

ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH TẠO PROBIOTICS TỪ *Bacillus clausii* DẠNG BÀO TỬ

VŨ HOÀNG GIANG ⁽¹⁾, ĐÀO NGUYỄN MẠNH ⁽¹⁾, NGUYỄN THỊ THU THỦY ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotics là các vi sinh vật có lợi, sống trong ống tiêu hóa của người, thường là các vi khuẩn, các probiotic không chỉ giúp hỗ trợ tốt cho tiêu hóa và hấp thụ thức ăn, phòng chống loạn khuẩn đường ruột mà còn tốt cho hệ thống miễn dịch của cơ thể và thậm chí nó còn giúp làm giảm hay ngăn ngừa ung thư đường ruột [1, 2]. Một số lợi khuẩn được ứng dụng làm probiotics hiện nay như *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* hay khuẩn *Bacillus* [3].

Ở Việt Nam, một trong các chế phẩm probiotic được ứng dụng nhiều có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus clausii* (*B. clausii*), nhất là từ dạng bào tử của vi khuẩn này đang được quan tâm nhiều do chúng có thể vượt qua môi trường axit của dịch dạ dày để đến được ruột với tỷ lệ sống cao, ngoài ra chúng có thể chống lại các vi khuẩn có hại khi đi vào cơ thể. *B. clausii* có khả năng hình thành bào tử, dễ sử dụng, chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi, có khả năng sản xuất số lượng lớn protein, enzyme, hợp chất kháng khuẩn, vitamin và carotenoid trong chuỗi thức ăn. Bên cạnh đó, *B. clausii* rất ổn định trong quá trình sản xuất tạo sản phẩm, ngoài ra chúng cũng có tiềm năng trong trị liệu sinh học với khả năng tương tác với môi trường bên trong của vật chủ bằng cách sản xuất nhiều loại peptide ức chế các nhóm gây hại [4]. Tuy nhiên trên thực tế, việc sản xuất probiotic dạng bào tử của *B. clausii* gặp nhiều khó khăn do việc nghiên cứu điều kiện nuôi cấy *B. clausii* còn ít được quan tâm như cần phải điều chỉnh các giá trị nhiệt độ, độ pH, độ thông khí ở giai đoạn nào trong quá trình lên men để thu được lượng bào tử tốt nhất. Nội dung bài báo trình bày quy trình sản xuất probiotic *B. clausii* dạng bào tử với một số điều chỉnh các điều kiện như nhiệt độ lên men, pH môi trường, độ thông khí, thời gian lên men và nhiệt độ gây sốc nhiệt trong điều kiện phòng thí nghiệm để thu được lượng bào tử cao nhất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng *B. clausii* do công ty TNHH Công nghệ Vi sinh Việt Đức Thịnh cung cấp. Thông tin chủng giống: Nhu cầu oxy: hiếu khí; chủng giống đạt an toàn sinh học cấp I.

Môi trường nhân giống và hoạt hóa MPA (g/l): pepton 10; cao thịt 5; NaCl 5; agar 18; nước cất 1000ml. Môi trường lên men (g/l): pepton 10; cao thịt 5; NaCl 5; glucose 10; nước cất 1000ml.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hoạt hóa giống *B. clausii*

Chủng *B. clausii* từ ống thạch nghiêng được hoạt hóa trong môi trường lỏng sau quá trình khử trùng ở 121°C trong vòng 15 phút, để nguội đến nhiệt độ 30°C, nuôi lắc ở 30°C, 150 vòng/phút trong thời gian 24 giờ, được sử dụng làm giống để bổ sung vào môi trường lên men [5].

2.2.2. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men tạo sinh khối

Môi trường lên men được khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Để nguội, cấy giống đã được chuẩn bị theo phương pháp ở mục 2.2.1 với tỷ lệ bổ sung là 5% để nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo sinh khối: Ảnh hưởng của thời gian được xác định ở các thời điểm 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 và 64 giờ; ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình tạo sinh khối ở ba tốc độ 100, 150 và 200 vòng/phút; ảnh hưởng của pH dịch lên men ban đầu đến quá trình tạo sinh khối ở các pH là 6, 7, 8, 9, 10, 11. Các mẫu thu được ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch thu sinh khối. Sinh khối được rửa lại ba lần bằng nước muối sinh lý 0,9%, sau mỗi lần rửa lại ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút, sinh khối ướt sẽ được xác định khối lượng bằng phương pháp cân [6]. Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần trong một lần thí nghiệm và sau 3 lần lên men.

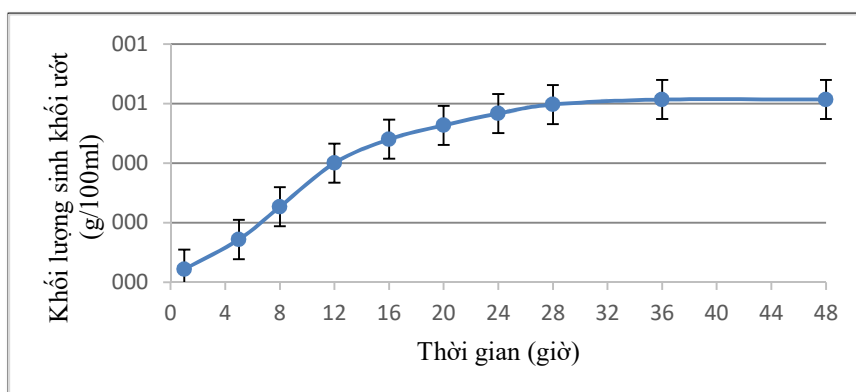
2.2.3. Phương pháp thử kiểm tra độ sạch, độ an toàn của chế phẩm probiotic

ISO 4832:2006, ISO16649-2:2001, ISO 7937:2004, ISO 6888-1:1999, AOAC 2015.01.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình tạo sinh khối của chủng *B. clausii*

Thời gian là một trong các yếu tố ảnh hưởng lớn đến quá trình tạo sinh khối, nếu thu hồi sớm lượng sinh khối chưa đạt đến trạng thái cân bằng, tế bào ở trạng thái non ảnh hưởng đến sự tạo thành bào tử. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của thời gian đến quá trình tạo sinh khối của chủng *B. clausii* được trình bày trong hình 1.

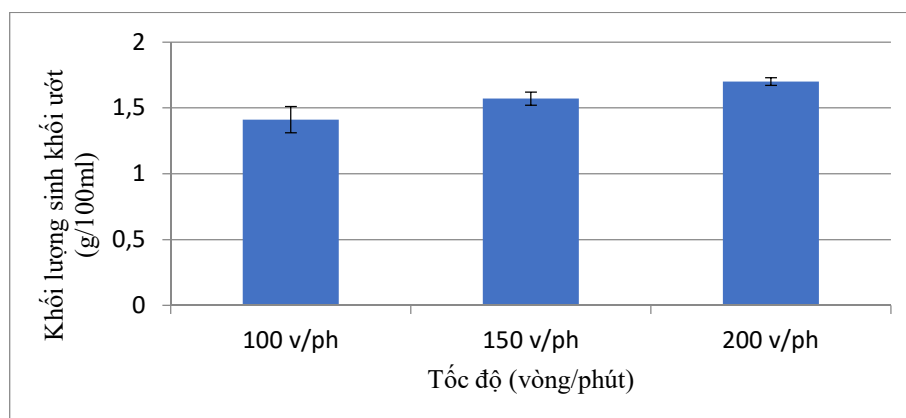


Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men tạo sinh khối của *B. clausii*

Kết quả ở hình 1 cho thấy, lượng sinh khối thu được tăng dần theo thời gian, giai đoạn sinh khối tăng trưởng mạnh nhất là trong khoảng từ giờ thứ 12 đến giờ thứ 24 sau khi tiếp giống, đây là pha log của tế bào vi khuẩn. Tiếp đến sinh khối có xu hướng tăng chậm lại đây là giai đoạn cân bằng và ổn định kéo dài từ thời gian 24 giờ đến 48 giờ. Tại thời điểm 48 giờ sinh khối ướt thu được là cao nhất đạt 0,62g/100ml dịch lên men, sau đó lượng sinh khối có xu hướng giảm do số lượng tế bào sinh ra ít hơn lượng tế bào chết đi, các tế bào chết đi xảy ra hiện tượng tự thủy phân, do đó

lượng sinh khối giảm. Như vậy ở thời điểm 48 giờ, thích hợp nhất cho thu hồi tế bào và cho lượng sinh khối lớn nhất. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Zhi-Min Zhao và cộng sự (2019), thời gian lên men để đạt được số lượng tế bào cao nhất đối với chủng *B. subtilis* là 48 giờ [7].

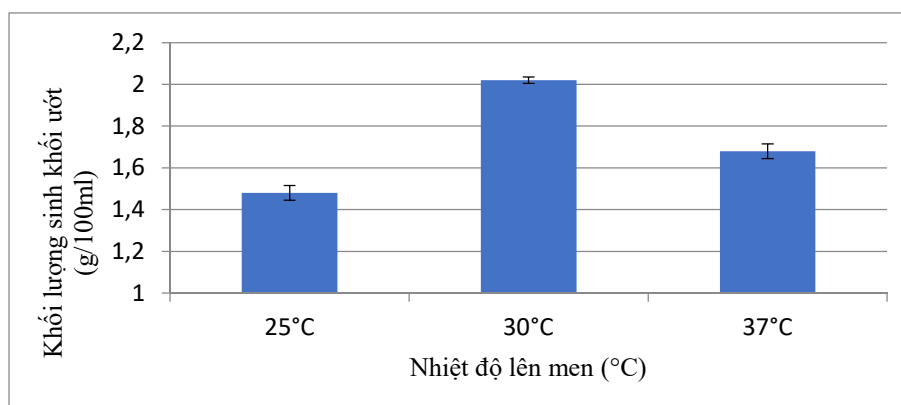
3.2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình tạo sinh khối của chủng *B. clausii*



Hình 2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình lên men tạo sinh khối của chủng *B. clausii*

Kết quả ở hình 2 cho thấy, với tốc độ lắc tăng thì lượng sinh khối và lượng tạo bào tử của *B. clausii* cũng tăng, lượng sinh khối dạng bào tử đạt giá trị cao nhất nhất trong thí nghiệm này là ở tốc độ lắc 200 vòng/phút (khối lượng sinh khối ướt đạt 1,7 g/100ml dịch lên men). Đã tiến nghiên cứu ở các điều kiện lắc cao hơn 250, 300 vòng/phút nhưng lượng sinh khối thu được không cao hơn so với lắc ở 200 vòng/phút (số liệu không công bố). Jiafu Huang và cộng sự nghiên cứu về điều kiện tối ưu để nuôi cấy chủng *B. megaterium* cho biết, thời gian tối ưu để thu chủng là sau 24 giờ, pH tối ưu là 7,4 tốc độ lắc là 200 vòng/phút [8].

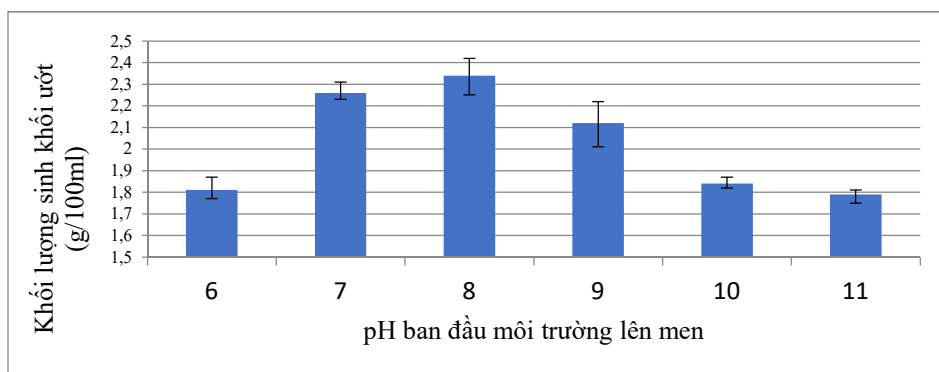
3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình tạo sinh khối của chủng *B. clausii*



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men tạo sinh khối của *B. clausii*

Kết quả thể hiện ở hình 3 cho thấy khối lượng sinh khối của *B. clausii* thu được sau khi lên men tốc độ lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ 30°C cho khối lượng sinh khối thu được 2,02g sinh khối ướt/100 ml dịch lên men. Kết quả này cao hơn khi lên men ở nhiệt độ 25°C (1,48g) và nhiệt độ 37°C (1,68g). Như vậy có thể chọn nhiệt độ 30°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của L. Korsten và cộng sự (1996), nhiệt độ tối ưu để nuôi cấy chủng *B. subtilis* B246 trong khoảng 30-37°C [9].

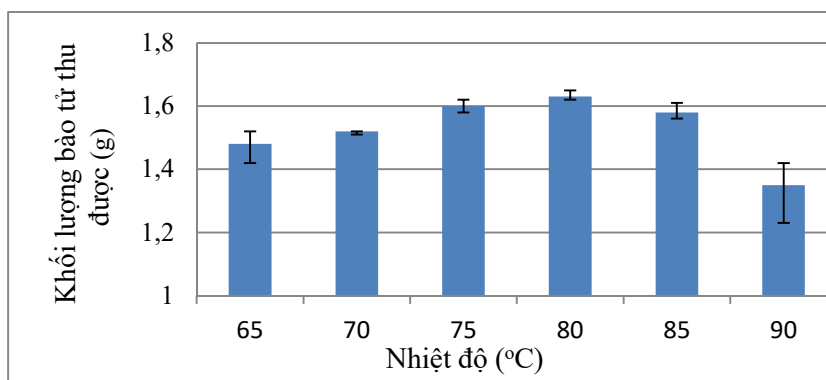
3.4. Ảnh hưởng của pH môi trường tới quá trình lên men thu sinh khối *B. clausii*



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường tới quá trình lên men của chủng *B. clausii*

Kết quả thể hiện trên hình 4, yếu tố pH môi trường lên men ban đầu đã có ảnh hưởng mạnh đến quá trình sinh trưởng và phát triển của chủng với pH phát triển từ 5,0-9,0, thích hợp nhất tại pH môi trường ban đầu là 8,0 với lượng sinh khối thu được sau quá trình lên men đạt 2,34 g sinh khối ướt/100ml dịch lên men. Như vậy giá trị pH 8,0 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của của Ha-Young và cộng sự với pH tối ưu là 8 để nuôi cấy *B. pumilus* JB-1 cho lên men đậu nành [10].

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến lượng bào tử *B. clausii* sau quá trình xử lý nhiệt



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý đến sự hình thành bào tử *B. clausii*

Kết quả ở hình 5 cho thấy, khi sốc nhiệt ở 65-80°C trong 20 phút, lượng bào tử thu được tăng dần và đạt giá trị cao nhất là 1,63g ở nhiệt độ 80°C. Khi nâng nhiệt độ gây sốc lên 85-90°C thì lượng sinh khối giảm. Như vậy, nhiệt độ gây sốc nhiệt để thu lượng bào tử *B. clausii* lớn nhất là 80°C. Nghiên cứu của Jae-Hyung Mah và cộng sự (2015), nhiệt độ gây sốc tối ưu đối với chủng *B. coagulans* từ 60-80°C và thời gian 10-30 phút [11].

3.6. Sản xuất chế phẩm probiotic quy mô phòng thí nghiệm

Chúng tôi tiến hành sản xuất chế phẩm probiotic từ *B. clausii* trên thiết bị lên men 5 lít theo các điều kiện thu được về thời gian lên men, tốc độ lắc, nhiệt độ, pH và nhiệt độ gây sốc nhiệt như đã nghiên cứu ở trên. Kết quả lên men trên bình 5 lít sau 3 lần đã thu được lượng sinh khối trung bình đạt 2,30 g/100ml dịch lên men, khi so sánh với khi lên men trong điều kiện chưa thích hợp đạt 1,48 g/100 ml dịch lên men, khối lượng sinh khối đã tăng 1,55 lần. Bào tử thu được tiến hành phối chế với với nồng độ bào tử đạt 1×10^9 CFU/ml có trạng thái cảm quan: Dạng hỗn dịch lỏng, sánh, đồng nhất, màu trắng đục, không lắng cặn, có mùi đặc trưng, không vị.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố trước đây trên chủng *Bacillus* spp. Số lượng bào tử thu được trong nghiên cứu của Cayuela và cộng sự (1993) là $1,0 \times 10^9$ CFU/ml và của Chen (2010) là $1,56 \times 10^{10}$ CFU/ml đối với *B. subtilis*; còn nghiên cứu của Tseng và cộng sự (2008) là $3,82 \times 10^9$ CFU/ml đối với chủng *B. amyloliquefaciens* B128 [12, 13, 14].

3.7. Kết quả kiểm nghiệm độ an toàn của chế phẩm

Kết quả phân tích các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Các chỉ tiêu hoá lý và vi sinh vật của chế phẩm probiotic

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	<i>Coliforms</i>	CFU/ml	ISO 4832:2006	Không có
2	Nấm tổng số	CFU/ml	ISO16649-2:2001	Không có
3	<i>Cl.perfringens</i>	CFU/ml	ISO 7937:2004	Không có
4	<i>Staphylococci</i>	CFU/ml	ISO 6888-1:1999	Không có
5	<i>Samonella</i> spp.	CFU/ml	ISO 6579-1:2017	Không phát hiện
6	Hàm lượng Pb	mg/kg	AOAC 2015.01	Không phát hiện
7	Hàm lượng Cd	mg/kg	AOAC 2015.01	Không phát hiện
8	Hàm lượng As	mg/kg	AOAC 2015.01	Không phát hiện
9	Hàm lượng Hg	mg/kg	AOAC 2015.01	Không phát hiện

Kết quả trong bảng 1 cho thấy, các chỉ tiêu về giới hạn các kim loại nặng và vi sinh vật đều đạt tiêu chuẩn về an toàn thực phẩm theo quy định của Bộ Y tế [15]. Chế phẩm đạt tiêu chuẩn an toàn thực phẩm.

4. KẾT LUẬN

- Đã đánh giá được ảnh hưởng của các điều kiện lên men đến quá trình sản xuất chế phẩm probiotics *B. clausii* bào tử trong phòng thí nghiệm, với các điều kiện khảo sát phù hợp: thời gian lên men 48 giờ, nhiệt độ lên men 30°C; pH môi trường ban đầu 8, tốc độ lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ gây sốc nhiệt 80°C.

- Đã phối chế thành công chế phẩm probiotic dạng bào tử với lượng bào tử *B. clausii* 1×10^9 CFU/ml. Các chỉ tiêu kiểm nghiệm sản phẩm đều nằm trong giới hạn cho phép theo quy định của Bộ Y tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyên, Phạm Văn Ty, *Vi sinh vật học*, NXB Giáo Dục Việt Nam, 2010.
2. Trần Đáng, *Thực phẩm chức năng - Functional Food*, NXB Y Học, Hà Nội 2017, tr.223-227.
3. Urdaci M.C., Bressollier P., Pinchuk I., *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities, *J Clin Gastroenterol*, 2004, **38**:86-90.
4. Hồ Lê Quỳnh Châu, Hồ Trung Thông, Nguyễn Thị Khánh Quỳnh và cs., *Đánh giá khả năng bám dính và kháng khuẩn ở mức độ in vitro của một số chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotics*, Tạp chí khoa học, Đại học Huế, 2010, **57**:5-13.
5. Vũ Minh Đức, *Thực tập vi sinh vật học*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.
6. Colin R. Harwood, *Biotechnology Handbooks 2-Bacillus-Springer US*, Library of Congress Cataloging in Publication Data, 1989.
7. Zhi-Min Zhao, Jun-Ting Xi, Ji-Fei Xu, Li-Tong Ma and Ji Zhao, *Enhancement of bacillus subtilis growth and sporulation by two-stage solid-state fermentation strategy*, *Processes* 2019, **7**, 644; doi:10.3390/pr7100644.
8. Jiafu Huang, Danfeng Zhang, Yixin Ou, Guoguang Zhang, Linhua Zheng, Lizhuan Lin, Xiaomei Ye, Xiaofeng Zhu and Yutian Pan, *Optimization of cultural conditions for bacillus megaterium cultured in agaricus bisporus industrial wastewater*, *BiMed Research International*, 2018.
9. L. Korsten, N. Cook, *Optimizing Culturing Conditions for Bacillus subtilis*, South African Avocado Growers' Association Yearbook, 1996, **19**:54-58.
10. Kwon Ha-Young, Kwon Chong-Su, Lee Sang-Han, Sohn Ho-Yong, *Optimization of Culture Conditions of Bacillus pumilus JB-1 for Chungkook-jang Fermentation in Soybean Boiling-Waste Liquor Medium*, *Microbiology and Biotechnology Letters*, 2007, **35**(4):304-309.

11. Jae-Hyung Mah, Xuezhi Bai and Young Kyoung Park, *Effects of sporulation and heat-shock conditions on spores of six major Bacillus species*, 4th International conference and exhibition on food processing & technology, August 10-12, 2015 London, UK, Volume 6, Issue 8 ISSN: 2157-7110 JFPT, an open access journal.
12. Cayuela, C., Kenichi, K., Park, Y. S., Ijima, S., & Kobayashi, T., *Insecticide production by recombinant Bacillus subtilis 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration*, Journal of Fermentation and Bioengineering 1993, **75**(5):383-386.
13. Chen, Z.M., Li, Q., Liu, H.M., Yu, N., Xie, T.-J., Yang, M.-Y., Shen, P., & Chen, X.-D., *Greater enhancement of Bacillus subtilis spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, **85**(5):1353-1360.
14. Tseng, Kakha Sokhadze, Eva Kachlishvili¹, Vladimir Chistyakov, Vladimir Elisashvili, *Optimization of enhanced probiotic spores production in submerged cultivation of Bacillus amyloliquefaciens B-1895*, Journal Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2017, **7**(2):132-136.
15. Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 về việc ban hành “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm”.

Nhận bài ngày 31 tháng 3 năm 2020

Phản biện xong ngày 14 tháng 10 năm 2020

Hoàn thiện ngày 28 tháng 10 năm 2020

⁽¹⁾ Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga