

TIỀM NĂNG PROBIOTIC CỦA MỘT SỐ VI KHUẨN LACTIC PHÂN LẬP TỪ SỮA MẸ

ThS. Dương Nhật Linh¹

ThS. Nguyễn Văn Minh¹

Trần Thị Kim Sa¹

Trần Cát Đông²

TÓM TẮT

Mở đầu: Probiotic là những vi khuẩn sống có lợi cho đường ruột, khi được bổ sung vào cơ thể với liều lượng thích hợp. Những vi khuẩn này có ảnh hưởng tốt cho sức khỏe của con người như tăng cường hệ miễn dịch, ngăn ngừa cũng như điều trị tiêu chảy do rối loạn vi khuẩn đường ruột, điều hoà phản ứng viêm. Nhiều vi khuẩn probiotic được sử dụng để hỗ trợ điều trị các bệnh đường ruột như: tiêu chảy, hội chứng ruột kích thích. Mặc dù chủng probiotic có thể được phân lập từ nhiều nguồn, nhưng nếu sử dụng cho người thì áp dụng tiêu chí chính là có nguồn gốc từ người (WHO/FAO, 2002).

Sữa mẹ là nguồn dinh dưỡng quan trọng đối với trẻ sơ sinh, rất nhiều nghiên cứu cho thấy tác dụng có lợi của sữa đối với sức khỏe của trẻ sơ sinh. Tác dụng có lợi này còn được giải thích là do các vi khuẩn lactic có trong sữa mẹ [6].

Mục tiêu: Đánh giá tiềm năng probiotic in vitro của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa của những bà mẹ khỏe mạnh.

Phương pháp: Lactobacillus được phân lập bằng môi trường MRS có bổ sung CaCO₃ để phát hiện acid lactic. Các đặc tính probiotic được khảo sát theo hướng dẫn của WHO/FAO bao gồm: khả năng sinh enzym ngoại bào, chịu acid, muối mật, và các yếu tố an toàn. Chủng vi khuẩn được định danh bằng khóa phân loại của prokaryote.

Kết quả: Từ 57 chủng phân lập được từ sữa, chúng tôi đã sàng lọc và định danh được 5 chủng thuộc chi Lactobacillus. Trong đó, 5 chủng có khả năng đối kháng với vi khuẩn có hại thường gặp, có khả năng sinh enzym ngoại bào, tỷ lệ sinh L-lactic acid/D-lactic acid cao, có khả năng chịu pH acid dạ dày và muối mật, không sinh hemolysin, nhạy cảm với kháng sinh thử nghiệm.

Kết luận: Chúng tôi đã chọn 5 chủng Lactobacillus đáp ứng các tiêu chí in vitro đối với vi khuẩn dùng làm probiotic theo hướng dẫn của WHO/FAO. Kết quả cũng cho thấy rằng sữa mẹ là một nguồn chứa vi khuẩn có tiềm năng làm probiotic.

Từ khóa: Probiotic, vi khuẩn lactic, Lactobacillus, dung nạp acid/muối mật, sữa mẹ.

ABSTRACT

Background: Probiotic is viable microbe agent that beneficially affects the host possibly by improving the balance of the indigenous microflora. Many probiotic bacteria have been used as alternative treatment of some intestinal diseases such as diarrhoea, irritable bowel syndrome. Although probiotic strains can be isolated from many sources; for human applications the main criteria is being human origin.

Breast milk is an important nutrient source for neonates. Lots of studies showed that this fluid has beneficial effects on the health of neonates. One reason of being

¹Giảng viên Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Mở TP.HCM.

²Khoa Dược, Đại học Y Dược TP.HCM.

beneficial is explaining by the microflora of human breast milk including beneficial lactic acid bacteria.

Objectives: *This work aimed to isolating and screening of potential probiotic properties of lactic acid bacteria strains from breast milk (milk of healthy mothers).*

Methods: *Lactobacillus was isolated by MRS medium supplemented with CaCO_3 to detect lactic acid. Probiotic characteristics were tested according to the guidelines of WHO/ FAO, which include: producing extracellular enzymes, resistance to low pH and bile salts, and safety aspects. Finally, these strains were identified according to Prokaryote – A Handbook on the Biology of Bacteria.*

Results: *From 57 isolated strains from breast milk we selected 5 strains that showed antimicrobial activity against food poisoning bacteria, ability of producing extracellular enzymes and high ratio of L-lactic/D-lactic acid, resistance to low pH and bile salts, nonhemolytic and sensitive to tested antibiotics. The selected strains were identified as species belong to Lactobacillus genus.*

Conclusion: *In this work, 5 Lactobacillus strains have been selected and identified that meet the requirements for in vitro probiotic characteristic and safety tests according to the guidelines of WHO/ FAO. The results also showed that, breast milk is a source of potential probiotic strains.*

Keywords: Probiotics, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, bile resistance, acid tolerance, breast milk.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sữa mẹ là nguồn dinh dưỡng tốt nhất cho trẻ. Trong sữa mẹ rất giàu các yếu tố miễn dịch, các yếu tố giúp hệ vi sinh đường ruột có lợi phát triển vượt trội. Đặc biệt, sữa mẹ giàu prebiotic giúp các vi khuẩn có lợi phát triển. Không những chứa hỗn hợp hoàn hảo các chất đạm, các vitamin và khoáng chất cho nhu cầu phát triển của trẻ. Sữa mẹ còn chứa một lượng lớn các vi khuẩn có lợi như *Bifidobacteria* và *Lactobacillii* [6]. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng, tác động của *Lactobacillaceae* từ sữa mẹ có thể góp phần bảo vệ trẻ sơ sinh, thúc đẩy sự trưởng thành của hệ thống miễn dịch và phòng chống nhiễm trùng [6,12].

Những năm gần đây, việc sử dụng vi khuẩn probiotic như chất thay thế kháng sinh trong thực phẩm đang rất được quan tâm. Một trong những vi khuẩn được sử dụng rộng rãi nhất làm probiotic là *Lactobacillaceae* mà chúng ta có thể thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như phân su em bé, tuyền sữa người mẹ, hạt kefir

và trên các loại thực phẩm lên men truyền thống. Sự thích nghi tự nhiên của nhiều vi khuẩn lactic đối với môi trường ruột và những chất kháng khuẩn do chúng tạo ra như acid hữu cơ và bacteriocin đã cho vi khuẩn lactic một thuận lợi cạnh tranh so với những vi sinh vật khác khi được dùng làm probiotic.

Tại Việt Nam đang lưu hành một số chế phẩm probiotic, thành phần vi khuẩn trong đó là chủ yếu *Bacillus* và *Lactobacillus*, nhưng nguồn nguyên liệu hoàn toàn ngoại nhập, ngoại trừ vài sản phẩm trong nước chứa *Bacillus* có đặc tính chưa được chứng minh. Để góp phần xây dựng một bộ sưu tập những chủng vi khuẩn lactic có những hoạt tính tốt, chúng tôi tiến hành phân lập và sàng lọc và đánh giá tiềm năng probiotic của các chủng đã phân lập. Nghiên cứu góp phần vào nỗ lực tự tạo các chế phẩm probiotic có chứa *Lactobacillus* hoàn toàn của Việt Nam, với các dữ liệu khoa học được chứng minh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn nghiên cứu được thu nhận từ 100 mẫu sữa mẹ từ Bệnh viện Phụ sản Từ Dũ và Hùng Vương.

Chủng vi khuẩn thử nghiệm khả năng đối kháng: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus* tiêu huyết β nhóm A.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn lactic

Pha loãng mẫu trong đệm PBS (phosphate buffered saline) với độ pha loãng 10^{-1} đến 10^{-3} . Hút 100 μ L dung dịch ở mỗi độ pha loãng lên đĩa thạch MRSA bổ sung CaCO_3 và trái đều. Ủ ở 35°C trong 24 đến 48 giờ/5% CO_2 . Quan sát các khóm khuẩn trên môi trường, chọn những khuẩn lạc có vòng tan CaCO_3 xung quanh, tiến hành tạo chủng thuần qua nhiều lần phân lập tiếp. Tiến hành khảo sát đại thể, vi thể, catalase, oxidase, định tính acid lactic. Giống thu được nuôi trên môi trường MRS dịch thể và giữ giống trên môi trường MRS bổ sung 20% glycerol, bảo quản ở -20°C [1].

Phương pháp thử khả năng sinh enzym ngoại bào

Thử nghiệm khả năng sinh một số loại enzym như: protease (caseinase, gelatinase), amylase, lipase.

Chuẩn bị môi trường TSA có bổ sung chất cảm ứng thích hợp. Hoạt hóa các chủng vi khuẩn cần thử nghiệm. Chấm khoảng 10 μ L dịch khuẩn lên đĩa TSA, ủ 37°C / 48 giờ/ 5% CO_2 . Đọc kết quả bằng các thuốc thử Lugol (amylase), thuốc thử TCA (gelatinase), quan sát các vòng đục và vòng trong xung quanh khóm (lipase và caseinase) [3, 7].

Phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn

Chuẩn bị dịch vi khuẩn chỉ thị có nồng độ $1-2 \times 10^8$ tế bào/mL. Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm được nuôi và nhân giống trên môi trường MRS, ủ 37°C , 5% CO_2 sau 48 giờ. Để tách chiết bacteriocin thô ta tiến hành ly tâm 13000 vòng/phút, 20 phút, ở 4°C . Dịch nổi thu được điều chỉnh về pH 7 bằng NaOH 1M. Sau đó được tủa bằng dung dịch ammonium sulphate (40% bão hòa). Khuấy dung dịch trong 2h/ ở 4°C , sau đó ly tâm 20000 vòng/phút, 1h, ở 4°C . Chất tủa được huyền phù lại vào 25mL dung dịch đệm potassium phosphate (pH= 7).

Dịch khuẩn chỉ thị được trải trên môi trường MHA và đục những giếng có đường kính 6mm. Nhỏ 50 μ L dịch nổi đã chuẩn bị vào mỗi giếng và ủ ở 4°C trong 30 phút để các chất lỏng khuếch tán dễ dàng trong thạch. Cuối cùng các đĩa được ủ ở từng điều kiện phù hợp cho từng vi khuẩn chỉ thị. Khả năng kháng khuẩn của dịch bacteriocin thô được xác định bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn quanh mỗi giếng [2, 5].

Định lượng D/L- lactic acid

Định lượng khả năng tạo D/L -lactic acid của từng chủng lactic bằng bộ Kit phát hiện và định lượng D/L-lactic acid của hãng Megazyme [8].

Khảo sát khả năng chịu pH thấp và muối mật

- *Thử nghiệm pH*: Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa. Ly tâm 5000 vòng/ 10 phút ở 4°C , thu cần và huyền phù lại trong PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4 tạo thành huyền dịch có độ đục McFarland 0.5 tương đương 10^8 CFU/mL. Chuyển huyền dịch vi khuẩn vào bình nón chứa nước muối sinh lý và chỉnh pH có giá trị lần lượt là: 1,5; 2; 2,5. Ủ ở 37°C , 5 % CO_2 . Ở mỗi thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ lấy 1mL dung dịch mẫu thử trung hòa về

pH = 7. Tiến hành pha loãng đến mật độ thích hợp đếm được trong dung dịch đệm và trải trên hộp thạch MRS agar. Ủ ở 37°C, 5 % CO₂, trong 24 – 48 giờ. Đếm khóm và tính số đơn vị sống của vi khuẩn khảo sát. Mỗi thử nghiệm tiến hành 3 lần [4, 5].

- *Thử nghiệm muối mật*: Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường MRS, ủ qua đêm khoảng 18 - 24 giờ. Vi khuẩn được pha loãng đến độ đục McFarland 0.5 tương đương 10⁸ CFU/mL như trên. Lấy 1mL dịch vi khuẩn ly tâm, cho tiếp xúc với dịch muối mật với các nồng độ lần lượt 0,3%, 1,5%, 2% trong 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ. Sau đó ly tâm rửa sạch dịch mật. Tiến hành pha loãng đến mật độ thích hợp đếm được trong dung dịch đệm và trải trên hộp thạch MRS agar. Ủ ở 37°C, 5 % CO₂, trong 24 - 48 giờ. Đếm khóm và tính số đơn vị sống của vi khuẩn khảo sát. Mỗi thử nghiệm tiến hành 3 lần [4, 9].

Phần trăm sống sót được tính: Ni/Nx × 100, Ni = log CFU/mL sau thời gian nuôi cấy, Nx = log CFU/ mL thời gian 0 giờ.

Phương pháp thử khả năng huyết giải

Hoạt hóa các chủng vi khuẩn cần thử nghiệm. Dùng que cấy vòng lấy vi khuẩn cấy lên môi trường thạch máu BA bổ sung 5% máu cừu, song song tiến hành với vi khuẩn đối chứng không dung huyết. Ủ 37°C/5 % CO₂ /24 giờ [5].

Phương pháp thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh

Xác định MIC bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong canh lỏng theo CLSI, 2006. Các kháng sinh được sử dụng bao gồm Penicillin, Ampicillin, Imipenem,

Gentamycin, Vancomycin, Erythromycin, Clindamycin. Pha loãng kháng sinh vào trong môi trường MHB để đạt dãy nồng độ 128, 64, 32, 16,...0,0625μg/mL cho vào các giếng của phiến 96 giếng 50 μL, cùng với 50 μL huyền dịch vi khuẩn có nồng độ 10⁶ CFU/mL. Ủ 37°C/ 16-18 giờ và đọc kết quả [5, 10].

Phương pháp định danh vi khuẩn

Các chủng chọn lọc được định danh bằng phương pháp sinh hóa theo khóa phân loại The Prokaryote - A Handbook on the Biology of Bacteria [11].

Phương pháp xử lý số liệu

Các thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và khả năng chịu pH thấp và chịu muối mật được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý thống kê ANOVA bằng phần mềm Excel.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

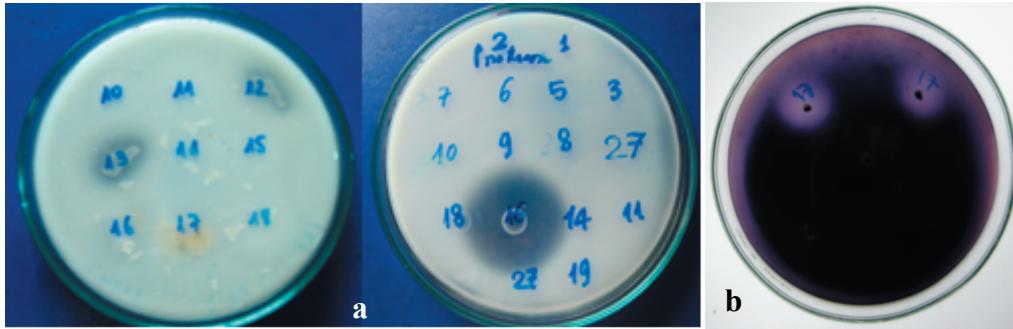
Kết quả phân lập *Lactobacillus*

Từ các mẫu sữa mẹ được thu nhận từ các Bệnh viện phụ sản TP.HCM, đã phân lập được 57 chủng được ký hiệu theo nguồn gốc mẫu. Chọn lọc được 13 chủng có dạng trực khuẩn, không sinh bào tử, catalase âm, oxidase âm, sinh acid lactic.

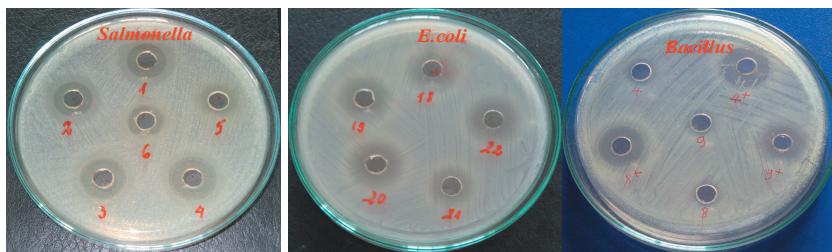
Kết quả sinh enzyme và hoạt tính kháng khuẩn

Từ 13 chủng thu được chúng tôi thử nghiệm khả năng sinh enzyme (hình 1) và hoạt tính kháng khuẩn (hình 2), với hai tiêu chí đối kháng tối thiểu 4 vi khuẩn gây bệnh trở lên hoặc đối kháng tối thiểu 4 vi khuẩn gây bệnh trở lên và sinh tối thiểu 2 trong 4 loại enzyme, chọn được 6 chủng thỏa mãn điều kiện trên (S1, S2, S3, S6, S7, S8).

Hình 1. Thử nghiệm khả năng sinh enzyme ngoại bào
a: protease; b: amylase



Hình 2. Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn



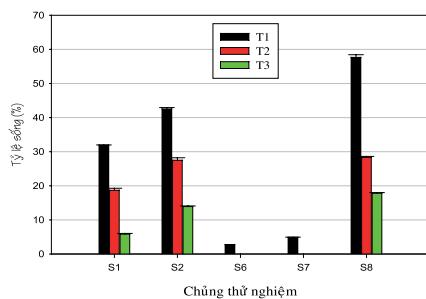
Kết quả định lượng D/L - lactic acid

Từ 6 chủng đã sàng lọc được ở bước trên, sử dụng bộ kit định lượng, chúng tôi chọn được 5 chủng có tỷ lệ L/D lớn hơn 0,9.

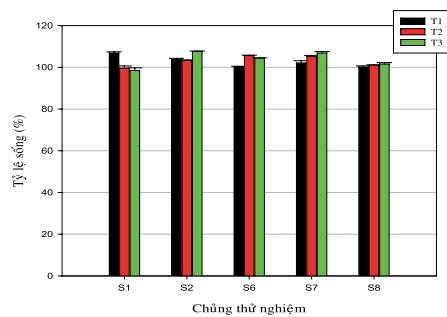
Kết quả khảo sát khả năng chịu pH thấp và muối mật

5 chủng được chọn lọc tiếp tục được khảo sát khả năng chịu được pH thấp, chúng tôi tiến hành thử nghiệm các chủng trên ở ba mức pH 1,5; 2 và 2,5 và muối mật ở các nồng độ 0,3%; 1,5%; 2% trong khoảng thời gian từ 1 giờ đến 3 giờ.

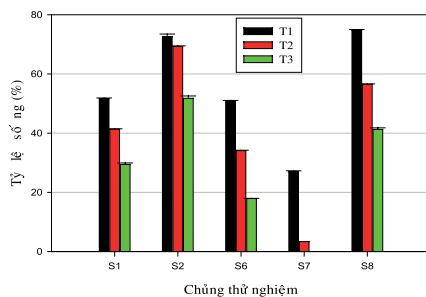
Tỷ lệ sống của các chủng ở pH 1,5



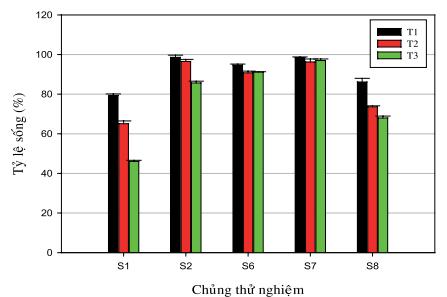
Tỷ lệ sống của các chủng ở muối mật 0,3%

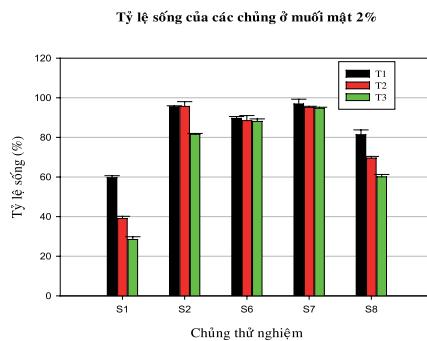
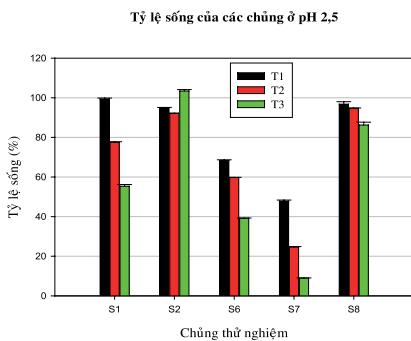


Tỷ lệ sống của các chủng ở pH 2



Tỷ lệ sống của các chủng ở muối mật 1,5%





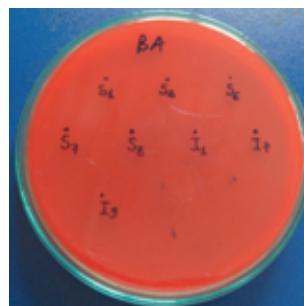
Biểu đồ 1. Tỷ lệ sống của các chủng thử nghiệm theo thời gian 1, 2 và 3 giờ ở pH 1,5; 2; 2,5 và muối mật ở các nồng độ 0,3%; 1,5%; 2%.

Dựa vào biểu đồ 1, cho thấy trong 5 chủng thử nghiệm chịu đựng acid và muối mật, ta thấy ở pH 2,5, các chủng có tỷ lệ sống $\geq 60\%$ sau 2 giờ, đặc biệt chủng S2 có khả năng tồn tại và phát triển được trong điều kiện này. Ở nồng độ muối mật 0,3% sau 3 giờ hầu hết các chủng có tỷ lệ sống cao trên 90%, một số chủng vẫn còn có khả năng tăng trưởng.

Kết quả thử nghiệm khả năng huyết giải

Theo WHO/FAO thử nghiệm hemolysin là một bước sàng lọc tính gây bệnh của các chủng để đảm bảo tính an toàn của probiotic. 5 chủng thử nghiệm không có enzym hemolysin (không có khả năng tiêu huyết) (hình 3), các chủng này tiếp tục được thử nghiệm khả năng đề kháng kháng sinh.

Hình 3. Kết quả không tiêu huyết trên thạch máu BA của các chủng thử nghiệm



Kết quả thử nghiệm khả năng đề kháng kháng sinh

Đây cũng là bước đánh giá tính an toàn của các chủng tuyển chọn làm probiotic, chúng tôi khảo sát khả năng nhạy cảm với kháng sinh bằng phương pháp pha loãng 5 chủng được khảo sát, đọc kết quả sau 20-24h/37°C và được biện giải theo MIC Breakpoint áp dụng cho *Lactobacillus* theo CLSI (2006). Trong 5 chủng khảo sát tất cả các chủng (S1, S2, S6, S7, S8) vẫn còn nhạy cảm với các kháng sinh thử nghiệm.

Kết quả định danh bằng sinh hóa

Bảng 1. Kết quả định danh nhóm vi khuẩn lactic lên men đồng hình group A

Chủng	Test sinh hóa	Peptidoglycan type	Lactic acid isomer	Tăng trưởng 15/45°C	NH3 từ Arginin	Amygdalin	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melibiose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Trehalose	Hệ số tương đồng %	Định danh
S1		Lys-DAsp	DL	-/+	-	+	+	+	d	d	-	+	d	d	+	+	d	100	<i>L. gasseri</i>
S2		Lys-DAsp	DL	-/+	-	+	+	+	d	d	-	+	d	d	+	+	d	100	<i>L. gasseri</i>
S7		Lys-DAsp	DL	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	d	d	+	+	d	100	<i>L. acidophilus</i>
S8		Lys-DAsp	L	-/+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	100	<i>L. salivarius subsp. salivarius</i>

Bảng 2. Kết quả định danh nhóm vi khuẩn lactic lên men dị hình không bắt buộc group B

Chủng	Test sinh hóa	Peptidoglycan type	Lactic acid isomer	Tăng trưởng 15/45°C	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Glucamate	Mannitol	Melzitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose	Hệ số tương đồng %	Định danh
S6	Lys-DAsp	L	++	+	d	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	100	<i>L.rhamnosus</i>	

Dựa trên bảng 1 và bảng 2, cho thấy 5 chủng trên cho kết quả sinh hóa phù hợp với 4 loài *Lactobacillus*: *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. salivarius subsp. salivarius*, *L. rhamnosus*.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã chọn 5 chủng *Lactobacillus* đáp ứng các tiêu chí *in vitro* đối với vi khuẩn dùng làm probiotic theo hướng dẫn của WHO/FAO.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Lâm Dũng. (1983). Thực tập Vi sinh vật học. NXB Đại học & Trung học chuyên nghiệp, Hà Nội.
- [2]. Buntin N., Chanthachum S., Hongpattarakere T. (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotic. Songklanakarin J. Sci. Technol 30: 141-148.
- [3]. Cabo M.L et al. (1999). A method for bacteriocins quantification. Journal of applied microbiology 87: 907-914.
- [4]. Cukrowska B., Motyl I., Kozáková H., Schwarzer M., Górecki R. K., Klewicka E., Śliżewska K., Libudzisz Z. (2009). Probiotic *Lactobacillus* Strains: *in vitro* and *in vivo* Studies Folia Microbiol. 54(6): 533-537.
- [5]. Dunne C., Liam O'M. et al. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. American Society for Clinical Nutrition 73: 386-392.
- [6]. Federico L.V., Mo'nica O. et al. (2007), Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. British Journal of Nutrition, 98, Suppl. 1, S96-S100.
- [7]. John R. Tagg., Adnan S. Dajani., Lewis W. Wannamaker. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. American Society for Microbiology 3: 722-726.
- [8]. Livia Alm. (1982). Effect of Fermentation on L(+) and D(-) Lactic Acid in Milk. Journal of Dairy Science 65: 515-520.
- [9]. Mourad K., Nour-Eddine K. (2006). *In vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. International Journal of Probiotics and Prebiotics 1: 27-32.
- [10]. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. (2006). M45-A 26, 19: 24-25.
- [11]. Martin D., Stanley F., et al. (2006). The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer 3: 320 - 372.
- [12]. Rocío M., Mónica O. et al. (2005), Probiotic potential of 3 *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. Journal of human lactation official journal of International Lactation Consultant Association. 21(1): 8-17