết hợp với xử lý H₂O₂ sẽ mang lại hiệu quả tiêu diệt *S. aureus* vượt trội hơn nhiều lần [4]. Từ đó việc nghiên cứu tính khả dụng của ánh sáng bước sóng 460 nm gây phân giải quang sắc tố staphyloxanthin của vi khuẩn *S. aureus* là bước khởi đầu cần thiết để đánh giá tiềm năng của phương án xử lý loài vi khuẩn này trong tương lai.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Nguồn phát ánh sáng xanh $\lambda = 460$ nm

Đèn LED 460 nm gồm các bộ phận chip COB LED *LE B P2W* của hãng Osram, nguồn công suất cao 12 V – 30 A và bộ điều xung PWM, thấu kính và bộ tản nhiệt công suất cao TEC1-12730. Ánh sáng có độ rộng phổ (455 ÷ 485) nm, diện tích vùng chiếu sáng trên bề mặt phẳng khoảng (5 ÷ 50) cm² ở khoảng cách 20 cm. Công suất trung bình của đèn khoảng 150 mW, với mật độ công suất chiếu sáng trung bình 50 mW/cm² cách tâm chiếu sáng 7,5 cm.

2.2 Chiết xuất hợp chất staphyloxanthin từ vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

Vi khuẩn *S. aureus* được nuôi cấy trên đĩa môi trường thạch sữa (HiMedia) trong 72 giờ ở 37 °C để tế bào khuẩn phát triển và hình thành các cụm khuẩn lạc sinh staphyloxanthin. Sinh khối khuẩn được thu hồi bằng cách rửa nước cất bề mặt thạch hai lần, mỗi lần 3 mL. Sau đó, dịch rửa chứa các tế bào vi khuẩn được li tâm với tốc độ 6 000 rpm trong 15 phút. Phần dịch lỏng và các chất cặn nổi bị loại bỏ. Phần viên sinh khối được hòa lại với nước cất hai lần và sau đó li tâm lại với tốc độ 6 000 rpm trong 15 phút để rửa trôi các chất cặn lẫn vào. Sinh khối khuẩn sau khi rửa được trộn với 8 mL methanol 99,9 % trong các Eppendorf bọc bằng lá nhôm để tránh tiếp xúc với ánh sáng. Các Eppendorf sau đó được ủ ở 55 °C trong bể ủ nhiệt trong 15 phút và làm lạnh nhanh ở -20 °C trong 10 phút. Sau đó dịch chiết được thu hồi bằng cách li tâm ở tốc độ 13 000 rpm trong 20 phút. Quy trình được lặp lại hai lần để bảo đảm sắc tố staphyloxanthin được chiết xuất hoàn toàn từ sinh khối [5].

2.3 Phân giải quang dịch chiết thô staphyloxanthin bằng ánh sáng 460 nm

Quá trình chiếu ánh sáng 460 nm được thực hiện trong một buồng gỗ bọc mica đen để hạn chế ảnh hưởng của ánh sáng từ các nguồn bên ngoài tác động lên mẫu dịch chiết. Đèn được hiệu chỉnh để đạt mức năng lượng cần thiết bằng Lux kế Tenmars TM720. Khi đèn phát ra mức năng lượng ổn định mẫu mới được đưa vào vị trí tiếp nhận ánh sáng.

+ *Khảo sát các sự phân giải quang dịch chiết staphyloxanthin ở các nồng độ pha loãng khác nhau*

Mẫu dịch chiết thô staphyloxanthin sau khi thu hồi được đo mật độ quang ở bước sóng 470 nm. Mẫu sau đó được pha loãng ở các tỉ lệ khác nhau và chia vào các bình thủy tinh hình trụ (đường kính mặt đáy 2 cm, chiều cao 5 cm), mỗi bình 5 mL mẫu. Các bình được

chiếu ánh sáng 460 nm ở mức năng lượng 150 mW/cm², sau mỗi 10 phút mẫu được thu và mang đi đo mật độ quang ở bước sóng 470 nm, tiếp tục đến khi thu được dữ liệu của mẫu tại 6 mốc thời gian.

+ *Khảo sát các mức năng lượng gây phân giải quang dịch chiết staphyloxanthin*

Dịch chiết staphyloxanthin sử dụng trong thí nghiệm này được chia thành 5 phần. Mỗi phần bao gồm 5 mL dịch chiết được đựng trong bình thủy tinh hình trụ (đường kính mặt đáy 2 cm, chiều cao 5 cm) và được chiếu ánh sáng 460 nm ở các mật độ công suất chiếu sáng khác nhau, bao gồm (120, 200, 400 và 800) mW/cm². Mẫu được rút ra ở các mốc thời gian 5 phút, 10 phút và 15 phút và được đo mật độ quang ở bước sóng 470 nm để đánh giá hiệu quả gây phân giải quang của mức năng lượng ánh sáng. Chứng âm là 5 mL mẫu dịch chiết thô staphyloxanthin đựng trong chai bọc giấy bạc để ngăn cản ánh sáng nền tác động đến dịch chiết.

2.4 Đánh giá khả năng quang phân li staphyloxanthin của ánh sáng 460 nm trên sinh khối vi khuẩn

Vi khuẩn *S. aureus* được nuôi trong môi trường lỏng TSB ở 37 °C đến khi đạt mật độ xấp xỉ 10⁸ CFU/mL. Sau đó 100 µL dịch huyền phù chứa vi khuẩn được trải đều trên mặt các đĩa petri chứa môi trường thạch sữa (Sigma-Aldrich). Các đĩa này được ủ ở tủ ấm 37 °C trong 72 giờ để khuẩn lạc phát triển và tạo staphyloxanthin. Sinh khối vi khuẩn *S. aureus* sau đó được thu hồi từ mặt đĩa thạch nuôi cấy và hòa tan vào nước cất theo tỉ lệ 100 mg sinh khối / 1 mL nước cất. Dịch huyền phù pha khuẩn được chuyển vào ống nghiệm và chiếu ánh sáng 460 nm ở cường độ và thời gian đã định trước. Sinh khối vi khuẩn được thu hồi ở các mốc thời gian 10 phút, 20 phút, 40 phút và 60 phút và được chiết xuất staphyloxanthin. Các mẫu dịch chiết thô sau đó được định lượng bằng phương pháp quang phổ để đánh giá so sánh khả năng phân hủy sắc tố staphyloxanthin trực tiếp trên tế bào vi khuẩn sống. Hiệu quả tẩy màu của vi khuẩn sống được đánh giá và so sánh song song với hiệu quả tẩy màu dịch chiết thô staphyloxanthin.

3 Kết quả và thảo luận

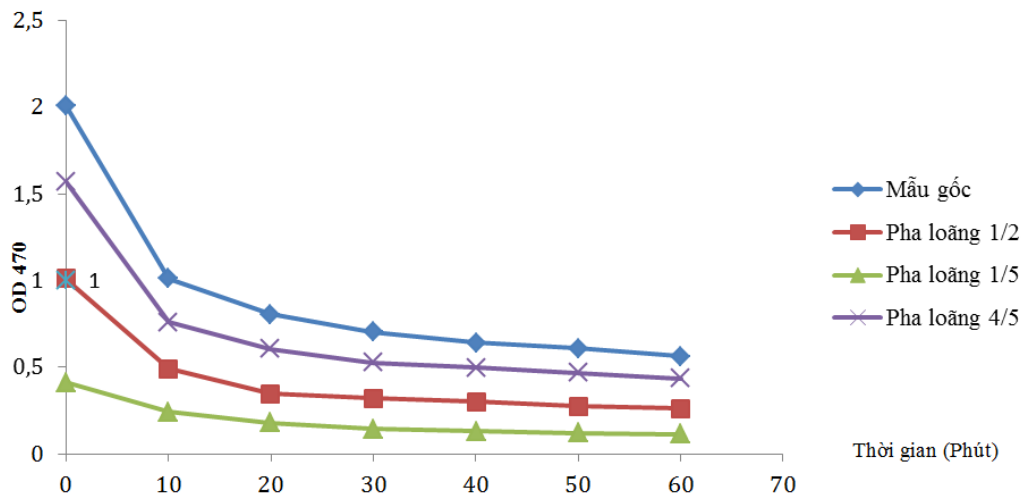
3.1 Xác định cường độ ánh sáng và thời gian chiếu thích hợp để đạt được hiệu quả phân giải quang cao nhất

+ *Khảo sát sự phân giải quang dịch chiết staphyloxanthin ở các nồng độ khác nhau*

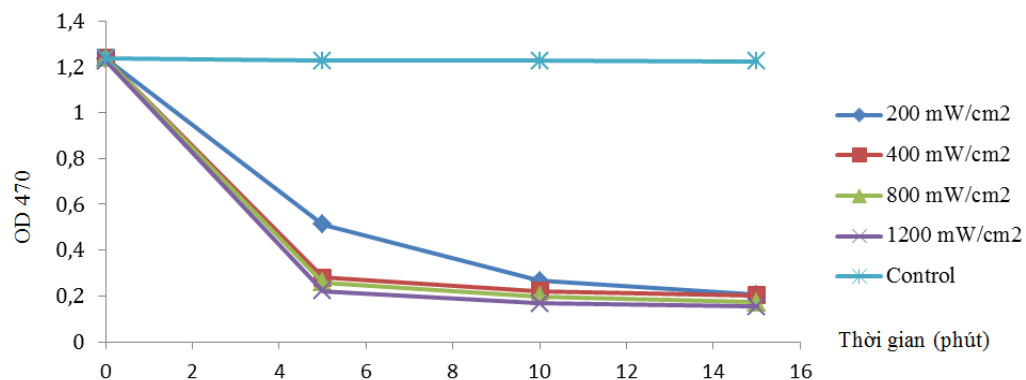
Kết quả xử lý dịch chiết staphyloxanthin pha loãng ở các nồng độ khác nhau được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1 Kết quả đo mật độ quang A470 các mẫu dịch chiết thô staphyloxanthin sau 60 phút xử lý dưới ánh sáng xanh 460 nm

Thời gian chiếu (phút)	0	10	20	30	40	50	60
Không pha loãng	2,01	1,012	0,804	0,703	0,64	0,607	0,565
Pha loãng 4/5	1,574	0,758	0,605	0,527	0,495	0,467	0,435
Pha loãng 1/2	1,011	0,49	0,349	0,321	0,299	0,274	0,261
Pha loãng 1/5	0,41	0,241	0,179	0,142	0,13	0,121	0,114



Hình 1 Sự phân giải quang dịch chiết thô staphyloxanthin ở các nồng độ pha loãng khác nhau



Hình 2 Quá trình phân giải quang hợp chất staphyloxanthin theo thời gian ở các cường độ ánh sáng khác nhau

Bảng 2 Mật độ quang OD470 của mẫu dịch chiết thử nghiệm với các mật độ công suất chiếu sáng 460 nm khác nhau

Mật độ công suất chiếu sáng mW/cm ²	0 phút	5 phút	10 phút	15 phút
200	1,239	0,512	0,267	0,206
400	1,239	0,28	0,221	0,202
800	1,239	0,26	0,198	0,173
1 200	1,239	0,222	0,167	0,153
Đối chứng (không chiếu LED)	1,239	1,227	1,226	1,224

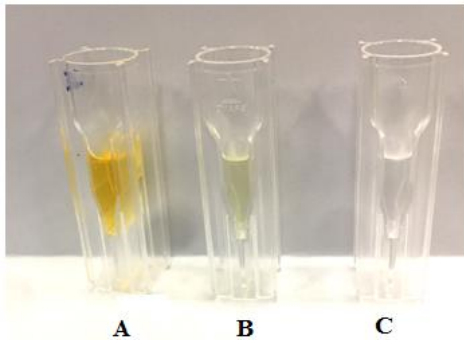
Kết quả thí nghiệm trình bày ở Hình 1 cho thấy các đường cong biểu thị sự phân giải quang gần song song

nhau, chứng tỏ tốc độ biến đổi mật độ theo thời gian giống nhau (hệ số tanα hầu như không đổi), cho thấy

sự phân giải quang dịch chiết staphyloxanthin không phụ thuộc vào nồng độ chất.

+ *Khảo sát các cường độ ánh sáng gây phân giải quang dịch chiết staphyloxanthin*

Thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo sát sự ảnh hưởng của mật độ công suất chiếu sáng 460 nm tác động lên dịch chiết staphyloxanthin từ vi khuẩn *S. aureus*. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Hình 2, Hình 3 và Bảng 2.



Hình 3 Sự thay đổi màu sắc dịch chiết staphyloxanthin do tác động của ánh sáng 460 nm ở mật độ công suất 400 mW/cm². A/ Mẫu chưa chiếu đèn. B/ Mẫu sau chiếu đèn 5 phút. C/ Mẫu sau chiếu đèn 15 phút

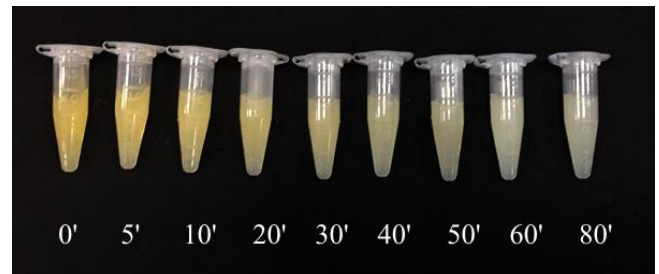
Kết quả thử nghiệm cho thấy ánh sáng mật độ công suất 200 mW/cm² gây phân giải quang dịch chiết khiến mật độ quang của mẫu giảm 58,6 % sau 5 phút chiếu, và tiếp tục giảm đến 74,8 % sau 10 phút. Tuy nhiên hiệu quả phân giải quang mẫu dịch chiết này không tăng thêm đáng kể sau khi tiếp tục chiếu LED ở 5 phút cuối.

Có sự khác biệt đáng kể ở các mật độ công suất (400, 800 và 1 200) mW/cm² so với mật độ công suất 200 mW/cm². Với mật độ công suất (400, 800 và 1 200) mW/cm² gây phân giải quang hiệu quả hơn mức năng lượng 200 mW/cm² sau 5 phút chiếu. Tuy nhiên, đến phút chiếu thứ 10, hiệu suất phân giải quang của cả 3 mức mật độ công suất này gần như tương đương nhau, và không có nhiều thay đổi khi tiếp tục chiếu đến phút thứ 15. Kết quả này thể hiện việc mật độ công suất làm tăng hiệu quả phân giải quang của sắc tố staphyloxanthin, tuy nhiên khả năng này có một giới hạn nhất định. Ngoài ra, hiệu quả phân giải quang của các mức mật độ công suất còn bị ảnh hưởng bởi thời gian chiếu. Nói cách khác, hiệu quả gây phân giải quang sắc tố staphyloxanthin của ánh sáng 460 nm phụ thuộc rất nhiều vào mức chiếu sáng (light dose).

3.2 Đánh giá khả năng tẩy sắc tố của quy trình chiếu

đèn lên tế bào vi khuẩn sống

Từ kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng gây phân giải quang dịch chiết staphyloxanthin, ánh sáng 460 nm ở mật độ công suất 400 mW/cm² được chọn để thực hiện thí nghiệm tẩy sắc tố staphyloxanthin còn nguyên vẹn thành tế bào vi khuẩn *S. aureus*. Thí nghiệm được tiến hành bằng cách chiếu ánh sáng 460 nm ở mật độ công suất 400 mW/cm² vào một ống nghiệm chứa huyền phù sinh khối vi khuẩn *S. aureus* (2 gram sinh khối vi khuẩn cạo từ thạch nuôi cấy 48 giờ hòa vào 20 mL nước cất). Ánh sáng được chiếu liên tục trong 60 phút, và mẫu sinh khối vi khuẩn được rút ra mỗi 10 phút (Hình 4). Sau quy trình chiếu sáng 460 nm huyền phù sinh khối vi khuẩn hoàn thành, các mẫu khuẩn được mang đi chiết tách staphyloxanthin và được định lượng bằng phương pháp đo quang phổ A470.

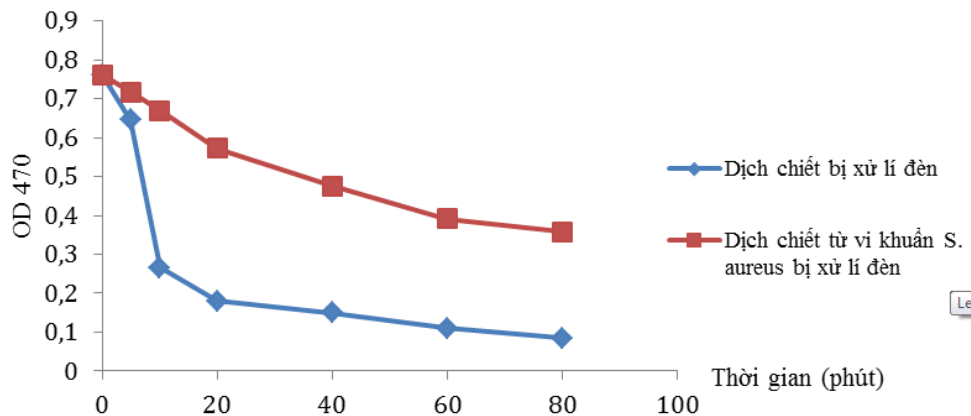


Hình 4 Sự thay đổi màu sắc sinh khối *S. aureus* sau 60 phút chiếu đèn 460

Để đối chiếu sự khác biệt trong tác động của ánh sáng 460nm lên staphyloxanthin tự do (staphyloxanthin trong dịch chiết) và staphyloxanthin trên thành tế bào vi khuẩn, dịch chiết staphyloxanthin từ sinh khối vi khuẩn chưa được chiếu sáng cũng được chiếu ánh sáng 460 nm ở mật độ công suất 400 mW/cm² trong 60 phút, và mật độ quang của mẫu ở 470 nm sau mỗi 10 phút cũng được ghi nhận. Kết quả được trình bày trong Hình 5. So sánh kết quả chiếu đèn dịch chiết staphyloxanthin và chiếu đèn sinh khối vi khuẩn cho thấy có sự khác biệt rõ rệt khi chiếu ánh sáng 460 nm lên vi khuẩn *S. aureus*. Hợp chất staphyloxanthin sau khi chiết tách dưới tác động của ánh sáng 460 nm bị phân giải quang với tốc độ nhanh hơn rất nhiều so với staphyloxanthin còn nguyên trên thành tế bào vi khuẩn. Xu hướng phân giải quang của dịch chiết thô tương tự như kết quả thí nghiệm trước, với hiệu quả phân giải quang đạt gần 65 % sau 10 phút chiếu ánh sáng 460 nm ở mật độ công suất 400 mW/cm², sau đó bắt đầu chậm lại từ phút thứ 20 trở đi. Tuy nhiên với

staphyloxanthin còn tồn tại trên màng tế bào vi khuẩn, hiệu quả tác động của ánh sáng 460 nm bị giảm rõ rệt,

và hiệu quả phân giải quang theo thời gian chậm hơn so với dịch chiết (Hình 5).



Hình 5 Khác biệt trong xu hướng phân giải quang của dịch chiết staphyloxanthin thô và staphyloxanthin trên thành tế bào vi khuẩn sống dưới tác động của ánh sáng 460 nm

Kết quả này có thể đến từ việc sắc tố staphyloxanthin trong vi khuẩn *S. aureus* phân bố chủ yếu ở lớp phospholipid đôi, được che chắn bên dưới lớp màng peptidoglycan khá dày của vi khuẩn Gram dương và lớp vỏ capsule bên ngoài. Ngoài ra mật độ vi khuẩn trong dịch chiết là khá nhiều (với mật độ sinh khối 0,1 g/mL) khiến cho dịch huyền phù có màu đục, làm cản trở ánh sáng tác động lên phần sinh khối tổng thể dẫn

đến sự suy giảm hiệu ứng ánh sáng. Do đó có thể kết luận hiệu quả của ánh sáng 460 nm lên sắc tố staphyloxanthin trên tế bào vi khuẩn sống có thể bị ảnh hưởng bởi mật độ khuẩn xử lý.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.025/HĐ-NCKH.

Tài liệu tham khảo

1. Foster T (1996). Staphylococcus. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX) University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 12.
2. Pelz A, Wieland KP, Putzbach K, Hentschel P, Albert K, Götz F (2005). Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* 280 pp. 32493-32498.
3. Dong PT, Haroon M, Jie H, Leanse, Leon GL, Junjie L, Lijia L, Tianhong D, Mohamed NS, Ji XC. (2019). Photolysis of Staphyloxanthin in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Potentiates Killing by Reactive Oxygen Species. *Adv Sci.* 10.1002.
4. Dai T, Gupta A, Huang YY, Sherwood ME, Murray CK, Vrahas MS, ... Hamblin MR (2013). Blue light eliminates community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in infected mouse skin abrasions. *Lasers Surg Med*, 31(11), pp. 531–538.
5. Al-Kazaz J, Eman K, Melconian K, Alice K, Joseph K, Nuha. (2014). Extraction of Staphyloxanthin from Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Sources. *Iraqi Journal of Science.* 55 (4B), pp. 1823-1832..

Evaluation of the photolysis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus* using 460 nm wavelength of LED light

Vu Van Van*, Ngo Nguyen Vu

NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

*vanvu@ntt.edu.vn

Abstract Staphyloxanthin is a bright yellow carotenoid pigment synthesized by *Staphylococcus aureus* bacteria on cell membranes. Staphyloxanthin has anti-oxidant properties, protecting *Staphylococcus aureus* bacteria against oxidizing agents capable of destroying and causing bacterial cell death. The light at 460 nm light has been shown to cause photolysis of staphyloxanthin, which directly affects the oxidation resistance of *S. aureus* bacteria. Test results showed that 460 nm wavelength light at 200 mW/cm² energy level caused optical density at 470 nm of staphyloxanthin crude extract reduced up to 41.1 % after 5 minutes of illumination. The photolysis of staphyloxanthin crude extract continued after 5 minutes of irradiation, causing the reduction of the absorbance of the extract up to 74.8 %. However in the experiment applying 460 nm light directly on bacterial biomass, the staphyloxanthin photolysis effect of the light was reduced partially, and the efficiency of photolysis process over time was slower than the effect of direct light onto the crude extract. The results of the study confirm the potential of the 460 nm light to induce photolysis of the *S. aureus* staphyloxanthin pigment, which is a necessary first step to further study the treatment of this bacterium with 460 nm light in the future.

Keywords *Staphylococcus aureus*, staphyloxanthin, photolysis, 460 nm light.