

**KHẢO SÁT HIỆU QUẢ VI GÓI VI KHUẨN *LACTOBACILLUS BULGARICUS*
NHẪM NÂNG CAO HOẠT TÍNH PROBIOTIC**
RESEARCH ON MICROCAPSULE EFFECT OF *LACTOBACILLUS BULGARICUS* TO ENHANCE
POTENTIAL PROBIOTIC ACTIVITY

Nguyễn Thuý Hương, Trần Thị Bích Huệ
Trường Đại học Bách khoa - ĐHQG Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bài báo trình bày về nghiên cứu nâng cao hoạt tính probiotic vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* với 4 kích thước hạt vi gói vi khuẩn từ gel Na- alginate là: 2,0 mm; 1,5 mm; 1,0 mm và 0,5 mm. Trong đó, hạt vi gói kích thước 1,0 mm cho hiệu quả bảo vệ hoạt tính probiotic của vi khuẩn là cao nhất, cụ thể:

- Trong môi trường acid dạ dày nhân tạo (SGJ) và môi trường muối mật (tương đương môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa), vi gói 1mm giữ được khoảng 60% tế bào sống (bao gồm tế bào trong vi gói và tế bào phóng thích) với thời gian khảo sát là 60 phút. Cũng trong cùng điều kiện trên, tỉ lệ phóng thích tế bào sống sót ra ngoài dịch khảo sát là hơn 25% so với mật độ tế bào ban đầu.
- Kích thước vi gói càng lớn, khả năng sống sót của tế bào càng cao, nhưng tỷ lệ phóng thích tế bào càng giảm trong cùng điều kiện.
- Không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh khả năng lên men của hai hình thức tiếp giống bởi tế bào tự do và chế phẩm vi gói.

ABSTRACT

In this research, we tried to enhance potential probiotic activity of *Lactobacillus bulgaricus* by bioencapsulated method - use Na- alginate gel. In this case, we searched within 4 sizes of microcapsules as: 2,0 mm, 1,5 mm, 1,0 mm and 0,5 mm. As a result, we suggested the size 1,0 mm of microcapsule, which has enhanced potential probiotic follow: In simulated gastric juice (SGJ) and bile salt solution the same, harsh treatment conditions as human digestive fluid, encapsulated cells have survived over than 60% in 60 minutes. The released cell rate, which survived the conditions, has been over than 25%. These results showed that, the larger microcapsule sizes, the higher survival cell rate but the released rate of encapsulated cells has reduced in the same conditions. Fermentability of encapsulated cells has not differed significantly with fermentability of free cells, in this case.

I. MỞ ĐẦU

Các chế phẩm probiotic có vai trò quan trọng trong hệ tiêu hóa của người. Các kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn lactic khi đi vào hệ tiêu hóa của con người, khả năng tồn tại và hoạt tính probiotic của chúng lại có xu hướng giảm mạnh. Trong môi trường dạ dày có pH thấp (pH~2) và vùng muối mật, số lượng vi khuẩn giảm mạnh. Đây là những điều kiện bất lợi của vi khuẩn lactic trong hệ tiêu hóa. Vì vậy, 2 đặc tính đóng vai trò quan trọng nhất cho hoạt lực của probiotic là khả năng chịu pH thấp và khả năng chịu muối mật [6,7]. Việc tạo các chế phẩm dạng vi gói để bảo vệ hoạt tính probiotic chứa vi khuẩn lactic trong chế phẩm theo thời gian bảo quản và khi đi vào hệ tiêu hóa đã được đặt ra [4,5,7,9]. Kết quả bài báo này chúng tôi trình bày hiệu quả vi gói vi khuẩn *Lactobacillus*

bulgaricus nhằm nâng cao hoạt tính probiotic bằng phương pháp vi gói trong Na- alginate.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- Giống vi khuẩn: *Lactobacillus bulgaricus*. Nhân giống trong môi trường MRS ở điều kiện chuẩn. Sinh khối tế bào thu nhận bằng phương pháp ly tâm, rửa. Giống được tiếp cho quá trình vi bao gói vi khuẩn.

- Phương pháp tạo vi gói: Dung dịch tế bào huyền phù → Bổ sung dung dịch alginate 2% (tỷ lệ cố định 1:4) → Đưa vào ống tiêm (dùng 3 kích cỡ tiêm vô trùng) → ép tạo hạt nhỏ vào dung dịch hỗ trợ tạo gel (thông số cố định CaCl₂ 0,1M) trên máy khuấy từ (thời gian cố định 40 phút) → Lọc chế phẩm vi gói vi khuẩn giống → Bảo quản ở nhiệt độ 5⁰C [1,2,3,11].

Đường kính hạt vi gói đo bằng trắc vi kế. Cấu trúc hạt vi gói được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét JSM 6120 L, điện áp 25 kV tại phòng thí nghiệm Nano.

+ Khả năng tồn tại của vi khuẩn chính là khả năng sống của tế bào, bao gồm cả các tế bào phóng thích và không phóng thích. Vi khuẩn được lấy từ hạt vi gói và từ dịch môi trường.

- Khảo sát khả năng tồn tại của vi khuẩn trong môi trường acid dạ dày nhân tạo (SGJ, pH=2 và pH=3): Ngâm chế phẩm vi gói vào môi trường SGJ, ủ ở 37⁰C [6,7]. Theo thời gian theo dõi (30, 60, 90 phút), lấy chế phẩm vi gói và dịch môi trường ra để xác định % vi khuẩn tồn tại so với mật độ vi khuẩn ban đầu. Số tế bào xác định bằng phương pháp đếm gián tiếp khuẩn lạc trên môi trường MRS agar [8,9].

- Khảo sát khả năng tồn tại của vi khuẩn trong môi trường muối mật: Ngâm chế phẩm vi gói vào môi trường MRS chứa 0,3 % muối mật (tương đương ở cơ thể người), ủ ở 37⁰C [6,7]. Theo thời gian theo dõi (30, 60, 90 phút), lấy chế phẩm vi gói và dịch môi trường ra để xác định % vi khuẩn tồn tại so với mật độ vi khuẩn ban đầu. Số tế bào xác định bằng phương pháp đếm gián tiếp khuẩn lạc trên môi trường MRS agar [8,9].

+ Khả năng phóng thích tế bào được xác định bằng phương pháp đếm gián tiếp, do đó khả năng phóng thích tế bào chính là các tế bào sống thoát ra khỏi vi gói ra dịch môi trường cực đoan của hệ tiêu hóa nhân tạo. Vi khuẩn được lấy từ dịch môi trường.

- Khảo sát khả năng phóng thích tế bào ra khỏi vi gói: sau 60 phút khảo sát trong môi trường cực đoan của hệ tiêu hóa nhân tạo, cụ thể là trong môi trường SGJ (pH2) và môi trường muối mật, số tế bào sống thoát ra dịch được xác định bằng phương pháp đếm gián tiếp khuẩn lạc trên môi trường MRS agar. Từ đó suy ra % tế bào thoát ra khỏi vi gói [10].

- So sánh khả năng lên men của 2 hình thức tiếp giống bởi tế bào tự do và chế phẩm vi gói: Theo dõi quá trình lên men trên môi trường MRS [12]. Cả hai hình thức tiếp giống đều đảm bảo các chỉ tiêu sau: - Đối với hình thức tiếp giống bằng tế bào tự do: tỷ lệ giống là 5%, chất lượng giống là 10⁷ tế bào/ml. - Đối với hình thức tiếp giống bằng chế phẩm vi gói: Sử dụng chế phẩm hạt vi gói đã qua xử lý 60 phút trong môi trường cực đoan của hệ tiêu hóa nhân tạo, cụ thể là trong môi trường SGJ (pH=2) và môi trường muối mật. Chế phẩm hạt vi gói được tính toán sao cho có số lượng tế bào tương đương với lượng tế bào tự do ở nghiệm thức đối chứng.

Các chỉ tiêu đại diện để so sánh khả năng lên men của 2 hình thức tiếp giống bởi tế bào tự do và chế phẩm vi gói là pH và acid lactic.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

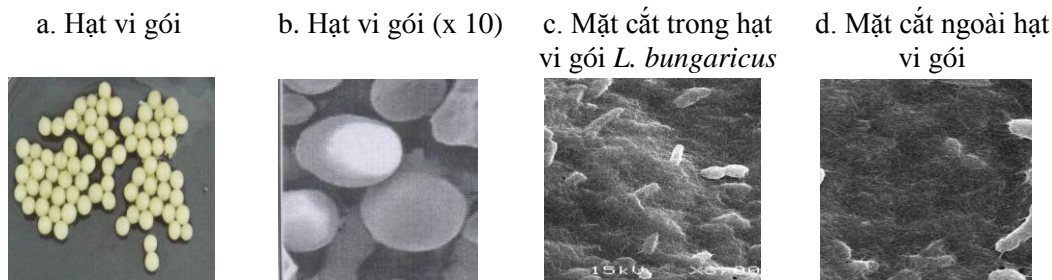
3.1 Tạo vi gói

Với phương pháp tạo vi gói bằng cách nhốt vi khuẩn trong Na- alginate dựa vào khả năng tạo gel, kích thước của hạt tăng dần từ 0,5 đến 2,0 mm với các loại kích thước kim tiêm khác nhau (bảng 1). Một số hình ảnh vi gói được mô tả qua nhóm hình 1.

Bảng 1. Nhận xét một số tính chất chế phẩm hạt vi gói vi khuẩn *L.bulgaricus*

STT	Một số tính chất	Nhận xét
1	Kích thước vi gói	2,0± 0,1 mm (loại kim tiêm kích thước 1,5mm) 1,5 ± 0,1 mm (loại kim tiêm kích thước 1mm) 1,0 ± 0,1 mm (loại kim tiêm kích thước 0,5 mm) 0,5 ± 0,1 mm (loại kim tiêm kích thước 0,5 mm, tạo hạt trong môi trường khuấy từ)
2	Mật độ tế bào <i>L.bulgaricus</i>	0,9.10 ⁸ tế bào/g
3	Tính chất cơ lý, hình dạng	Mềm- Dạng hạt
4	An toàn sinh học	An toàn [5]
5	Điều kiện bảo quản	Nhiệt độ 5 ⁰ C, trong nước muối sinh lý 0,9%
6	Thời gian bảo quản	6 tuần

Một số hình ảnh mô tả chế phẩm vi gói tạo bởi loại kim tiêm kích thước 1mm



Hình 1. Chế phẩm vi gói

3.2 Khả năng tồn tại của *L.bulgaricus* trong môi trường acid dạ dày nhân tạo (SGJ)

Các khảo sát trên môi trường SGJ (pH= 2) cho thấy:

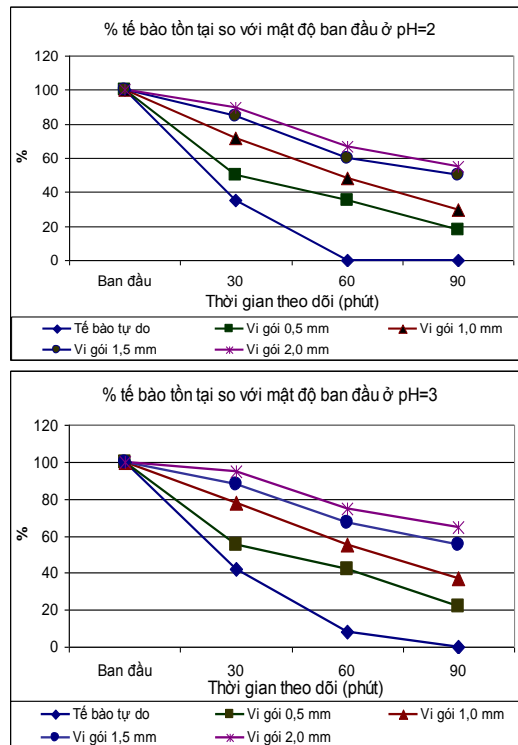
- Với tế bào tự do: tỉ lệ tế bào tồn tại giảm đáng kể khi xử lý trong SGJ, đến 60 phút, hầu như không còn tế bào vi khuẩn sống sót vì không có yếu tố bảo vệ trong môi trường cực đoạn.

- Với chế phẩm vi gói, khả năng bảo vệ tế bào thể hiện qua % tế bào sống tồn tại, tỷ lệ tế bào sống sót trong điều kiện cực đoạn có xu hướng gia tăng từ 40 – 63% (sau 60 phút khảo sát) hoặc 20 – 55% (sau 90 phút khảo sát) nếu gia tăng kích thước vi gói từ 0,5 – 2mm.

Tương tự, các khảo sát trên môi trường SGJ (pH= 3), vi gói có khả năng bảo vệ tế bào, lượng tế bào tồn tại dao động từ 40 – 75% (sau 60 phút khảo sát) hoặc 22 – 63% (sau 90 phút khảo sát) nếu gia tăng kích thước vi gói từ 0,5 – 2mm (đồ thị hình 2).

Kết quả trên cho thấy sự khác biệt khá lớn về % tế bào tồn tại trong môi trường SGJ theo thời gian. Với 2 trường hợp khảo sát, thời gian xử lý SGJ càng dài, mật độ tế bào sống sót càng giảm dần, kích thước vi gói càng lớn, khả năng bảo vệ tế bào, % tế bào tồn tại so với mật độ ban đầu càng tăng (hình 2). Với hai giá trị pH của môi trường SGJ (pH= 2 và pH = 3), khả năng tồn tại của *L.bulgaricus* khá khác biệt, pH càng giảm, yếu tố môi trường càng khắc nghiệt, khả năng tồn tại của tế bào càng giảm.

Các khảo sát trên chứng minh rằng, nếu không được bảo vệ bằng vi gói, các nhóm vi khuẩn lactic có trong chế phẩm sẽ có thể không còn phát huy tác dụng của mình khi đi vào hệ tiêu hóa. Vi gói có kích thước lớn có khả năng bảo vệ tế bào tốt hơn.



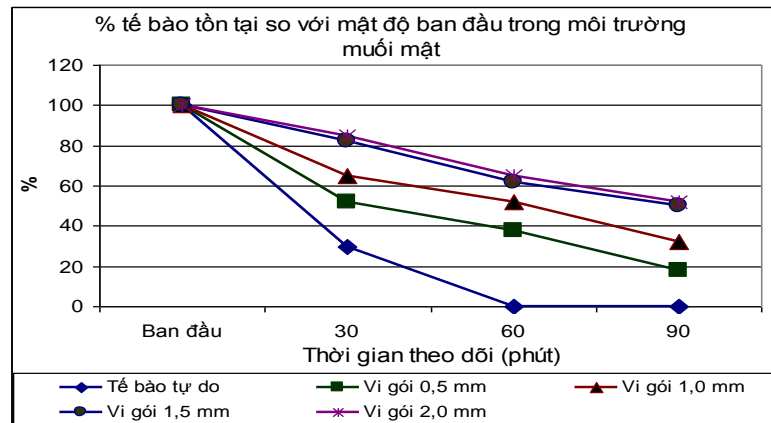
Hình 2. Mật độ tế bào *L.bulgaricus* trong môi trường dạ dày nhân tạo (SGJ)

3.3 Khả năng tồn tại của *L.bulgaricus* trong môi trường muối mật

Các khảo sát trên môi trường muối mật cho thấy:

- Với tế bào tự do: tỉ lệ tế bào tồn tại cũng giảm đáng kể và hoàn toàn bị tiêu diệt ở thời điểm 60 phút trong môi trường muối mật

- Với các vi gói, chúng có thể bảo vệ tế bào, giúp tế bào tồn tại trong điều kiện cực đoạn, tỷ lệ tế bào sống sót có xu hướng gia tăng từ 38 – 62% (sau 60 phút khảo sát) hoặc 20 – 52% (sau 90 phút khảo sát) nếu gia tăng kích thước vi gói từ 0,5 – 2mm (đồ thị hình 3). Kích thước vi gói càng lớn, khả năng bảo vệ tế bào càng cao



Hình 3. Mật độ tế bào *L.bulgaricus* trong môi trường muối mật

3.4 Khảo sát khả năng phóng thích tế bào ra khỏi vi gói

Các khảo sát trên đây cho thấy, khả năng sống sót của vi khuẩn tăng theo kích thước của hạt vi gói. Hiệu quả vi gói tế bào vi khuẩn probiotic được đánh giá thông qua khả năng sống trong môi trường dạ dày, muối mật và khả năng phóng thích tế bào trong các môi trường này [4]. Các khảo sát trên đây đã chứng minh được hiệu quả vi gói qua khả năng sống của tế bào trong môi trường acid và muối mật. Phần này chúng tôi khảo sát khả năng phóng thích tế bào ra khỏi vi gói sau 60 phút khảo sát trong môi trường cực đoạn của hệ tiêu hóa nhân tạo [10], cụ thể là trong môi trường SGJ (pH2) và môi trường muối mật.

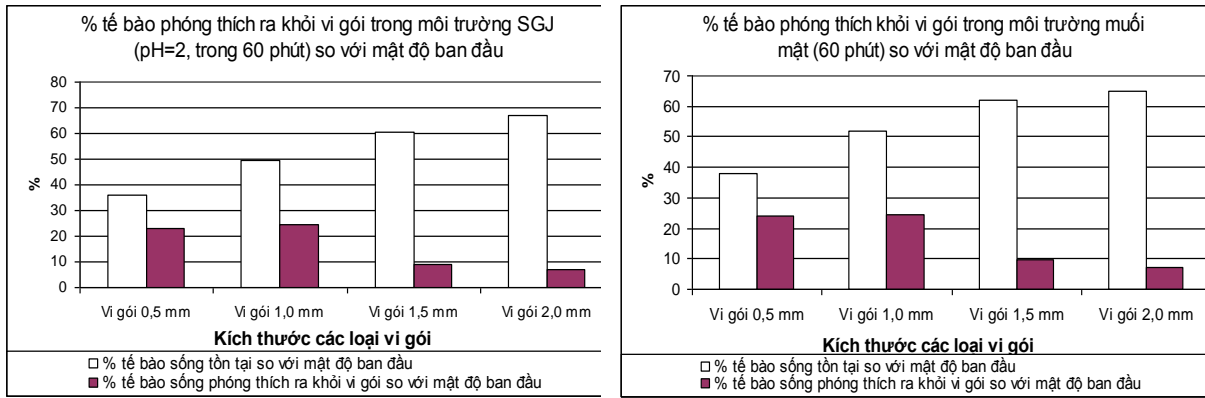
Kết quả thực nghiệm qua hình 4 cho thấy: kích thước vi gói ảnh hưởng mạnh đến khả năng phóng thích tế bào. Vi gói có kích thước 2 mm chỉ có 7-8% tế bào phóng thích ra khỏi vi gói. Nếu giảm kích thước vi gói còn 1,5 mm thì lượng tế bào phóng thích khoảng 10%. Các vi gói có kích thước nhỏ hơn 1mm đều có khả năng phóng thích ra khỏi vi gói khoảng 25% tế bào so với mật độ tế bào ban đầu của chế phẩm.

Vi gói càng nhỏ, tỷ lệ phóng thích tế bào càng lớn (vi gói 0,5 mm phóng thích khoảng 60%; vi gói 1 mm phóng thích khoảng 50%; vi gói 1,5 mm phóng thích khoảng 16% vi gói 2 mm phóng thích khoảng 9% so với tế bào tồn tại sau 60 phút). Tuy nhiên, vi gói càng nhỏ, tỷ lệ tế bào sống càng thấp. Chính vì vậy, kết quả hình 4 cho thấy, chỉ có vi gói 1 mm vừa có khả năng bảo vệ tế bào cao, vừa có khả năng đảm

bảo sự phóng thích tế bào ra khỏi vi gói trong cả 2 môi trường cực đoạn khảo sát.

Đối với tế bào vi gói 1 mm: sau 60 phút khảo sát chế phẩm trong môi trường cực đoạn, giữ được khoảng 60% tế bào sống. Trong 60% đó, 35% vẫn được giữ trong vi gói, 25% có ý nghĩa ở khía cạnh hoạt tính probiotic vì đó là số tế bào phóng thích ra ngoài. Trong thời gian 60 phút tiếp xúc với môi trường cực đoạn, lượng tế bào được phóng thích dần dần ra khỏi vi gói, chứ không phải tiếp xúc liền với môi trường cực đoạn như tế bào tự do. Theo một số tài liệu tham khảo, để phóng thích ra khỏi vi gói, thời gian mất từ 30-45 phút [4,8]. Như vậy trong 60 phút khảo sát, 30-45 phút ban đầu vẫn là thời gian trong vi gói, 25% tế bào phóng thích trở thành tế bào tự do chỉ trong khoảng 15-30 phút còn lại. Vì vậy, 25% tế bào phóng thích trở thành tế bào tự do này sống được trong môi trường cực đoạn trong 60 phút.

Qua toàn bộ các khảo sát của bài báo chúng tôi nhận thấy, đối với chế phẩm hạt vi gói có kích thước 1 mm, có 60% tổng số vi khuẩn (bao gồm cả lượng tế bào trong vi gói và tế bào phóng thích ra dịch) được bảo tồn trong môi trường cực đoạn sau khoảng 1 giờ, thời gian đủ để cho chế phẩm đi qua vùng dạ dày và vùng muối mật để vào ruột ức chế các vi khuẩn lên men có hại. Các kết quả về khả năng *L.bulgaricus* vi gói trong Na-alginate tồn tại cao hơn gần 2 lần so với *Bifidobacteria* vi gói trong carrageenan [10,11,12]. Đối với chất vi gói carrageenan, điều kiện vi gói ở nhiệt độ cao đã ảnh hưởng đến khả năng sống của vi khuẩn.



Hình 4. Sự phóng thích tế bào *L. bulgaricus* sau khi xử lý trong môi trường SGJ và muối mặn

Bảng 2. So sánh khả năng lên men của 2 hình thức tiếp giống tế bào tự do và chế phẩm vi gói

Thời gian lên men (giờ)	pH		Acid lactic (mg/ml)	
	Tế bào tự do	Vi gói 1mm	Tế bào tự do	Vi gói 1mm
4	5,2	5,1	2,05	2,08
8	4,8	4,8	3,06	3,05
12	4,5	4,4	3,20	3,22
16	4,2	4,2	3,35	3,30
20	4,0	4,0	3,36	3,35
24	4,0	4,0	3,35	3,35

3.5 So sánh khả năng lên men của 2 hình thức tiếp giống bởi tế bào tự do và chế phẩm vi gói

Cả hai hình thức tiếp giống đều đảm bảo các chỉ tiêu sau: Tỷ lệ giống là 5%, chất lượng giống là 10^7 tế bào/ml

Các chỉ tiêu đại diện để so sánh khả năng lên men của 2 hình thức tiếp giống bởi tế bào tự do và chế phẩm vi gói là pH và acid lactic. Kết quả thể hiện qua bảng 2 cho thấy không có sự khác biệt giữa 2 hình thức này sau 24 giờ theo dõi lên men.

IV. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp vi gói *Lactobacillus bulgaricus* trong Na- alginate tạo hạt đã nâng cao được hoạt tính probiotic: Vi gói càng nhỏ, tỷ lệ phóng thích tế bào càng lớn. Tuy nhiên, vi

gói càng nhỏ, tỷ lệ tế bào sống càng thấp. Trong các kích thước vi gói khảo sát từ 0,5 mm đến 2,0 mm, chỉ có vi gói 1 mm vừa có khả năng bảo vệ tế bào cao, vừa có khả năng đảm bảo sự phóng thích tế bào ra khỏi vi gói trong cả 2 môi trường cực đoan khảo sát. Cụ thể như sau:

- Giữ được khoảng 60% tế bào sống trong 60 phút ở môi trường acid và muối mặn so với mật độ tế bào ban đầu.

- Phóng thích 25% tế bào sống so với mật độ tế bào ban đầu ra khỏi vi gói.

- Hoạt lực lên men của tế bào tự do và chế phẩm vi gói 1 mm đã qua môi trường cực đoan của hệ tiêu hóa nhân tạo là không có sự khác biệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Audet P., Paquin C., Lacroix C., 1988, Immobilized growing lactic acid bacteria with K-carrageenan-locust bean gum gel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11-18.

2. Chandramouli V., Kalasapathy K., Peiris P., Jones M., 2004, An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions, *J. Microbiol. Meth.*, 27-35.
3. Daly C., Davis R., 1998, The biotechnology of lactic-acid bacteria with emphasis on application in food safety and human health/agricultural and food science in Finland, *Agric. Food Sci.*, 251-265.
4. Dimantov A., Greenberg M., Kesselman E., Shimoni, 2003, Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model systems, *Innov. Food Sci. Eng. Technol.* 5: 93 – 100
5. Food and Agriculture (FA) Action 865, Last updated: 13 January 2009, Bioencapsulation Multiscale Interaction Analysis (End date: January 2010). *Cost, European Cooperation in Science and Technology*.
6. Fabian E., Elmadfa I., 2006, Influence of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on the plasma lipid profile in young healthy women, *Ann Nutr. Metab.*
7. Gill H.S., Rutherford K.J., Cross M.L., 2001, Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019, *Am J Clin Nutr.*
8. Jankowski T., Zielinska M., 1997, Encapsulation of lactic and bacteria with alginatee/starch capsules, *Biotechnol. Technol.*, 31-34.
9. Kaila Kailasapathy, 2002, Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications, *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, Centre for advanced food research, University of Western Sydney, Australia, 39-48.
10. King A.H., 1995, Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. In *encapsulation and controlled release of food ingredients*, 213-220.
11. Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H., 2003, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, *Int. Dairy J.*, 3-13.
12. K. Adhikari, A. Mustapha, I. U. Grun, and L. Fernando, 2000, Viability of microencapsulated *Bifidobacteria* in set yogurt during refrigerated storage, *Journal of Dairy Science*, 83 (9), Department of Food Science, University of Missouri, Columbia, 1946-1951.

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Thuý Hương - Tel: 0955.019.067, e-mail: nthuong13567@yahoo.com
Bộ môn Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Bách khoa Tp. Hồ Chí Minh
268, Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, Tp. Hồ Chí Minh