

ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH CHIẾT LAN GẮM (*Anoectochilus formosanus* Hayata) TỚI KHẢ NĂNG SỐNG CỦA *Bifidobacterium bifidum* TRONG ĐIỀU KIỆN DẠ DÀY VÀ MUỐI MẬT NHÂN TẠO

Đoàn Trung Nam¹, Nguyễn Thị Thùy Linh¹, Nguyễn Thị Hoa¹, Trần Thị Phương¹, Cao Kinh Luân¹, Đặng Thị Kim Thúy², Liêu Mỹ Đông^{1*}

¹ Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

² Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, vai trò của dịch chiết lan gắm (0,5%; 1% và 1,5% (v/v)) tới khả năng sống sót của vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum* vi bao trong calcium-alginate được đánh giá thông qua các khảo sát hiệu suất vi bao và khả năng sống sót trong điều kiện dạ dày (SGF) và muối mật nhân tạo (SIF). Kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu suất vi bao vi khuẩn *B. bifidum* từ 93,11% đến 97,35% khi thay đổi nồng độ alginate từ 2% lên 3% (w/v) trong khi dịch chiết lan gắm không ảnh hưởng tới hiệu suất vi bao. Ở các mẫu không vi bao cho thấy, *B. bifidum* bị ảnh hưởng đáng kể bởi điều kiện pH thấp với khả năng sống sót không được ghi nhận sau 2 giờ ủ, trong khi đó ở điều kiện SIF tỉ lệ sống sót đạt 83,23%. Quá trình vi bao đã giúp cải thiện đáng kể khả năng sống của *B. bifidum* với khả năng sống sót đạt từ 71,91% tới 87,89% trong điều kiện SGF và 97,16% tới 98% trong điều kiện SIF. Dịch chiết lan gắm bổ sung vào quá trình vi bao đã nâng cao đáng kể khả năng sống sót của *B. bifidum* trong điều kiện dịch ruột và không có sự khác biệt so với mẫu bổ sung prebiotic Fructooligosaccharide (1% (w/v)). Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng hỗn hợp chất mang này trong các sản phẩm thực phẩm bổ sung vi khuẩn probiotic.

Từ khóa: Alginate, *Bifidobacterium bifidum*, lan gắm, dịch ruột nhân tạo.

MỞ ĐẦU

Các thực phẩm bổ sung vi khuẩn probiotic đang nhận được rất nhiều quan tâm nhờ những lợi ích sức khỏe mà chúng mang lại. Lợi ích đầu tiên khi sử dụng các sản phẩm chứa probiotic là chúng giúp kéo dài thời gian bảo quản và bảo vệ thực phẩm. Trong quá trình tồn tại, các chủng probiotic sẽ sản sinh ra các hợp chất kháng khuẩn như acid lactic, hydrogen peroxide, các loại bacterocin và làm giảm pH của sản phẩm tạo điều kiện thuận lợi để ức chế các vi sinh vật gây hại (Parvez *et al.*, 2006). Tuy nhiên, khả năng sống sót của các chủng vi khuẩn này trong điều kiện bảo quản và đặc biệt là điều kiện dạ dày và muối mật khiến cho các tác dụng có lợi do những chủng vi khuẩn này mang lại không đạt được hiệu quả cao. Điều này đòi hỏi một kỹ thuật khác nhằm duy trì mật độ vi sinh vật mà trong đó kĩ thuật vi bao đang nhận được nhiều quan tâm (Rokka, Rantamäki, 2010). Kĩ thuật vi bao giúp bảo vệ vi khuẩn probiotic khỏi điều kiện bất lợi trong quá trình chế biến, bảo quản và trong điều kiện dịch tiêu hóa (Iyer *et al.*, 2005). Bên cạnh đó, việc bổ sung thêm các prebiotic đã được chứng minh cải thiện đáng kể khả năng sống sót của vi khuẩn probiotic trong môi trường dịch tiêu hóa. Prebiotic là những carbohydrate mạch ngắn không được hấp thụ trong cơ thể con người nhưng lại là nguồn cơ chất cho vi khuẩn probiotic khi đến đại tràng (Michael, Schrezenmeir, 2008). Điều này giúp tăng khả năng sinh trưởng và nhân đôi của chủng vi sinh vật này nhờ vào các tác động động cộng sinh của chúng khi chúng phải đi qua hệ tiêu hóa của con người. Bên cạnh các thực phẩm bổ sung probiotic, các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học từ thực vật cũng đang nhận được rất nhiều sự quan tâm hiện nay. Cây lan gắm là một trong những loại dược liệu có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học đã được chứng minh có khả năng bảo vệ gan, ngăn chặn ung thư, bệnh tiểu đường và dùng cho việc chữa trị bệnh tim... (Wang *et al.*, 2002). Tuy nhiên, các nghiên cứu đánh giá vai trò prebiotic của dịch chiết từ lan gắm vẫn chưa được công bố đầy đủ. Việc kết hợp dịch chiết từ lan gắm với vai trò của prebiotic vào trong quá trình tạo chế phẩm vi bao có thể giúp cải thiện khả năng sống của vi khuẩn probiotic trong điều kiện bất lợi. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá vai trò của dịch chiết từ lan gắm trong việc nâng cao khả năng sống sót của vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum* AS 1.1886 trong điều kiện dịch ruột nhân tạo được đánh giá. Các khảo sát bao gồm ảnh hưởng của dịch chiết tới hiệu suất vi bao, khả năng sống sót trong điều kiện dạ dày và muối mật nhân tạo.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Giống vi khuẩn: *Bifidobacterium bifidum* (VTCC, có nguồn gốc AS 1.1886) được nhân giống trên môi trường MRS ở 37°C sau 24 giờ nuôi cấy được thu nhận bằng phương pháp ly tâm và rửa hai lần bằng nước muối sinh lý và thu nhận dưới cùng điều kiện ly tâm.

Lan gấm được rửa bằng nước muối 0,9% (w/v) và để ráo. Sau đó, cân $20 \pm 0,01$ g lan gấm và xay nhuyễn, định mức bằng nước cất vô trùng lên 100 mL và chuẩn bị thí nghiệm.

Quá trình tạo chế phẩm vi bao

Kỹ thuật nén đùn được sử dụng để vi bao hạt thực hiện theo các bước sau: 5 mL sinh khối đã chuẩn bị được cho vào 20 mL dung dịch alginate 2,5% (w/v) có hoặc không có bổ sung dịch chiết lan gấm (0,5%; 1%, và 1,5% (v/v)). Hỗn hợp dung dịch sẽ được khuấy trộn bằng máy khuấy từ trong 15 phút. Dùng kim tiêm dung tích 5 mL để hút hỗn hợp, các hạt được tạo thành qua lỗ kim sẽ cho vào dung dịch $CaCl_2$ 0,1 M. Để yên trong 30 phút để quá trình hình thành hạt được diễn ra hoàn toàn. Hạt vi bao sẽ được lọc gạn và rửa qua nước cất vô trùng trước khi sử dụng. Chế phẩm bổ sung prebiotic FOS (Fructooligosaccharide) 1% (w/v) trong quá trình vi bao (không bổ sung dịch chiết lan gấm) được sử dụng để đánh giá hiệu quả kết hợp với prebiotic. Hiệu suất vi bao được tính dựa theo công thức sau:

$$\text{Hiệu suất vi bao (\%)} = \frac{\sum \log CFU_{\text{trong chế phẩm}}}{\sum \log CFU_{\text{Ban đầu}}} \times 100\%$$

Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết lan gấm tới khả năng sống của vi khuẩn probiotic trong điều kiện dạ dày và muối mật nhân tạo

Môi trường dạ dày (SGF: simulated gastric fluid) bao gồm 9 g/L NaCl + 3 g/L pepsin điều chỉnh đến pH 2 bằng HCl 5 M và muối mật nhân tạo (SIF: simulated intestinal fluid) bao gồm 9 g/L NaCl + 3 mL/L mật bò điều chỉnh đến pH 6,5 bằng NaOH 5 M. Chế phẩm vi gói (1 gram) được ủ trong 9 mL môi trường SGF (pH 2) ở 37°C trong 2 giờ và 4 giờ trong môi trường SIF. Dịch sau quá trình ủ sẽ được phá mẫu và kiểm tra khả năng sống của vi khuẩn probiotic. Mẫu tế bào tự do không vi bao được sử dụng như đối chứng. Tỷ lệ sống sót của vi khuẩn được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (\%)} = \frac{\sum \log CFU_{\text{sau khi ủ}}}{\sum \log CFU_{\text{trước khi ủ}}} \times 100\%$$

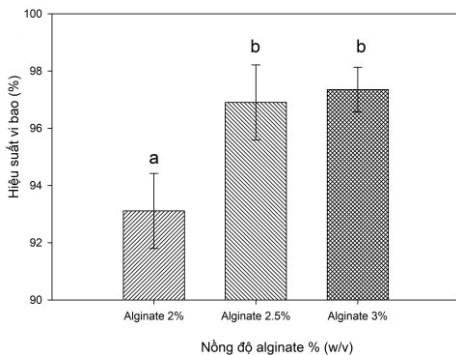
Xử lý thống kê

Các nghiệm thức được lặp lại ba lần để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình \pm giá trị sai số. Đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp thống kê ANOVA kiểm định Tukey HSD với $\alpha = 0,05$ trên phần mềm Statgraphics XV, tính toán và thể hiện đồ thị trên phần mềm Sigmaplot 11.

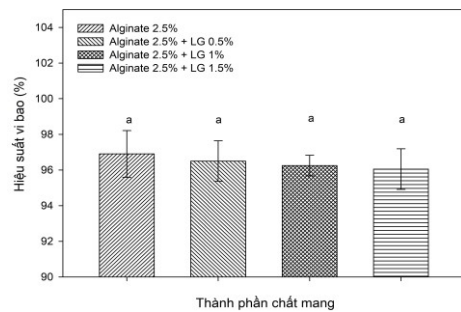
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ chất mang và dịch chiết lan gấm tới hiệu suất vi bao vi khuẩn *B. bifidum*

Ảnh hưởng của nồng độ alginate tới hiệu suất vi bao được trình bày ở Hình 1 cho thấy có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về hiệu suất vi bao khi gia tăng nồng độ alginate từ 2% lên 2,5%. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi tiếp tục gia tăng nồng độ alginate (từ 2,5% lên 3%) thì sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Điều này cho thấy nồng độ alginate 2,5% (w/v) cho hiệu suất vi bao cao và hiệu quả về mặt kinh tế. Hình 2 trình bày ảnh hưởng của dịch chiết lan gấm tới hiệu suất vi bao. Kết quả thu được cho thấy, hiệu suất vi bao có xu hướng giảm nhẹ khi gia tăng nồng độ của dịch chiết lan gấm. Tuy nhiên, sự khác biệt này là không có ý nghĩa ($p > 0,05$) ở tất cả các mẫu khảo sát.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ alginate tới hiệu suất vi bao *B. bifidum*

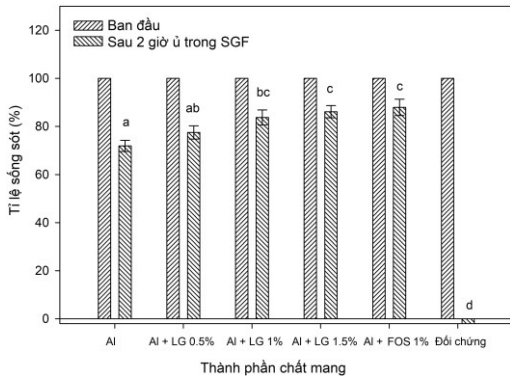


Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết lan gấm (LG) tới hiệu suất vi bao vi khuẩn *B. bifidum*

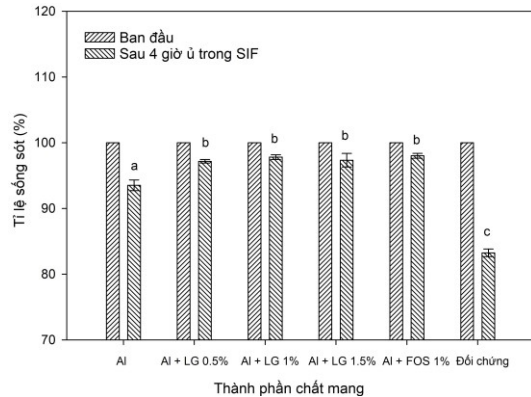
Lựa chọn chất mang cho quá trình vi bao là một trong những bước quan trọng vì nó tác động trực tiếp đến hiệu suất vi bao và sự ổn định của vỏ vi bao (Estevinho *et al.*, 2013). Alginate chứa nhóm các polymer không đồng nhất với đa dạng chức năng và là chất mang lý tưởng thường được sử dụng trong vi bao vi khuẩn probiotic (Kailasapathy, 2002). Bên cạnh đó, nồng độ chất mang vi bao có ảnh hưởng đáng kể tới hiệu suất vi bao đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu của Sheu và đồng tác giả (1993) cho thấy alginate ở nồng độ cao sẽ mang lại cấu trúc mịn trên vỏ hạt chế phẩm. Điều này giúp tăng hiệu quả vi bao vi khuẩn probiotic. Tương tự, nghiên cứu của Chen và đồng tác giả (2005) cũng cho thấy nồng độ alginate cao (3%) sẽ tác động đến cấu trúc vi bao; nồng độ càng cao thì bề mặt hạt vi bao càng mịn và ngược lại, bề mặt nhám, xù xì với các lỗ lớn lại được tìm thấy ở vi bao có nồng độ thấp hơn. Do vậy sự rò rỉ tế bào ra khỏi vi bao được giảm tối đa. Điều này đúng với kết quả thực nghiệm khi hiệu suất vi bao của alginate 2,5% (w/v) là 96,9%; cao hơn đáng kể so với nồng độ 2% (w/v) với 93,11% tế bào được vi bao (Hình 1).

Ảnh hưởng của dịch chiết lan gấm tới khả năng sống sót của vi khuẩn *B. bifidum* trong điều kiện dịch ruột nhân tạo

Ảnh hưởng của dịch chiết lan gấm và prebiotic FOS lên khả năng sống *B. bifidum* trong điều kiện SGF và SIF được trình bày ở Hình 3 và 4. Kết quả khảo sát cho thấy, mật độ vi khuẩn *B. bifidum* bị tác động đáng kể bởi điều kiện dịch ruột nhân tạo, trong đó không tế bào *B. bifidum* sống sót được ghi nhận sau 2 giờ ủ trong SGF (Hình 3) trong khi vẫn còn 83,23% tế bào *B. bifidum* sống sót sau 4 giờ ủ trong điều kiện SIF (Hình 4). Ở các mẫu vi bao cho thấy, khả năng sống sót của vi khuẩn *B. bifidum* đã được cải thiện đáng kể với 71,91% và 93,52% tế bào sống sót sau 2 giờ ủ trong điều kiện SGF (Hình 3) và 4 giờ trong điều kiện SIF (Hình 4) tương ứng. Ở các mẫu bổ sung prebiotic FOS và dịch chiết lan gấm vào quá trình vi bao cho thấy tỉ lệ sống của *B. bifidum* cải thiện đáng kể so với mẫu không bổ sung (Hình 3 và 4). Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả prebiotic FOS và dịch chiết lan gấm đều giúp cải thiện đáng kể khả năng sống của vi khuẩn *B. bifidum* trong điều kiện dịch ruột nhân tạo và không có sự khác biệt giữa nồng độ FOS (1% (w/v)) và dịch chiết lan gấm 1% (v/v) (Hình 3 và 4).



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch chiết lan gấm tới khả năng sống của *B. bifidum* trong điều kiện SGF. AI: alginate 2,5% w/v; LG: lan gấm; FOS: Fructooligosaccharide



Hình 4. Ảnh hưởng của dịch chiết lan gấm tới khả năng sống của *B. bifidum* trong điều kiện SIF. AI: alginate 2,5% w/v; LG: lan gấm; FOS: Fructooligosaccharide

Ngoài thành phần chất mang được xem có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ vi khuẩn probiotic thì các thành phần bổ sung trong quá trình vi bao như prebiotic cũng đã được chứng minh nâng cao hiệu quả bảo vệ vi khuẩn probiotic (Corona-Hernandez *et al.*, 2013). Prebiotic sau khi được lên men sẽ tác động đến các thành phần có trong các vi sinh vật này thành các hợp chất cấu trúc có lợi (Yang *et al.*, 2013). Iyer và Kailasapathy (2005) cho rằng ở các probiotic có cơ chế trao đổi cơ chất đặc biệt hiệu quả đối với các prebiotic hơn là các đường đơn. Oligosaccharide được công nhận là một loại prebiotic quan trọng vì chúng góp phần cải thiện môi trường ở đường ruột, kích thích quá trình hấp thu khoáng chất ở ruột, điều này giúp ổn định hệ vi sinh vật đường ruột (Gupta, Abu-Ghannam, 2012). Prebiotic FOS, một dạng Oligosaccharide đã được chứng minh nâng cao đáng kể khả năng sống của các chủng probiotic như *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* và *Bifidobacterium longum* khi vi gói trong calcium-alginate so với không bổ sung (Kun-Nan *et al.*, 2005). Một nghiên cứu khác được Ann và đồng tác giả (2006) cho thấy khả năng sống sót của *L. acidophilus* sau 5 giờ ủ trong môi trường SGF được cải thiện đáng kể ở mẫu có bổ sung FOS so với mẫu đối chứng (Ann *et al.*, 2007). Tương tự như FOS, vai trò của các prebiotic từ thực vật đang nhận được nhiều quan tâm. Yang và đồng tác giả (2012) chỉ ra rằng những hợp chất polysaccharides khó tiêu hóa trong dịch chiết lan gấm được trích ly bằng nước hoàn toàn thể hiện tính chất của một prebiotic. Kết quả thu được từ nghiên cứu này cho thấy, lan gấm đã cải thiện đáng kể khả năng sống sót của *B. bifidum* trong cả điều kiện SGF và SIF (Hình 3 và 4). Nghiên cứu này

cũng chỉ ra rằng, khả năng sống của *B. bifidum* vi bao trong calcium-alginate bổ sung dịch chiết lan gấm không có sự khác biệt so với mẫu bổ sung prebiotic FOS (Hình 3 và 4). Việc bổ dịch chiết lan gấm vào quá trình vi bao không những không ảnh hưởng đến hiệu suất vi bao mà còn cải thiện đáng kể khả năng sống của *B. bifidum* trong điều kiện dịch ruột nhân tạo.

KẾT LUẬN

Kết quả thu được từ nghiên cứu cho thấy, nồng độ chất mang ảnh hưởng đáng kể tới hiệu suất vi bao trong khi hàm lượng dịch chiết lan gấm trong khảo sát không ảnh hưởng đến hiệu suất vi bao. Vi khuẩn *B. bifidum* nhạy cảm với điều kiện SGF và không có tế bào sống sót được ghi nhận trong thí nghiệm này so với 83,23% tế bào sống sót được ghi nhận ở điều kiện SIF. Khả năng sống của *B. bifidum* đã được cải thiện đáng kể khi được vi bao trong calcium-alginate. Dịch chiết lan gấm bổ sung vào quá trình vi bao đã nâng cao đáng kể khả năng sống sót của *B. bifidum* trong điều kiện dịch ruột nhân tạo. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng hỗn hợp chất mang này trong các sản phẩm thực phẩm bổ sung probiotic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ann EY, Kim Y, Oh S, Imm JY, Park DJ, Han KS, Kim SH (2007). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *Int J Food Sci Technol* 42(4): 411-419.
- Chen KN, Chen MJ, Liu JR, Lin CW, Chiu HY (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *J Food Sci* 70: 260-266.
- Corona-Hernandez RI, Álvarez-Parrilla E, Lizardi-Mendoza J, Islas-Rubio AR, de la Rosa LA, Wall-Medrano A (2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety* 12(6): 614-628.
- Estevinho BN, Rocha F, Santos L, Alves A (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications-A review. *Trend Food Sci Technol* 31(2): 138-155.
- Gupta S, Abu-Ghannam N (2012). Probiotic fermentation of plant-based products: possibilities and opportunities. *Crit Rev Food Sci Nut* 52(2): 183-199.
- Iyer C, Kailasapathy K (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. *J Food Sci* 70: 18-23.
- Kailasapathy K (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr Iss Intest Microbiol* 3(2): 39-48.
- Kun-Nan C, Ming-Ju C, Je-Ruei L, Chin-Wen L, Hsin-Yi C (2005). Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *J Food Sci* 70: 260-266.
- Michael dV, Schrezenmeir J (2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 111: p1-66.
- Parvez S, Malik KA, Ah-Kang S, Kim HY (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 100(6): 1171-1185.
- Sheu TY, Marshall RT, Heymann H (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *J Dairy Sci* 76: 1902-1907.
- Rokka S, Rantamäki P (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol* 231(1): 1-12.
- Yang LC, Lin WC, Lu, TJ (2012). Characterization and prebiotic activity of aqueous extract and indigestible polysaccharide from *Anoectochilus formosanus*. *J Agr Food Chem* 60(35): 8590-8599.
- Yang LC, Lu TJ, Lin WC (2013). The prebiotic arabinogalactan of *Anoectochilus formosanus* prevents ovariectomy-induced osteoporosis in mice. *J Funct Food* 5(4): 1642-1653.
- Wang SY, Kuo YH, Chang HN, Kang PL, Tsay HS, Lin KF, Yang NS, Shyr LF (2002). Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J Agr Food Chem* 50: 1859-1865.

THE EFFECT OF *Anoectochilus formosanus* HAYATA EXTRACTED FLUID ON *Bifidobacterium bifidum* VIABILITY IN SIMULATED GASTRIC DIGESTION

Doan Trung Nam¹, Nguyen Thi Thuy Linh¹, Nguyen Thi Hoa¹, Tran Thi Phuong¹, Cao Kinh Luan¹, Dang Thi Kim Thuy², Lieu My Dong^{1*}

¹ Faculty of Food Science and Technology, Ho Chi Minh City University of Food Industry

² Department of Plant Cell Technology, Institute of Tropical Biology Viet Nam

SUMMARY

In this study, the effect of *Anoectochilus formosanus* Hayata (0.5%; 1%, and 1.5% (v/v)) on *Bifidobacterium bifidum* encapsulating in calcium-alginate was evaluated through encapsulated yield, and survival rate in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF). The results showed that the encapsulated yield was 93.11% to 97.35% when increasing the alginate concentration 2% to 3% (w/v), and was not affected by *A. formosanus* extract fluid. In the free cell samples indicated that there was no survival cell of *B. bifidum* was recorded after 2 hours of incubation in the SGF condition, whereas the survival rate was 83.23% after 4 hours incubated in the SIF condition. The encapsulation process improved the *B. bifidum* viability with 71.91% to 87.89% in the SGF condition and 97.16% to 98% in the SIF condition. Adding *A. formosanus* into the encapsulation process enhanced the survival rate of *B. bifidum* in simulated gastric digestion, and there was no significant difference compared to the samples added Fructooligosaccharide prebiotic 1% (w/v). The results show the potential for the application of this carrier mixture in probiotic supplemented food products.

Keywords: Alginate, *Bifidobacterium bifidum*, *Anoectochilus formosanus* Hayata, simulated gastric digestion.

* Author for correspondence: Tel: +84989961848; Email: lieudong289@gmail.com