

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

**TRẦN HỮU TÂM**

**Nghiên cứu xây dựng quy trình pilot sản  
xuất sinh khối *Bacillus* spp. làm nguyên liệu  
probiotic cung cấp carotenoid**

**Chuyên ngành: Công nghệ dược phẩm**

**Mã số: 62 73 01 01**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

**Thành phố Hồ Chí Minh - 2014**



Công trình được hoàn thành tại:

**ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP.HCM**

Người hướng dẫn khoa học:

**1. PGS.TS. Trần Cát Đông**

**2. GS.TS. Nguyễn Văn Thanh**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp trường

Họp tại:.....

Vào hồi.....giờ.....ngày.....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam.
- Thư viện khoa học tổng hợp TP.HCM.
- Thư viện Đại học Y Dược TP.HCM.



## GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

### 1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, việc dùng nguồn vi khuẩn để sản xuất một số carotenoid quan trọng đã được quan tâm nghiên cứu. Việc sử dụng vi khuẩn sinh carotenoid làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng có nhiều ưu điểm như dễ nuôi cấy ở qui mô lớn, tăng trưởng nhanh, sử dụng cơ chất giá thành thấp, ngoài ra còn có những giá trị cộng thêm như có thể bổ sung thêm các men trợ tiêu hóa, ổn định trong bảo quản. Trong số các vi khuẩn sinh carotenoid, *Bacillus* có nhiều ưu điểm vì chúng có khả năng tạo bào tử bền với nhiệt nên dễ bảo quản và sản xuất.

Trên thế giới và tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu sâu, toàn diện về *Bacillus* sinh carotenoid để cung cấp carotenoid. Mục tiêu luận án nghiên cứu xây dựng quy trình pilot sản xuất sinh khối *Bacillus* spp. làm nguyên liệu probiotic cung cấp carotenoid, hướng đến nội dung sau:

1. Phân lập *Bacillus* sinh carotenoid, khảo sát đặc điểm probiotic.
2. Khảo sát khả năng sinh carotenoid từ các vi khuẩn phân lập được.
3. Khảo sát môi trường thay thế và điều kiện nuôi cấy để xây dựng quy trình lên men.
4. Xây dựng quy trình lên men ở qui mô pilot để sản xuất sinh khối *Bacillus* làm nguyên liệu probiotic cung cấp carotenoid.
5. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của nguyên liệu.
6. Nghiên cứu khả năng ứng dụng sinh khối thu được.

### 2. Tính cấp thiết của đề tài

Các chất chống oxy hóa trong tự nhiên được quan tâm và nghiên cứu rất nhiều như flavonoid, carotenoid, polyphenol,... trong đó, carotenoid được chú ý nhiều vì có thể làm giảm tỷ lệ mắc các bệnh mạn tính như ung thư, tim mạch, chữa các bệnh về mắt. Các carotenoid sử dụng trong

các chế phẩm thường được chiết xuất từ thực vật hoặc tổng hợp hóa học, có nhiều nhược điểm như sử dụng các dung môi chiết xuất độc hại ảnh hưởng đến môi trường, phụ thuộc vào thời tiết, carotenoid kém bền khó bảo quản,...

Việc sử dụng bào tử vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid dưới dạng probiotic, cung cấp carotenoid ngay trong đường tiêu hóa có nhiều ưu điểm như thời gian nuôi cấy ngắn, không qua chiết xuất, bảo quản carotenoid đơn giản, là một hướng tiếp cận mới về nguồn và phương thức cung cấp carotenoid so với cách thức truyền thống là chiết xuất hay tổng hợp hóa học tồn tại nhiều nhược điểm đã nêu.

### **3. Những đóng góp mới của luận án**

Đây là nghiên cứu đầu tiên sử dụng bào tử *Bacillus* làm nguồn cung cấp carotenoid tại Việt Nam. Nghiên cứu này mở ra một hướng tiếp cận mới về nguồn và phương thức cung cấp carotenoid, với những đóng góp mới cụ thể như sau:

- Phân lập, định danh được hai chủng vi khuẩn *Bacillus* tại Việt Nam là *Bacillus marisflavi* DD1.1 và *Bacillus infantis* AT14, đáp ứng yêu cầu làm nguyên liệu probiotic cung cấp carotenoid.
- Xây dựng được quy trình lên men thu sinh khối bào tử ổn định ở quy mô pilot, với các thông số phù hợp, sử dụng nguyên liệu giá thành thấp, sẵn có tại Việt Nam, quy trình có tính kinh tế, có thể ứng dụng vào thực tế tạo nên sản phẩm có giá cạnh tranh.
- Chứng minh được khả năng hấp thu carotenoid tại niêm mạc ruột, khả năng điều trị tiêu chảy do kháng sinh trên mô hình động vật có vú đối với hai chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được.

#### 4. Bố cục luận án

Luận án gồm: 139 trang, đặt vấn đề 2 trang, tổng quan tài liệu 26 trang, đối tượng - vật liệu - thiết bị và phương pháp nghiên cứu 21 trang, kết quả nghiên cứu 72 trang, bàn luận 14 trang, kết luận và kiến nghị 3 trang. Luận án có 71 bảng, 23 hình, 7 sơ đồ, 118 tài liệu tham khảo, gồm 11 tài liệu tiếng Việt, 107 tài liệu tiếng Anh, 13 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

### Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

- 1.1. Thực phẩm chức năng: khái niệm, tiêu chí.
- 1.2. Probiotic: khái niệm, các tiêu chí về probiotic.
- 1.3. Thực phẩm chức năng và probiotic đối với sức khỏe: tác dụng của thực phẩm chức năng và probiotic đối với sức khỏe, y học.
- 1.4. Carotenoid: cấu trúc, phân loại, đặc tính lý hóa, tác dụng sinh học và vai của carotenoid trong y học, các phương pháp định lượng, định tính carotenoid.
- 1.5. Các vi sinh vật sinh carotenoid: trình bày về chi sinh carotenoid và các loại carotenoid đặc trưng được sinh ra.
- 1.6. Vi khuẩn *Bacillus*: đặc điểm của vi khuẩn và bào tử *Bacillus*, các ứng dụng.
- 1.7. Lên men và sản xuất sinh khối: các vấn đề môi trường lên men, yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp carotenoid ở vi sinh vật.
- 1.8. Nghiên cứu vi khuẩn sinh carotenoid thế giới và tại Việt Nam: tóm tắt các nghiên cứu trên thế giới và trong nước về tình hình nghiên cứu vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid. Chưa có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid.

## **Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Đối tượng nghiên cứu:** vi khuẩn (VK) phân lập từ mẫu đất và nước ở Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Nha Trang và Đà Nẵng.

### **2.2. Vật liệu**

+ *Vi sinh vật và động vật thử nghiệm:* chủng vi khuẩn ATCC, hoặc từ dự án Colorspore, hoặc do PTN Vi sinh Công nghệ Dược. Chuột nhắt trắng *Swiss albio*, Viện Pasteur Nha Trang.

+ *Hóa chất:* Sigma, Merck, hoặc các công ty dược trong nước.

+ *Môi trường:* TSA, TSB, NA, NB của Ấn Độ. MHA (Đức).

### **2.3. Thiết bị**

Máy luân nhiệt Mastercycler Personal (Eppendorf), Bộ điện di ngang Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad), Máy quang phổ UV-Vis GeneQuant 1300 (GE HealthCare), Máy tán siêu âm VCX 130PB (Sonics), hệ thống HPLC Smartline 2500 (Knauer), ....

### **2.4. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.4.1. Phân lập chủng VK, sàng lọc, định danh**

*Thu thập mẫu đất và nước:* Vùng biển Cần Giờ, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đà Nẵng, Bình Thuận, Nha Trang.

*Phân lập:* Trục khuẩn Gram (+), sinh bào tử, có màu sẽ được lưu lại để nghiên cứu sàng lọc khả năng sinh carotenoid.

*Sàng lọc:* hoạt tính chống oxy hóa, phổ UV-Vis dịch chiết sinh khối.

*Định danh:* Dựa trên giải trình tự gen 16S rADN.

#### **2.4.2. Khảo sát đặc điểm probiotic**

*Khả năng sinh enzym ngoại bào của chủng vi khuẩn:* khả năng sinh protease (caseinase, gelatinase), amylase, lipase.



*Thử khả năng đối kháng với VK gây bệnh (chủng ATCC): S. aureus, E. coli, S. faecalis, P. aeruginosa, Sal. paratyphi A, K. pneumoniae.*

*Khả năng chịu acid dịch vị và muối mật:* Khả năng sống sót VK sau 30, 60, 90 phút ở pH 2, 3; sau 1, 3 giờ ở muối mật 0,15%, 0,3%.

*Thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh:* PP pha loãng kháng sinh trong thạch theo M7 - A9 và M45 - A (CLSI). Sử dụng 15 kháng sinh đại diện cho các nhóm penicilin, cephem, glycopeptid, aminoglycosid, macrolid, tetracyclin, quinolon, phenicol, ansamycin.

#### **2.4.3. Khảo sát điều kiện nuôi cấy và đường cong tăng trưởng**

*Điều kiện phát triển của vi khuẩn:* từ 20 - 45°C, từ pH 6 - 11.

*Đường cong tăng trưởng trên TSB:* đo OD mỗi giờ, đếm sống để kiểm chứng. Xác định thời gian thế hệ.

#### **2.4.4. Khảo sát đặc điểm sinh carotenoid**

*Xác định hàm lượng carotenoid bằng HPLC (Knauer - Đức):* acetonitril:methanol:dichloromethan (7:2:1, tt/tt), RP18 (250 mm, 4,6 mm, 5 µm); UV-Vis,  $\lambda_{450\text{nm}}$ ; 1 ml/ phút; t° phòng; 20µl. Xác định hàm lượng carotenoid qua đường chuẩn canthaxanthin.

*Khảo sát sự tạo carotenoid theo thời gian:* Đường cong tăng trưởng: mỗi giờ, đo OD trên cùng 1 erlen. Hàm lượng carotenoid: định lượng bằng HPLC (với thông số như trên), mỗi 6 giờ (thử nghiệm sơ bộ) hoặc 2 giờ.

#### **2.4.5. Nghiên cứu quy trình nuôi cấy**

*Khảo sát MT thay thế cho TSB:* Khoai tây, bắp, gạo, đậu nành, đối chứng với TSB, chọn MT có sinh khối và carotenoid  $\geq$  MT TSB.

*Khảo sát khả năng tạo bào tử trên các MT theo thời gian*

- So sánh sự tạo bào tử giữa MTTT bổ sung  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  với DSM, TSM, 2SG (cả hai dạng lỏng và rắn).

- Khảo sát ảnh hưởng của 5 khoáng đến khả năng tạo bào tử và carotenoid: phương pháp bề mặt đáp ứng – RSM.

*Khảo sát các thông số lên men trong MT lỏng:* Tỷ lệ truyền chủng, tốc độ khuấy, pO<sub>2</sub>.

#### **2.4.6. Xây dựng tiêu chuẩn bột sinh khối bào tử**

Dựa trên chuyên luận chế phẩm Biosubtyl trong DĐVN IV.

#### **2.4.7. Thử nghiệm độc tính, sinh khả dụng trên chuột**

*Độc tính cấp:* 14 ngày. Đối tượng: DD1.1; AT14. Đối chứng: NaCl 0,85%, HU58 (*B.subtilis*). Liều: 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 5x10<sup>9</sup> bào tử/g TTC.

Xác định LD<sub>50</sub>. Giải phẫu đại thể: tìm bất thường trong nội tạng.

*Độc tính bán trường diễn:* 60 ngày. Đối tượng: DD1.1; AT14. Đối chứng: NaCl 0,85%, HU58 (*B.subtilis*). Liều: 10<sup>7</sup> bào tử/g TTC.

- Theo dõi: biểu hiện bất thường.
- Xét nghiệm: bất thường sinh hóa/ huyết học.
- Vi phẫu: bất thường mô học nội tạng.

*Sinh khả dụng trên chuột:* 60 ngày. Đối tượng: DD1.1; AT14. Đối chứng: NaCl 0,85%, HU58 (*B.subtilis*), dầu gấc (β-caroten). Liều: 10<sup>6</sup> bào tử/g TTC.

Đánh giá tích lũy carotenoid trong gan.

#### **2.4.8. Ứng dụng nguyên liệu sinh khối**

##### *2.4.8.1. Điều trị tiêu chảy do kháng sinh*

Gây tiêu chảy chuột bằng streptomycin và lincomycin, duy trì bằng ¼ liều, 1 lần/ngày. Thử nghiệm: AT14, DD1.1, BS02 (1 VK hay 2 VK, 2 lần/ngày). Quan sát phân chuột hàng ngày đến hết tiêu chảy.

*2.4.8.2. Bổ sung vi khuẩn vào sữa chua:* Mẫu thử: DD1.1, AT14 (10<sup>6</sup> – 5x10<sup>8</sup> bào tử/ml). Mẫu chứng: không có bào tử VK.

Đánh giá cảm quan sữa chua bổ sung VK sinh carotenoid: mùi, hương vị, kết cấu (điểm 9 = rất thích -> 1 = rất không thích).

Khảo sát độ ổn định của bào tử trong sữa chua: từ ngày 1 - 45.

#### 2.4.8.3. Khảo sát độ ổn định bào tử DD1.1, AT14 cốm, hỗn dịch

Cốm, hỗn dịch bảo quản ở 25 - 30 °C. Sau 3, 6, 9 và 12 tháng: trải mẫu theo dõi độ ổn định của bào tử VK.

### Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Phân lập, sàng lọc và định danh vi khuẩn

Phân lập thu được 72 chủng vi khuẩn. Khu trú lại 38 chủng trực khuẩn Gram dương, có bào tử để nghiên cứu tiếp.

Khả năng bắt giữ DPPH: hầu hết các chủng đều có khả năng sinh chất chống oxy hóa, 17 chủng có khả năng bắt giữ trên 50% và 4 chủng có khả năng bắt giữ > 80% sau 60 phút (AT14, CG05.0, DD1.1, NM4).

Phổ UV – Vis: trừ hai chủng CG10.4, CG14.3, tất cả các chủng đều có đỉnh hấp thu trong vùng 400 – 550 nm (vùng hấp thu của carotenoid).

Định danh bằng giải trình tự 16S – rADN, 38 chủng phân lập thuộc các loài: *B. infantis*, *B. firmus*, *B. aquimaris*, *B. ferrariarum*, *B. amyloliquefaciens*, *B. catenulatus*, *B. cibi*, *B. vietnamensis*, *B. boroniphilus*, *B. baekryungensis*, *B. marisflavi*, *B. alcalophilus*, *B. licheniformis*, *B. selenatarsenatis*, *B. mangrovensis* và *B. indicus*.

#### 3.2. Khảo sát các đặc điểm probiotic

Khả năng sinh enzym ngoại bào và đối kháng VK gây bệnh: Tất cả không sinh lipase, 16 chủng sinh protease và amylase. 38 chủng VK thử nghiệm không đối kháng với VK gây bệnh.

*Khả năng chịu acid:* Ở pH 2, AT14, AT22, CG17.0, DD1.1 và HC28 có khả năng sống sót cao nhất khoảng 40 - 50%.

*Khả năng chịu muối mật:* Ở nồng độ 0,3%, AT14, AT22, CG17.0, DD1.1 và HC28 sống sót 40 - 50%. Các chủng còn lại có khả năng thích nghi, phát triển giảm.

*Nhạy cảm kháng sinh:* 25 chủng nhạy cảm với tất cả 15 kháng sinh, trong đó có 5 chủng tiềm năng ở trên, vì vậy chọn AT14, AT22, CG17.0, DD1.1 và HC28 là những chủng sẽ nghiên cứu tiếp tục.

### 3.3. Khảo sát điều kiện nuôi cấy và đường cong tăng trưởng

Điều kiện phát triển: nhiệt độ 37 °C, pH 7-9.

Đường cong tăng trưởng: thời gian ổn định dài từ 20 -36 giờ.

Bảng 3.1. Thời gian thế hệ và các đặc tính phát triển của 5 chủng

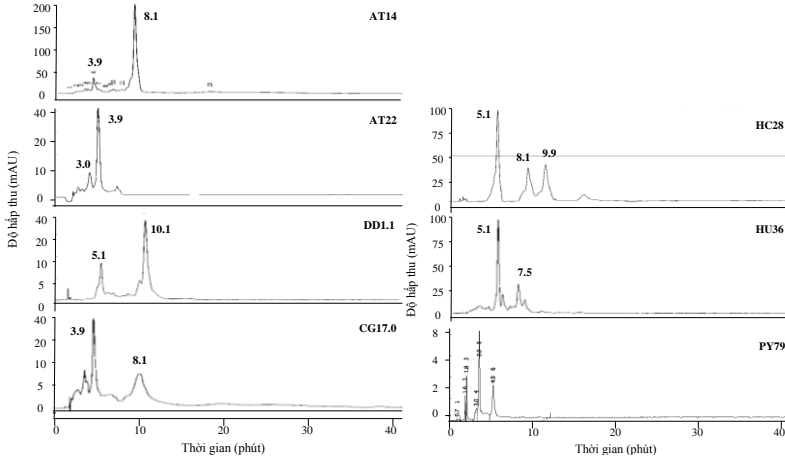
Chủng	Tốc độ phát triển (log <sub>10</sub> /giờ)	Thời gian thế hệ (giờ)	R <sup>2</sup>	Pha ổn định* (giờ)
AT14	0,346	0,870	0,956	13-34
AT22	0,291	1,033	0,981	10-44
DD1.1	0,329	0,914	0,968	13-48
CG17.0	0,264	1,140	0,964	10-30
HC28	0,251	1,199	0,969	08-22
	0,023	13,088	0,979	30-45

\* Thời gian tính từ T<sub>0</sub>

### 3.4. Khảo sát đặc điểm sinh carotenoid

#### 3.4.1. Phân tích carotenoid bằng HPLC

Các carotenoid từ vi khuẩn thuộc nhóm xanthophyl.



Hình 3.1. Sắc ký đồ HPLC dịch chiết carotenoid từ chủng *Bacillus*

### 3.4.2. Khảo sát sự tạo carotenoid theo thời gian

Carotenoid ở các chủng khảo sát đạt cực đại vào đầu pha ổn định (DD1.1, AT14, HU36), hoặc giữa pha ổn định (AT22, CG17.0, HC28).

Bảng 3.2. Thời gian carotenoid đạt cao nhất của 6 chủng khảo sát

Chủng	Hàm lượng carotenoid ( $\mu\text{g/g SKK}$ )	Thời gian (giờ) *
AT14	745	22 – 24
AT22	572	24 – 26
DD1.1	225	16 – 18
CG17.0	257	24 – 26
HC28	543	28 – 30
HU36	320	44 – 46

\* Thời gian đạt carotenoid cao nhất, SKK – sinh khối khô.

### 3.5. Khảo sát môi trường thay thế

Không tìm được MTTT thích hợp cho các chủng CG17.0, HC28 vì MT thay thế (MTTT) tạo sinh khối hoặc carotenoid không cao, và AT22 vì hiệu suất tạo bào tử thấp, hiệu quả không cao.

### 3.5.1. Khảo sát môi trường thay thế thu tế bào sinh dưỡng

Chọn được MTTT cho TSB, cụ thể:

- Đậu 5% (Đ5) dùng cho DD1.1: số lượng tế bào và lượng carotenoid cao hơn 5,4 và 3,7 lần so với TSB.
- Đậu – khoai 15% (ĐK15) dùng cho AT14: số lượng tế bào và lượng carotenoid cao hơn TSB tương ứng là 5,7 và 2,15 lần.

### 3.5.2. Môi trường thay thế thu sinh khối bào tử

Từ kết quả MTTT, bổ sung khoáng, khảo sát MT lỏng và MT rắn:

- AT14: MT lỏng ĐK15% + khoáng (ĐK15K), lượng bào tử cao hơn 4,5 lần so với DSM và 2SG. Trong đó MT rắn ĐK15% + khoáng (ĐK15KA) cho bào tử cao hơn 4,4 lần so với ĐK15K.
- DD1.1: MT lỏng Đậu 5% + khoáng (Đ5K), thu bào tử gấp 16,8 lần 2SG và 30,2 lần DSM. Trong đó MTTT rắn (Đ5KA) cao gấp 5 lần Đ5K.

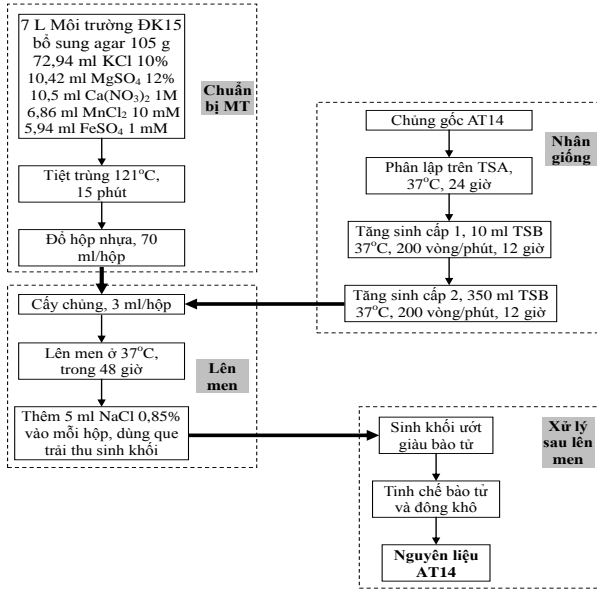
Tối ưu hóa, thu được kết quả thành phần 5 khoáng  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  cần bổ sung để tối ưu lượng bào tử và carotenoid AT14, DD1.1.

### 3.6. Khảo sát thông số lên men thu bào tử môi trường lỏng

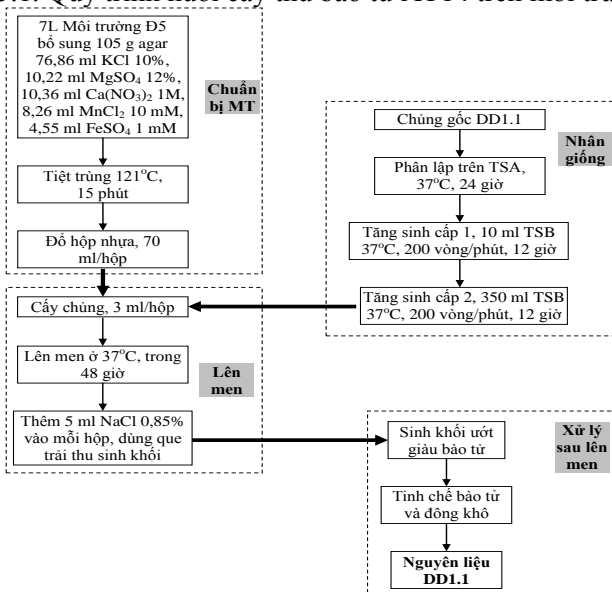
Bảng 3.3. Thông số lên men thu bào tử của trong môi trường lỏng

Chủng	Tỷ lệ truyền chủng (%)	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	pO <sub>2</sub> (%)
AT14	5	350	50
DD1.1	5	250	50

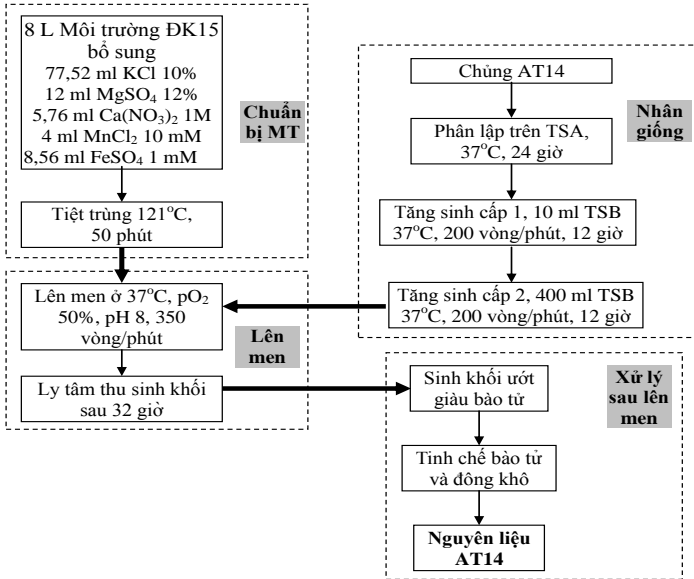
### 3.7. Quy trình lên men thu bào tử



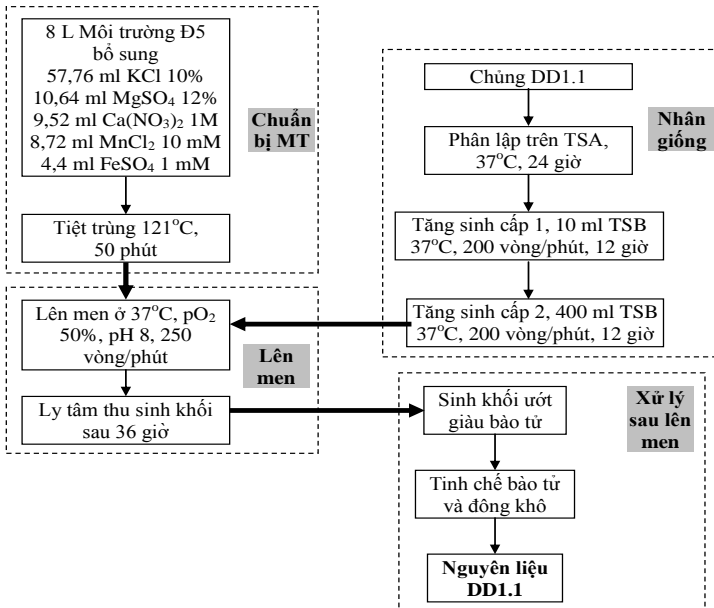
Sơ đồ 3.1. Quy trình nuôi cấy thu bào tử AT14 trên môi trường rắn



Sơ đồ 3.2. Quy trình nuôi cấy thu bào tử DD1.1 trên môi trường rắn



Sơ đồ 3.3. Quy trình nuôi cấy thu bào tử AT14 trên môi trường lỏng



Sơ đồ 3.4. Quy trình nuôi cấy thu bào tử DD1.1 trên môi trường lỏng



### 3.7.3. Ứng dụng quy trình lên men thu bào tử AT14 và DD1.1

Kết quả ứng dụng thu sinh khối bào tử tại bảng 3.4, 3.5.

Bảng 3.4. Ứng dụng quy trình lên men thu bào tử AT14, DD1.1 trên môi trường rắn (7 L)

Chủng	Mê lên men	BT sau lên men $\times 10^{12}$ CFU	BT sau tinh chế $\times 10^{12}$ CFU (%)	BT sau đông khô $\times 10^{12}$ CFU (%)	Lượng sinh khối (g)	Carotenoid ( $\mu\text{g}/10^9\text{BT}$ )
AT14 (ĐK15KA)	1	21,32	17,65 (82,8)	16,11 (75,6)	55,95	1,1
	2	22,11	16,87 (76,3)	16,49 (74,6)	54,40	1,2
	3	21,17	17,01 (80,3)	16,74 (79,1)	54,68	1,1
	<b>TB</b>	21,53	17,18 (79,8)	16,45 (76,4)	55,02	1,13
DD1.1 (Đ5KA)	1	96,03	84,07 (87,5)	80,81 (84,2)	187,04	0,31
	2	94,23	85,61 (90,9)	81,05 (86,0)	190,08	0,31
	3	95,32	82,95 (87,0)	80,71 (84,7)	184,83	0,32
	<b>TB</b>	95,19	84,21 (88,5)	80,85 (84,9)	187,31	0,31

Bảng 3.5. Ứng dụng quy trình lên men thu bào tử AT14, DD1.1 trong môi trường lỏng (8 L)

Chủng	Mê lên men	BT sau lên men $\times 10^{12}$ CFU	BT sau tinh chế $\times 10^{12}$ CFU (%)	BT sau đông khô $\times 10^{12}$ CFU (%)	Lượng sinh khối (g)	Carotenoid ( $\mu\text{g}/10^9\text{BT}$ )
AT14 (ĐK15K)	1	39,14	31,36 (80,1)	30,29 (77,4)	86,86	1,51
	2	39,32	30,72 (78,1)	30,08 (76,5)	85,51	1,53
	3	38,82	30,26 (77,9)	29,18 (75,2)	84,55	1,51
	<b>TB</b>	39,09	30,78 (78,7)	29,85 (76,4)	85,64	1,52
DD1.1 (Đ5K)	1	72,53	64,83 (89,4)	61,65 (85,0)	160,38	0,42
	2	71,45	65,15 (91,2)	62,08 (86,9)	161,07	0,43
	3	73,01	64,56 (88,4)	60,38 (82,7)	159,80	0,41
	<b>TB</b>	72,33	64,85 (89,7)	61,37 (84,8)	160,43	0,42

Các mẻ lên men AT14 và DD1.1 trên môi trường lỏng hoặc rắn theo quy trình đề xuất có số lượng bào tử thu được ổn định.

Tính giá thành của môi trường thay thế và nguyên liệu so sánh với môi trường thương mại tạo bào tử DSM:

Bảng 3.6. Giá thành của MTTT rắn so với thạch DSM

Tên môi trường	Đ5KA (cho DD1.1)	ĐK15KA (cho AT14)	Thạch DSM
Giá thành 1 lít MT (VNĐ)	7.300	9.800	21.000

Bảng 3.7. Giá thành của MTTT lỏng so với môi trường DSM

Tên môi trường	Đ5K (cho DD1.1)	ĐK15K (cho AT14)	DSM
Giá thành 1 lít MT (VND)	2.300	4.000	15.000

Tính giá nguyên liệu bào tử thu được từ quy trình sản xuất: Giá của nguyên liệu bào tử AT14 từ 80 – 130 đồng /liều, DD1.1 từ 26 – 39 đồng /liều ( $10^9$  bào tử/liều).

### 3.8. Xây dựng tiêu chuẩn nguyên liệu sinh khối

Dựa trên tiêu chuẩn chế phẩm Biosubtyl trong ĐĐVN IV gồm các tiêu chí:

- Định nghĩa.
- Sản xuất.
- Yêu cầu kỹ thuật:

+ Thành phần nguyên liệu

+ Tiêu chuẩn nguyên liệu: hình thức, định tính vi sinh vật, mất khối lượng do làm khô, công hiệu, giới hạn nhiễm khuẩn, tính an toàn.

Các tiêu chí đều có phương pháp thử kèm theo. Kết quả kiểm nghiệm tại Trung tâm Kiểm nghiệm Dược phẩm Thực phẩm Mỹ phẩm TP.HCM đều đạt các chỉ tiêu.

### 3.9. Thử nghiệm độc tính

$LD_{50}$  đường uống DD1.1 và AT14  $>10^{11}$  bào tử /chuột, tức  $>5 \times 10^{12}$  bào tử/kg. Sau 60 ngày thử nghiệm, không có chuột chết, cân nặng không có sự khác biệt, chỉ số huyết học, sinh hóa bình thường. Không có sự thay đổi về mô học ở thận, lá lách, ruột non và gan.

### 3.10. Hấp thu, tích lũy carotenoid từ AT14 và DD1.1 ở gan chuột

Chuột uống bào tử AT14, DD1.1 lượng carotenoid tích lũy trong gan tương đương với việc sử dụng dầu gấc và cao gấp 16 lần lô NaCl 0,85% hoặc lô sử dụng bào tử VK không sinh carotenoid như HU58. Từ đó cho

thấy chủng DD1.1, AT14 có khả năng sinh carotenoid và cung cấp cho cơ thể vật chủ qua niêm mạc ruột.

### **3.11. Khả năng trị tiêu chảy do kháng sinh của AT14, DD1.1**

Liều tối thiểu phòng ngừa và điều trị tiêu chảy của *B. infantis* AT14 và *B. marisflavi* DD1.1 là  $10^6$  bào tử/10g TTC ( $\#10^8$  bào tử/1 kg thể trọng, 2 lần/ngày) ở mẫu thử chỉ chứa một vi khuẩn và mẫu thử phối hợp với *B. subtilis* BS02. Tương tự với liều của các sản phẩm probiotic chứa *Bacillus* của WHO.

### **3.12. Khả năng ứng dụng**

#### **3.12.1. Bổ sung bào tử vào sữa chua**

Khi bổ sung từ  $5 \times 10^7$  -  $10^8$  bào tử /ml (tương ứng với  $5 \times 10^9$  -  $10^{10}$  bào tử trên 1 hũ sữa chua 100 ml), sữa chua có màu sắc khác biệt so với mẫu đối chứng và mức độ ưa thích >50%.

Bào tử VK ổn định trong quá trình bảo quản sữa chua (1 - 45 ngày).

#### **3.12.2. Độ ổn định của cốm và hỗn dịch bổ sung bào tử vi khuẩn**

Sau 12 tháng theo dõi độ ổn định của cốm và hỗn dịch bổ sung bào tử AT14 và DD1.1 ở nhiệt độ phòng (25 - 30°C), độ ẩm 70 – 75%, số lượng bào tử vi khuẩn không thay đổi nhiều. Vì vậy, có thể sử dụng AT14 hoặc DD1.1 trong bào chế cốm hoặc hỗn dịch.

## **Chương 4. BÀN LUẬN**

### **4.1. Vi khuẩn sinh carotenoid**

Nghiên cứu này đã tiến hành thu thập mẫu rộng hơn tại vùng biển một số tỉnh Việt Nam, bao gồm cả việc lấy mẫu lặp lại tại những địa điểm đã cho kết quả khả quan của nghiên cứu trước, kết quả đã phân lập được 72 chủng, trong đó có 38 chủng có tiềm năng. Với 38 chủng phân lập được,

kèm theo dữ liệu nghiên cứu về các đặc tính probiotic có thể làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn trong việc theo đuổi mục tiêu nghiên cứu sử dụng *Bacillus* ứng dụng trong thực phẩm chức năng hoặc thuốc.

Kết quả quét phổ UV-Vis của các dịch chiết này cho thấy đa số các mẫu có đỉnh hấp thu trong vùng 450 - 500nm (vùng hấp thu của carotenoid). Bên cạnh đó, kết quả phân tích HPLC với đầu dò UV-Vis trong đề tài này, cũng như bởi nhóm nghiên cứu của Dự án Colorspores của Đại học Hoàng gia Holloway Anh Quốc có thể kết luận các chủng phân lập được có khả năng sinh carotenoid.

Dựa trên đặc tính quan trọng của carotenoid là khả năng chống oxy hóa, đối chiếu với các chất chống oxy hóa đã biết như BHT, vitamin C,  $\beta$ -caroten, lutein, lycopene, zeaxanthin, nhận thấy khả năng chống oxy hóa của dịch chiết từ các chủng vi khuẩn tương đương với các chất chống oxy hóa truyền thống mà chúng ta đang dùng như vitamin C,  $\beta$ -caroten, lutein,... điều này mở ra nhiều triển vọng cho các nghiên cứu sắp tới về khả năng ứng dụng các chất chống oxy hóa từ vi khuẩn.

Định danh bằng giải trình tự 16S rADN, 38 chủng phân lập đều thuộc chi *Bacillus*, ngoài một số loài đã được ghi nhận bởi các tác giả khác về khả năng sinh carotenoid, riêng các chủng thuộc các loài: *B. infantis*, *B. ferrariarum*, *B. catenulatus*, *B. vietnamensis*, *B. boroniphilus*, *B. baekryungensis*, *B. alcalophilus*, *B. selenatarsenatis* và *B. mangrovensis* chưa thấy có tài liệu nào ghi nhận về khả năng sinh carotenoid ngoài nghiên cứu này. Điều này cho thấy các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có những loài có khả năng sinh carotenoid chưa được biết đến.

Hầu hết các chủng có khả năng sinh enzym protease (caseinase hoặc gelatinase) và enzym amylase, như vậy các chủng vi khuẩn này ngoài

khả năng cung cấp carotenoid còn có thể tiết các enzym hỗ trợ cho hệ tiêu hóa. Các chủng khảo sát có khả năng sống sót cao ở điều kiện pH và muối mật của hệ tiêu hóa, đây là một trong những đặc tính quan trọng đối với việc sử dụng làm probiotic vì đảm bảo khả năng sống sót của vi khuẩn để có thể đến ruột non và phát huy tác dụng mong muốn.

Các carotenoid sinh ra từ VK phân lập được đều thuộc nhóm xanthophyl. So sánh với chất chuẩn nhận thấy:

- DD1.1: 2 loại carotenoid, thời gian lưu 5,1 và 10,1 phút (ứng với canthaxanthin).
- AT14: 2 loại carotenoid, đỉnh chính 8,1 phút, đỉnh phụ 3,9 phút (tương tự astaxanthin).
- HC28 có đỉnh chính là 5,1 phút, 2 đỉnh khác ở 8,1 và 9,9 phút.
- CG17.0 và AT22 có đỉnh chính là 3,9 phút tương tự astaxanthin. Hai chủng này còn có carotenoid khác là 8,1 và 3,0 phút.

Việc tích lũy carotenoid có thể theo một trong hai hướng:

- *Hướng 1 (tích lũy cùng với sinh khối tế bào - DD1.1, AT14, HU36):* carotenoid được tích lũy cùng với sinh khối tế bào và đạt cực đại với sinh khối tối ưu, tương tự nghiên Veiga-Crespo và cộng sự.
- *Hướng 2 (tích lũy liên quan enzym tổng hợp carotenoid - AT22, CG17.0, HC28):* cần đạt được hàm lượng enzym cần thiết cho việc sinh tổng hợp, carotenoid gần như không tăng ở pha lũy thừa, tăng dần ở pha ổn định và đạt cực đại vào giữa hoặc cuối pha ổn định. Tương tự nghiên cứu Kim và cộng sự.

#### **4.2. Môi trường thay thế**

Nhằm hướng đến mục tiêu sản xuất, cần phải tìm được nguồn nguyên liệu giá thành thấp, sẵn có tại Việt Nam để thay thế môi trường thương

mại có giá thành cao, đảm bảo tính khả thi của quy trình lên men khi đưa vào ứng dụng trong thực tế.

Nghiên cứu này đã tìm ra được môi trường thay thế ở dạng rắn và lỏng, cùng với thành phần tối ưu của khoáng chất để tạo bào tử chủng AT14 và DD1.1 với năng suất cao và giá thành rẻ hơn gấp nhiều lần so với môi trường thương mại. Cụ thể đối với chủng AT14: MT lỏng ĐK15% + khoáng (ĐK15K) cho lượng bào tử cao hơn 4,5 lần so với DSM và 2SG. Trong đó MT rắn ĐK15% + khoáng (ĐK15KA) cho bào tử cao hơn 4,4 lần so với ĐK15K. Chủng DD1.1: MT lỏng Đậu 5% + khoáng (Đ5K), thu bào tử gấp 16,8 lần 2SG và 30,2 lần DSM. Trong đó MTTT rắn (Đ5KA) cao gấp 5 lần Đ5K.

### **4.3. Lên men thu bào tử và tiêu chuẩn nguyên liệu sinh khối**

Từ những kết quả nghiên cứu thu được, đề xuất bốn quy trình pilot lên men thu sinh khối bào tử đối với hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid AT14 và DD1.1 phân lập được (hai quy trình lên men trên môi trường rắn và hai quy trình trong môi trường lỏng) với qui mô lớn hơn 10.000 liều ( $10^9$  bào tử/liều).

Áp dụng sản xuất ở quy mô pilot, nhận thấy quy trình cho lượng bào tử ổn định, giá thành thấp hơn nhiều so với môi trường thương mại từ 2-3 lần (lên men trên môi trường lỏng) và từ 3,8–6,5 lần (môi trường rắn). Nguyên liệu bào tử thu được có chi phí sản xuất giao động từ 80 – 130 VNĐ /liều  $10^9$  bào tử AT14 (lượng carotenoid trung bình 1,13 – 1,52  $\mu\text{g}$ /liều) và 26 – 39 VNĐ /liều  $10^9$  bào tử DD1.1 (lượng carotenoid trung bình 0,31 – 0,42  $\mu\text{g}$ /liều), chứng tỏ quy trình đáp ứng về mặt kỹ thuật và hiệu quả kinh tế có thể ứng dụng để sản xuất, cung cấp nguyên liệu bào tử AT14 và DD1.1 cho ngành dược và thực phẩm chức năng.

Quy trình lên men rắn hoặc trong nồi lên men đều có ý nghĩa ứng dụng thiết thực. Cụ thể, quy trình lên men trên môi trường rắn có nhược điểm là tương đối thủ công, giới hạn quy mô sản xuất, tuy nhiên có thể áp dụng ngay để sản xuất mà không đòi hỏi phải đầu tư thêm cơ sở vật chất, trang thiết bị, vì vậy đơn vị ứng dụng có thể dễ dàng triển khai trong giai đoạn đầu thăm dò thị trường, hoặc khi nhu cầu thị trường còn nhỏ. Ngược lại, quy trình lên men trong nồi lên men đòi hỏi phải đầu tư cơ sở vật chất và trang thiết bị khá tốn kém như nồi lên men, nhưng ưu điểm là có thể tự động hóa, sản xuất được những mẻ lớn hơn so với quy trình lên men trên môi trường rắn, vì vậy quy trình này phù hợp khi thị trường sản phẩm khả quan, cần sản xuất lô lớn để cung cấp cho nhu cầu của người sử dụng.

#### **4.4. Độ tính của hai chủng AT14 và DD1.1**

Liều cao nhất  $10^{11}$  bào tử/con chuột vẫn không gây chết chuột sau 72 giờ và 14 ngày thử nghiệm, có thể kết luận liều  $LD_{50}$  đường uống của DD1.1 và AT14  $>10^{11}$  bào tử /con chuột, tức  $>5 \times 10^{12}$  bào tử /kg thể trọng.

Đối với probiotic trên thị trường, liều VK cao nhất cho người trưởng thành sử dụng là  $10^{11}$  CFU/kg thể trọng / ngày, như vậy liều khảo sát của đề tài là  $> 5 \times 10^{12}$  bào tử /kg thể trọng/ngày đã cao gấp 50 lần so với liều cao nhất thực tế sử dụng.

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn của DD1.1, AT14 trong 60 ngày thử nghiệm nhận thấy không có sự khác biệt giữa lô thử nghiệm, lô chứng và lô đối chứng. Ngoài ra, ở các nghiên cứu trước, DD1.1, AT14 đã được chứng minh không mang gen gây độc.

Từ đó, có thể kết luận hai chủng DD1.1, AT14 an toàn và có khả năng làm probiotic.

#### **4.5. Hấp thu, tích lũy carotenoid từ AT14 và DD1.1 ở gan chuột**

Chuột uống bào tử AT14 và DD1.1 lượng carotenoid tích lũy trong gan tương đương với việc sử dụng dầu gấc và cao gấp 16 lần so với lô NaCl 0,85% hoặc lô sử dụng bào tử VK không sinh carotenoid như *B. subtilis* HU58.

Như vậy, có thể nói nghiên sử dụng bào tử *Bacillus* làm nguồn cung cấp carotenoid có nhiều ưu điểm:

- Cung cấp carotenoid ngay trong đường tiêu hóa và cơ thể vật chủ có thể hấp thu trực tiếp qua niêm mạc ruột;
- Không cần chiết xuất trước nên không sử dụng các loại dung môi độc hại ảnh hưởng đến môi trường, đồng thời hạn chế nhược điểm của carotenoid là kém bền với nhiệt độ và tác nhân oxi hóa, giúp việc bảo quản đơn giản hơn.

Đây là một hướng tiếp cận mới về nguồn và phương thức cung cấp carotenoid.

#### **4.6. Khả năng điều trị tiêu chảy liên quan đến kháng sinh**

Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng làm probiotic và thực phẩm chức năng của AT14, DD1.1 nói riêng và các vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid nói chung là rất lớn, không chỉ giới hạn trong phạm vi làm nguồn cung cấp carotenoid. Đồng thời qua kết quả này, có thể rút ra một số nhận xét như sau:

- Không nhất thiết chỉ sử dụng các vi khuẩn có tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh trong phòng và điều trị tiêu chảy, nhận định này không nhằm mục đích bác bỏ các kết quả nghiên cứu đã công bố trước đây, nhưng là một dữ liệu bổ sung nhằm giúp cho các nghiên



cứu tiếp theo trong định hướng sàng lọc, lựa chọn chủng, tránh bỏ sót các chủng tiềm năng.

- Gián tiếp chứng tỏ bào tử hai chủng AT14 và DD1.1 đã nảy mầm trở lại thành dạng sinh dưỡng sau khi vào đường tiêu hóa, lý luận này bổ sung và tiếp tục khẳng định đối với kết quả hấp thu và tích lũy carotenoid trong gan chuột trong đề tài này, đó là: sau khi được uống vào, bào tử vi khuẩn đã nảy mầm và cung cấp carotenoid ngay tại niêm mạc ruột.
- AT14 và DD1.1 mặc dù không có lợi điểm đề kháng với kháng sinh, nhưng khi dùng chung với kháng sinh liều duy trì thì có tác dụng, điều này là một kết quả rất đáng quan tâm vì chúng ta sẽ không phải lo ngại nguy cơ chuyển gen đề kháng kháng sinh, nhưng chúng nghiên cứu vẫn đảm bảo được ưu điểm đó là khả năng dùng chung với kháng sinh trong điều trị tiêu chảy.

#### **4.7. Khả năng ứng dụng bào tử AT14 và DD1.1 sinh carotenoid trên một số dạng chế phẩm**

Trên các dạng chế phẩm thử nghiệm như sữa chua, thuốc cốm, hỗn dịch, bào tử AT14 và DD1.1 cho các kết quả khả quan. Độ ổn định của bào tử là 45 ngày đối với sữa chua, 12 tháng đối với thuốc cốm và hỗn dịch.

Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng của bào tử AT14 và DD1.1 trên các dạng chế phẩm là rất lớn, có thể sử dụng bào tử vi khuẩn AT14 và DD1.1 làm probiotic để cung cấp carotenoid.

### **KẾT LUẬN**

Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu, phân lập một số vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid, từ đó xây dựng quy trình pilot sản xuất sinh khối làm nguyên

liệu probiotic cung cấp carotenoid. Sau thời gian thực hiện, các kết quả nghiên cứu trong luận án đã đáp ứng các mục tiêu đặt ra, đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu:

### **1. Phân lập vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid và khảo sát đặc điểm probiotic**

Đã phân lập, định danh 38 chủng *Bacillus*, ngoại trừ khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh, 38 chủng đều có những đặc điểm probiotic và có khả năng sinh carotenoid. Từ đó chọn được hai chủng có tiềm năng là *Bacillus infantis* AT14, *Bacillus marisflavi* DD1.1 để nghiên cứu sản xuất và ứng dụng.

### **2. Đặc điểm sinh carotenoid từ các chủng phân lập được**

Các chủng tiềm năng đều có khả năng sinh carotenoid thuộc nhóm xanthophyl. Hàm lượng carotenoid tích lũy đạt cực đại vào cuối pha lũy thừa hoặc trong pha ổn định trên đường cong tăng trưởng. Do đó, có thể thu nhận carotenoid cao nhất cùng với thời điểm sinh khối tế bào đạt cực đại.

### **3. Môi trường nuôi cấy thay thế và điều kiện nuôi cấy**

Xác định được các điều kiện tăng trưởng của các chủng và tìm được môi trường giá thành thấp như đậu và khoai tây để thay thế các môi trường thương mại đắt tiền. Môi trường nghiên cứu có giá thành rẻ hơn và khả năng tạo bào tử cao hơn nhiều lần so với môi trường thương mại.

### **4. Quy trình lên men ở quy mô pilot để sản xuất sinh khối bào tử**

Đã xây dựng được các quy trình lên men ổn định, có năng suất cao và giá thành thấp trên môi trường rắn và lỏng để sản xuất sinh khối bào tử của các vi khuẩn *B. marisflavi* DD1.1 và *B. infantis* AT14.

- Lên men trên môi trường rắn với qui mô mỗi mẻ 15.000 liều bào tử *Bacillus infantis* AT14 ( $10^9$  bào tử /liều) và 75.000 liều bào tử *Bacillus marisflavi* DD1.1 ( $10^9$  bào tử/liều).
- Lên men trong môi trường lỏng với qui mô mỗi mẻ 25.000 liều *Bacillus infantis* AT14 ( $10^9$  bào tử/liều), và 55.000 liều *Bacillus marisflavi* DD1.1 ( $10^9$  bào tử /liều).

## 5. Tiêu chuẩn cơ sở nguyên liệu

Đã xây dựng các tiêu chuẩn cơ sở cho nguyên liệu bột sinh khối.

## 6. Khả năng ứng dụng của sinh khối bào tử thu được

Các chủng *B. marisflavi* DD1.1 và *B. infantis* AT14 không có độc tính qua thử nghiệm độc tính cấp và bán cấp, với  $LD_{50} > 5 \times 10^{12}$  CFU/kg.

Đã chứng minh được các carotenoid sinh ra từ các chủng *B. marisflavi* DD1.1 và *B. infantis* AT14 được hấp thu vào cơ thể vật chủ qua niêm mạc ruột và tích lũy ở gan chuột.

Bào tử *B. marisflavi* DD1.1 và *B. infantis* AT14 đã được chứng minh có khả năng điều trị tiêu chảy liên quan đến kháng sinh trên mô hình chuột khi sử dụng độc lập hoặc phối hợp với chủng *B. subtilis* BS02.

Bào tử của các chủng *B. marisflavi* DD1.1 và *B. infantis* AT14 có thể được sử dụng làm vi khuẩn probiotic bổ sung vào chế phẩm sữa chua cung cấp carotenoid với liều lên đến  $10^{10}$  bào tử/ 100 ml sữa chua mà không làm mất cảm quan hay mùi vị sản phẩm.

Bột nguyên liệu bào tử và các dạng thuốc cốm, hỗn dịch chứa bào tử của các chủng *B. marisflavi* DD1.1 và *B. infantis* AT14 ổn định trong 12 tháng.

**KIẾN NGHỊ**

Tiến hành thử nghiệm độc tính và thử nghiệm lâm sàng trên người tình nguyện đối với các chủng này.

Tăng qui mô lên men để thu bào tử với lượng lớn hơn.

Bào chế các chế phẩm sử dụng các chủng này để phục vụ việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1. Trần Hữu Tâm, Trần Cát Đông, Nguyễn Văn Thanh (2014), “Nghiên cứu tính an toàn và sinh khả dụng của hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sinh carotenoid”, *Tạp chí Dược học*, số **457**: tr.30-36.
2. Trần Hữu Tâm, Nguyễn Thị Linh Giang, Nguyễn Văn Thanh, Trần Cát Đông (2014), “Khả năng điều trị tiêu chảy liên quan đến kháng sinh trên mô hình chuột của bào tử của trực khuẩn sinh carotenoid phân lập tại Việt Nam”, *Tạp chí Y học Thực hành*, số **916**: tr.28-31.
3. Trần Hữu Tâm, Trần Thị Thanh Thảo, Trần Cát Đông (2014), “Nghiên cứu bổ sung *Bacillus* sinh carotenoid vào sữa chua”, *Tạp chí Y Học TP.HCM*. **18**(2): tr.267-271.
4. Vũ Thanh Thảo, Nguyễn Minh Thái, Nguyễn Thị Linh Giang, Trần Hữu Tâm, Trần Cát Đông (2014), “Nghiên cứu đặc tính probiotic của *Bacillus subtilis* BS02”, *Tạp chí Y học thực hành*, số **907**(3): tr. 20-24.
5. Lê Minh Trí, Trần Hữu Tâm, Trần Thị Thanh Thảo, Trần Cát Đông (2011), “Khảo sát môi trường nuôi cấy *Bacillus* sinh carotenoid từ các nguồn nguyên liệu rẽ tiền”, *Tạp chí Y Học TP.HCM*. **15**(1): tr. 189-194.
6. Vũ Thanh Thảo, Trần Hữu Tâm, Trần Thành Đạo, Trần Cát Đông (2011), “Khảo sát sự tạo carotenoid theo thời gian ở pha sinh dưỡng của một số chủng *Bacillus*”. *Tạp chí Y Học TP.HCM*. **15**(1): tr. 211-217.