

## ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA *Bifidobacterium bifidum* BFH1 PHÂN LẬP TỪ PHÂN TRỂ SƠ SINH

Nguyễn Hoàng Minh Đức\*, Nguyễn Văn Năm, Nguyễn Thị Thơm, Đào Thị Lương

Công ty Cổ phần Công nghệ Hóa sinh Việt Nam

### TÓM TẮT

Probiotic là các vi sinh vật sống xâm chiếm đường ruột và mang lại những lợi ích cho sức khỏe con người và động vật. Probiotic hoàn toàn khác với các loại vi sinh vật khác ở chỗ chúng được coi là vi sinh vật “tốt” hoặc không gây bệnh ở người khỏe mạnh. Chi *Bifidobacterium* là vi khuẩn chính sống trong ruột của con người và nó có tác dụng tích cực đối với sức khỏe của vật chủ. Từ những lợi ích sức khỏe được công nhận, nó được đưa vào một số loại thực phẩm có mục đích. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là tìm kiếm các đặc tính probiotic tiềm năng của vi khuẩn *Bifidobacterium* bản địa sử dụng trong thực phẩm chức năng. Trong điều kiện *in vitro*, các đặc tính probiotic và khả năng sinh enzyme của chủng vi khuẩn BfH1, phân lập từ phân trẻ sơ sinh đã được đánh giá. Chủng BfH1 được định danh là *Bifidobacterium bifidum* dựa vào phân tích trình tự gene 16S rRNA, là loài được công nhận là an toàn (GRAS). Chủng này mang các đặc tính probiotic và an toàn như: chịu muối mật (0,5%), tồn tại tốt trong điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và ruột mô phỏng, chịu phenol (0,4%), chịu NaCl (8%), có khả năng bám dính vào các tế bào biểu mô ruột, kháng 4 loại vi sinh vật gây bệnh, nhạy cảm với 8/12 kháng sinh thử nghiệm. Ngoài ra, chủng BfH1 còn có khả năng sinh nhiều loại enzyme phân giải các cơ chất giúp chuyển hoá thức ăn trong đường ruột. Chủng *Bifidobacterium bifidum* BfH1 có khả năng tồn tại tốt trong đường tiêu hóa, khả năng kết dính cao và bản chất không độc hại, cho phép nó được sử dụng như probiotic tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng.

Từ khóa: *Bifidobacterium bifidum*, enzyme, *in vitro*, probiotic.

### MỞ ĐẦU

Trong nhiều thế kỷ, probiotic đã được sử dụng rộng rãi trong các loại thực phẩm chức năng khác nhau, ví dụ như sữa chua, sữa, phô mai, sữa bột cho trẻ sơ sinh và thực phẩm bổ sung. Các probiotic phổ biến nhất bao gồm Lactobacilli và Bifidobacteria chủ yếu sống trong đường ruột của động vật hoặc con người (Chen *et al.*, 2021). Bifidobacteria được phân lập từ phân trẻ sơ sinh bú sữa mẹ và nhiều nguồn khác nhau (nước thải, sữa lên men và các nguồn tiêu hóa kỵ khí) và thường gặp nhất có liên quan đến đường tiêu hóa của người và động vật (Chen *et al.*, 2021). Bifidobacteria là các trực khuẩn gram dương, catalase âm tính. Tế bào có nhiều hình dạng khác nhau (tế bào ngắn, đều, mảnh với tế bào đầu nhọn, tế bào dài hơi uốn cong hoặc lồi lên) hoặc phân nhánh nhiều (nhọn, hơi phân nhánh, hình chùy hoặc hình thìa); có nhiều cách sắp xếp khác nhau đơn lẻ hoặc chuỗi, dạng tập hợp giống như ngôi sao hoặc được sắp xếp theo kiểu chữ “V”, chữ “Y” hoặc cách sắp xếp “hàng rào” (Huidrom, Sharma, 2018). Các điều kiện sinh trưởng (nhiệt độ, pH, nồng độ oxy) của Bifidobacteria không khác nhau đáng kể giữa các chủng. Ví dụ, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu từ 36 - 38°C và 41–43°C đối với các chủng phân lập ở người và động vật; độ pH tối ưu là pH 6,5–7,0. Hầu hết các loài Bifidobacteria là vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt (Chen *et al.*, 2021). Bifidobacteria có hàm lượng G+C cao (55-67 mol%) và plasmid hiếm khi được tìm thấy trong tế bào chất (ngoại trừ *B. longum*). Bifidobacteria rất khó tính về mặt dinh dưỡng. Các loài Bifidobacteria có nguồn gốc từ con người có thể sử dụng fructose, galactose và lactose. Chúng là vi khuẩn phân giải đường chính được tìm thấy trong ruột kết của con người và có thể sử dụng các oligosaccharide không tiêu hóa được trong ruột kết để tạo ra acetic acid cũng như lactic acid thông qua con đường phosphoketolase fructose-6-phosphate (Shori, 2022).

Bifidobacteria có một số tác dụng có lợi đối với sức khỏe của vật chủ như điều hòa miễn dịch, loại bỏ các chất gây ung thư, sản xuất vitamin, giảm táo bón, ngăn ngừa tiêu chảy và nhiễm trùng đường ruột. Chúng còn sản xuất các chất chống lại vi khuẩn có hại cho đường ruột và bảo vệ biểu mô niêm mạc chống lại sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh (Huidrom, Sharma, 2018). Ngoài ra, Bifidobacteria còn chuyển hóa một số chất trong thực phẩm thành các hợp chất có hoạt tính sinh học và tăng cường một số chức năng miễn dịch, ví dụ như kích hoạt đại thực bào và tế bào lympho, sản xuất kháng thể, phản ứng phân bào ở lá lách, các mảng Peyer và chức năng của các tế bào tiêu diệt tự nhiên (Shori, 2022).

Ngày nay, thực phẩm bổ sung có chức năng probiotic có xu hướng ngày càng tăng trên thị trường. Trong đó, các loài Bifidobacteria cũng được sử dụng khá phổ biến trong nhiều loại sản phẩm thực phẩm chức năng cũng như các dạng thuốc. Hầu hết các loài Bifidobacteria hiện đang được nghiên cứu và sử dụng đều an toàn, không có tác dụng phụ đối với sức khỏe. Vì vậy, có thể kết luận chắc chắn rằng các loài Bifidobacteria có tiềm năng lớn làm probiotic (Yakoob, Pradeep, 2019).

Ở Việt Nam, có rất ít các nghiên cứu về vi khuẩn *Bifidobacteria* bản địa, (nhất là *Bifidobacterium bifidum*) dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng, thường là dùng các sản phẩm hoặc chủng nhập ngoại. Với mục đích tìm kiếm và làm giàu các chủng bản địa có đặc tính probiotic dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng, chúng tôi thực hiện các nghiên cứu đánh giá đặc tính probiotic tiềm năng của vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum* BfH1 phân lập từ phân trẻ sơ sinh.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Chủng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn BfH1 được phân lập từ phân trẻ sơ sinh 20 ngày tuổi và được lưu giữ tại Công ty CP Công nghệ Hóa sinh Việt Nam.

Vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* VTCC 10482, *Micrococcus luteus* VTCC 10644, *Salmonella enterica* VTCC 10480, *Staphylococcus aureus* VTCC 10658, nhận từ Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

#### Phương pháp

##### Điều kiện sinh trưởng của vi khuẩn

Chủng BfH1 được nuôi trên môi trường MRS-Cys, bao gồm: MRS (g/L: peptone-10,0; 'Lab-Lemco' powder-8,0; yeast extract-4,0; glucose-20,0, tween 80-1,0 mL;  $K_2HPO_4$ -2,0;  $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ -5,0; triammonium citrate-2,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,2;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ -0,05; agar-10; pH 6,2  $\pm$  0,2; Oxoid) bổ sung 0,05% (w/v) cysteine (Sigma), ủ kỵ khí ở 37°C trong 36 đến 72 giờ. Các chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi trên môi trường NA (g/L: peptone-5,0; 'Lab-Lemco' powder-1,0; yeast extract-2,0; NaCl-5,0; agar-15,0; pH 7,4  $\pm$  0,2; Oxoid), ủ hiếu khí ở 37°C trong 24 giờ.

##### Phân loại

Xác định trình tự gene 16S rRNA: Tách chiết, khuếch đại và xác định trình tự gene 16S rRNA theo phương pháp của Gabor và đồng tác giả (2003). So sánh mức độ tương đồng cao nhất về trình tự gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố trên Genbank bằng công cụ Blast. Trình tự gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn được gửi lên trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI).

##### Đánh giá đặc tính probiotic

Khả năng chịu muối mật của chủng BfH1 được đánh giá theo mô tả của Huidrom và Sharma (2018) với một chút thay đổi, nuôi trên đĩa thạch môi trường MRS-Cys có bổ sung oxgall ở các nồng độ: 0,0%, 0,3%, 0,5% và 1% (w/v); Quan sát khả năng sinh trưởng trên đĩa thạch.

Khả năng tồn tại (CFU/mL) của chủng BfH1 trong điều kiện đường tiêu hóa (GI) mô phỏng đã được thực hiện theo mô tả của Campana và đồng tác giả (2017) sau khi qua dạ dày, tá tràng và hồi tràng.

Khả năng chịu phenol và NaCl được thực hiện trên môi trường dịch MRS- Cys với nồng độ NaCl: 5, 8 và 12% (w/v); phenol (0,1; 0,2 và 0,4 %), ủ yếm khí trong 48 giờ ở 37°C, quan sát độ đục (Huidrom, Sharma, 2018).

Khả năng tự kết tụ của chủng vi khuẩn BfH1 được xác định theo Campana và đồng tác giả (2017).

Tính kỵ nước trên bề mặt tế bào được thực hiện theo Huidrom và Sharma (2018) thử nghiệm trên dung môi xylene.

Khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định được thực hiện theo phương pháp phủ thạch trên 4 loại vi khuẩn kiểm định (Astó *et al.*, 2022).

Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh được tiến hành bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch MRS-Cys với các kháng sinh (Himedia, Mumbai) theo mô tả của Huidrom và Sharma (2018), bao gồm amoxicillin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10µg), kanamycin (30µg), nalidixic acid (30 µg), ofloxacin (5 µg), oxacillin (5 µg), rifampicin (5 µg), penicillin G (10 units), tetracycline (30µg), vancomycin (30 µg).

##### Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, chitinase, cellulase, pectinase, protease và xylanase) được định tính bằng phương pháp thổi thạch chứa 0,1% cơ chất (tinh bột, chitin, carboxymethyl cellulose-CMC, pectin, casein và xylan) theo mô tả của Eldy và đồng tác giả (2021).

Các kết quả là trung bình cộng của 3 lần thí nghiệm.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Probiotic được coi là thực phẩm chức năng vì chúng mang lại những lợi ích sức khỏe tích cực cho vật chủ khi ăn vào với một lượng nhất định. Một số yêu cầu phải được các chủng đáp ứng để trở thành probiotic hiệu quả. Chủng này phải có nguồn gốc từ con người để ứng dụng cho con người, vi khuẩn phải tồn tại qua đường tiêu

hóa, nghĩa là chúng phải tồn tại cả dạ dày và axit mật và phải có hoạt động kháng khuẩn chống lại mầm bệnh. Tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn khác nhau ngay cả trong cùng một loài cũng khác nhau. Các chủng khác nhau của cùng một loài luôn là duy nhất. Vì vậy, việc đánh giá các đặc tính probiotic của chủng vi khuẩn là cần thiết để lựa chọn probiotic (Huidrom, Sharma, 2018).

### Phân loại chủng vi khuẩn BfH1

Chủng vi khuẩn BfH1 phân lập từ phân trẻ sơ sinh, được phân loại dựa vào phân tích trình tự gene16S rRNA. Trên cơ sở trình tự thu được, chủng BfH1 được xác định là *Bifidobacterium bifidum* bằng cách so sánh trình tự của nó với các trình tự các chủng chuẩn sẵn có trong cơ sở dữ liệu GenBank, sử dụng công cụ online BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trình tự gene16S rRNA của chủng BfH1 tương đồng cao nhất (100 %) và có quan hệ họ hàng gần nhất với chủng chuẩn *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521. Trình tự 1.375 bp gene16S rRNA của *Bifidobacterium bifidum* BfH1 đã được lưu giữ trên Genbank với mã số PP783528 tại NCBI. Đây là loài an toàn (GRAS) và sản phẩm của loài này được liệt kê vào danh mục các chất an toàn được dùng trong thực phẩm do Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan quản lý an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA) cho phép sử dụng.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc cộng sinh với các loài Bifidobacteria mang lại nhiều tác dụng có lợi cho sức khỏe con người. Trong số các loài Bifidobacteria liên quan đến đường ruột của con người, có đặc điểm di truyền khác nhau đáng kể ở cấp loài, *Bifidobacterium bifidum* khác biệt ở chỗ nó được tìm thấy trong ruột người từ trẻ sơ sinh đến người già. Loài này có khả năng đã thích nghi để làm suy giảm hiệu quả các chuỗi carbohydrate có nguồn gốc từ vật chủ, chẳng hạn như oligosaccharide sữa mẹ (HMO) và chất nhầy O - glycan, giúp cho sự xâm chiếm theo chiều dọc của ruột. *B. bifidum* giải phóng mono- và disaccharide khỏi glycan của vật chủ và giải phóng chúng vào các môi trường sống hoặc môi trường nuôi cấy *in vitro*. Nhờ những đặc điểm này, *B. bifidum* có thể hỗ trợ sự phát triển của các vi khuẩn Bifidobacteria khác bằng cách chia sẻ các sản phẩm phân giải glycan trong cộng đồng. *B. bifidum* là loài xuất hiện phổ biến trong ruột của động vật có vú. Loài này có đặc tính bám dính vào niêm mạc được tạo ra bởi sự hiện diện của pili phụ thuộc vào loại enzyme, có thể liên quan đến gắn glycan của hydrolase glycoside ngoại bào. Ngoài sự tương tác giữa vi khuẩn với vi khuẩn, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng *B. bifidum* có hoạt động điều hòa miễn dịch bằng cách tạo ra các tế bào T điều hòa bằng tương tác vi khuẩn-vật chủ với các polysaccharide bề mặt tế bào của nó (Katoh *et al.*, 2020). *B. bifidum* là thành viên duy nhất trong số tất cả các loài Bifidobacteria được công nhận có khả năng phát triển nhờ chuyển hóa chất nhầy. Sự chuyển hóa chất nhầy do *B. bifidum* thực hiện có thể kích hoạt việc tăng cường sản xuất chất nhầy, do đó tăng cường độ sâu của lớp chất nhầy bao bọc niêm mạc và do đó, tăng cường chức năng hàng rào biểu mô. Nhiều chủng *B. bifidum* đã được mô tả là có tác dụng có lợi, bao gồm các đặc tính kháng khuẩn chống lại mầm bệnh như *Helicobacter pylori*, giảm apoptosis trong niêm mạc ruột của trẻ sinh non bị ảnh hưởng bởi viêm ruột hoại tử, thay đổi hệ thống miễn dịch vật chủ và giảm bớt các hoạt động viêm liên quan đến một số rối loạn chức năng đường ruột mãn tính. Các chủng *B. bifidum* probiotic tồn tại tốt trong đường tiêu hóa và có thể xâm chiếm ruột người và do đó tác động đến cộng đồng vi khuẩn cư trú trong đường ruột. Một đặc điểm đáng chú ý khác được thể hiện ở các *B. bifidum* là khả năng thay thế và cạnh tranh với mầm bệnh (Turroni *et al.*, 2019).

### Đặc tính probiotic của chủng BfH1

Khả năng chịu mật được coi là một đặc điểm quan trọng của các chủng probiotic, giúp chúng tồn tại, phát triển và phát huy tác dụng trong quá trình vận chuyển qua đường tiêu hóa. Trong nghiên cứu này, chủng BfH1 sinh trưởng tốt trên đĩa thạch ở nồng độ muối mật ở 0,5% (Bảng 1). Nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) phân lập Bifidobacteria từ sữa mẹ, 40/47 chủng phân lập có khả năng sống sót ở muối mật 0,3%. Chủng *B. bifidum* CECT 7366 có tỷ lệ sống 62,78% ở nồng độ muối mật ở 3% (Chenoll *et al.*, 2011). Tất cả 5 chủng *B. bifidum* phân lập từ phân trẻ sơ sinh đều tăng trưởng ở nồng độ dịch mật 0,5 % (w/v) sau 3 giờ tiếp xúc (Ali, Doumandjia, 2018). Trong đường tiêu hóa của con người, nồng độ muối mật được cho là 3000 ppm (0,3%), được coi là quan trọng và đủ cao để sàng lọc các chủng kháng mật (Huidrom, Sharma, 2018).

Khả năng sống sót của chủng BfH1 trong điều kiện dịch dạ dày và ruột mô phỏng được đánh giá. Qua dạ dày mô phỏng (pepsine lợn và pH 2,5) sau 165 phút, số lượng tế bào của chủng BfH1 giảm so với ban đầu (từ 8,92 log CFU/mL còn 8,54 log CFU/mL). Chuyển sang điều kiện ở tá tràng mô phỏng (dịch chiết mật lợn và pancreatin lợn, pH 6,5) sau 3 giờ, số lượng tế bào còn 8,21 log CFU/mL. Sau điều kiện hồi tràng mô phỏng (6 giờ, pH 6,5), số lượng tế bào tăng lên 8,68 log CFU/mL (Bảng 1). Kết quả này cũng tương tự ở chủng *B. bifidum* W23, số lượng tế bào qua dạ dày giảm (9,23 log CFU/mL) so với ban đầu (9,51 log CFU/mL); đi qua tá tràng, số lượng tế bào giảm còn 9,12 log CFU/mL và tăng nhẹ (9,16 log CFU/mL) sau khi qua hồi tràng mô phỏng (Campana *et al.*, 2017). Khả năng chịu dịch dạ dày mô phỏng (pepsin trong HCl, pH 2,0) của 7 chủng *B. bifidum* phân lập từ phân trẻ sơ sinh sau 3 giờ có tỷ lệ sống sót đạt 69,32-116,25% (Zhang *et al.*, 2023). Trong khi đó, chủng *B. bifidum* CECT 7366 có tỷ lệ sống sót sau 2 giờ qua dạ dày (pepsin, pH3) là 9%, và sau 4 giờ qua ruột (pancreatin, pH8) là 7% (Chenoll *et al.*, 2011). Những dữ liệu trên cho thấy khả năng tiềm tàng của BfH1 có thể tồn tại một cách hiệu quả khi di chuyển qua đường tiêu hóa.

Khả năng tự kết tụ là xác định khả năng của một chủng vi khuẩn tương tác với chính nó, theo cách không đặc hiệu và được biết đến như một điều kiện tiên quyết cho sự xâm chiếm và lây nhiễm đường tiêu hóa của mầm

## CÔNG NGHỆ HÓA SINH VÀ PROTEIN


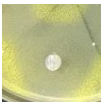
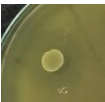
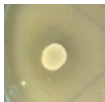
bệnh thông qua khả năng bám dính (Huidrom, Sharma, 2018). Chủng *B. bifidum* BfH1 có tỷ lệ kết tụ 66,7% (Bảng 1). Kết quả này, cũng tương đồng với các báo cáo trước đây, tỷ lệ tự kết tụ ở 4 chủng Bifidobacteria phân lập từ sữa mẹ (Smk4 Smk5, Smk9 và Dbs18) sau 24 giờ đạt 43,9-70,8 (Huidrom, Sharma, 2018). Bảy chủng *B. bifidum* phân lập từ phân trẻ sơ sinh, có tỷ lệ tự kết tụ từ 30,36-90,72% sau 6 giờ (Zhang *et al.*, 2023). Chủng *B. bifidum* W23 có tỷ lệ tự kết tụ 21,37% sau 6 giờ (Campana *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, chủng BfH1 cho thấy khả năng tự kết tụ tương đối cao, có thể cho phép nó tồn tại với số lượng đủ và xâm chiếm đường tiêu hóa.

Kiểm tra khả năng bám dính của probiotic với pha kỵ nước của dung môi (khả năng kỵ nước bề mặt) là cần thiết để xác định khả năng bám dính của vi khuẩn vào niêm mạc ruột, ngăn chặn mầm bệnh bám vào ruột và làm ô nhiễm hệ tiêu hóa (Goudarzi *et al.*, 2024). Kết quả bảng 1 cho thấy giá trị kỵ nước trên bề mặt tế bào của chủng BfH1 là 52,6% trên dung môi xylene. Tương tự với các nghiên cứu khác, giá trị kỵ nước của 4 chủng Bifidobacteria trong nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) từ 28,4–56,8% trên xylene. Giá trị kỵ nước của 4 chủng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa chua lên men nằm trong khoảng từ 53,3–73,2% trên xylene và 51,4–67,1% trên toluene (Goudarzi *et al.*, 2024). Kết quả này cho thấy chủng BfH1 có tính kỵ nước cao và có khả năng bám vào lớp biểu mô ruột.

Khả năng kháng phenol là một đặc tính đặc trưng của probiotic vì phenol có thể được hình thành trong ruột bởi vi khuẩn khử amin một số axit amin thơm được cung cấp qua chế độ ăn uống hoặc được sản xuất bởi các protein nội sinh (Huidrom, Sharma, 2018). Trong thử nghiệm kháng phenol, sinh trưởng của chủng BfH1 không thay đổi nhiều khi thay đổi nồng độ phenol từ 0-0,2%; giảm đi khi nồng độ phenol tăng lên 0,4% (Bảng 1). Trong nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) trên 4 chủng Bifidobacteria phân lập từ sữa mẹ (Smk4 Smk5, Smk9 và Dbs18) có thể sinh trưởng ở phenol 0,4% với giá trị OD<sub>600</sub> từ 0,31-0,5.

Trong kết quả thử nghiệm NaCl ở Bảng 1, chủng BfH1 có thể sinh trưởng trên môi trường NaCl 8%. Trong nghiên cứu khác, cả bốn chủng Bifidobacteria phân lập đều có thể chịu NaCl tới 12% (Huidrom, Sharma, 2018). Chủng Bifidobacterium bifidum CECT 7366 có tỷ lệ sống sót 12,17% ở nồng độ NaCl 10% (Chenoll *et al.*, 2011). Khả năng phát triển ở nồng độ muối cao rất quan trọng đối với probiotic vì chúng có thể ức chế sự phát triển của mầm bệnh.

**Bảng 1. Một số đặc tính probiotic của *B. bifidum* BfH1**

Chịu muối mật	Sinh trưởng trên muối mật (%)											
	0	0,3	0,5	1,0								
+	+	+	-									
Khả năng tồn tại trong điều kiện đường tiêu hóa mô phỏng	Số lượng tế bào sống sót (Log CFU/mL)											
	Ban đầu	Đi qua dạ dày	Đi qua tá tràng	Đi qua hồi tràng								
	8,92	8,54	8,21	8,68								
Tự kết tụ và Tính kỵ nước	Tự kết tụ (%)		Tỷ lệ kỵ nước (%) trên xylene									
	66,7		52,6									
Chịu phenol và NaCl	Sinh trưởng (OD <sub>600</sub> ) ở nồng độ phenol (%)			Sinh trưởng (OD <sub>600</sub> ) ở nồng độ NaCl (%)								
	0	0,2	0,4	5	8	12						
	1,84	1,67	0,62	1,72	0,93	-						
Khả năng chịu kháng sinh	Vòng kháng chất kháng sinh (mm)											
	AMO	CLO	ERY	GEN	KAN	NAL	OFL	OXA	RIF	PEN	TET	VAN
	28	32	26	7	13	0	9	29	25	30	27	17
Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định	Vòng kháng vi sinh vật kiểm định (mm)											
	Esc		Mic		Sal		Sta					
	19		25		18		13					
												

Ghi chú: "+": sinh trưởng; "-": không sinh trưởng; AMO-amoxicillin, CLO-cloramphenicol, ERY-erythromycin, GEN-gentamycin, KAN-Kanamycin, NAL-nalidixic acid, OFL-ofloxacin, OXA-oxacillin, RIF-Rifampicin; PEN- penicillin G, TET- tetracyclin, VAN-vancomycin; Esc-*Escherichia coli* VTCC 10482, Mic-*Micrococcus luteus* VTCC 10644, Sal-*Salmonella enterica* VTCC 10480, Sta-*Staphylococcus aureus* VTCC 10658.





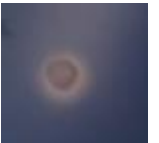

Mối lo ngại về khả năng lây lan của các yếu tố quyết định kháng kháng sinh từ vi khuẩn được sử dụng trong các sản phẩm probiotic. Việc kiểm tra độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn lactic acid (LAB) và Bifidobacteria có thể được khuyến khích để kiểm tra độ an toàn sinh học của các chủng probiotic tiềm năng (Huidrom, Sharma, 2018). Trong nghiên cứu này, chủng *B. bifidum* BfH1 nhạy cảm với 8 loại kháng sinh thử nghiệm ở các mức độ khác nhau với các vòng kháng từ 17-32 mm (Bảng 1) và kháng với 4 loại kháng sinh (Gentamycin, kanamycin, nalidixic acid và ofloxacin). Điều này phù hợp với báo cáo của Huidrom và Sharma (2018) sàng lọc độ nhạy cảm với kháng sinh trên 15 chủng Bifidobacteria phân lập từ sữa mẹ, cho thấy tất cả các chủng phân lập đều nhạy cảm với rifampicin, chloramphenicol, amoxycillin và tetracycline; 13 chủng nhạy cảm với erythromycin; 13 chủng nhạy cảm với penicillin và 9 chủng nhạy cảm với oxacillin. Có 14 chủng kháng vancomycin, 13 chủng kháng nalidixic acid, 10 chủng kháng kanamycin, 10 chủng kháng ofloxacin, 8 chủng kháng gentamicin. Trong khi *B. bifidum* W23 có khả năng kháng oxacillin, penicillin, cefoxitin; kháng trung bình với amoxicillin, gentamicin, cefotaxime và nhạy cảm với các loại kháng sinh ampicillin, fusidic acid, erythromycin, chloramphenicol, streptomycin (Ali, Doumandjia, 2018). Độ nhạy cảm với kháng sinh của *B. bifidum* CECT 7366 không có giá trị MIC cao hơn ngưỡng EFSA quy định đối với 20 chất kháng sinh (Chenoll *et al.*, 2011). Trong nghiên cứu của Kim và đồng tác giả (2018) về khả năng kháng kháng sinh của 10 chủng Bifidobacteria dùng cho sản xuất probiotic thương mại cho thấy tất cả đều nhạy cảm với ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, penicillin G, rifampicin và vancomycin (MIC dao động từ 0,01 đến 4 µg/mL), thường kháng với các kháng sinh gentamicin, kanamycin, neomycin và streptomycin (MIC dao động từ >32 µg/mL). Giá trị MIC của *B. bifidum* BGN4 và *B. longum* BORI, ngoại trừ gentamicin và tetracycline, bằng hoặc thấp hơn giá trị ngưỡng EFSA đã được thiết lập do Hội đồng phụ gia và sản phẩm hoặc chất sử dụng trong thức ăn chăn nuôi của EFSA đề xuất. Nghiên cứu về khả năng chuyển giao kháng kháng sinh đã được tiến hành để xác nhận bản chất của tình trạng kháng gentamicin và tetracycline của 2 chủng này. Kết quả cho thấy khả năng kháng gentamicin của *B. bifidum* BGN4 và khả năng kháng gentamicin và tetracycline của *B. longum* BORI không được chuyển sang các chủng nhận, đồng thời cho rằng khả năng kháng kháng sinh của chúng là nội tại. Điều đáng chú ý là một báo cáo năm 2011 do Cơ quan Nghiên cứu và Chất lượng Y tế (AHRQ) công bố đã xem xét rộng rãi 622 nghiên cứu về sáu chi (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus* và *Bacillus*), và không tìm thấy bằng chứng lâm sàng nào về khả năng chuyển gen từ probiotic sang các vi sinh vật khác về mặt lý thuyết (Kim *et al.*, 2018).

*Bifidobacteria* có thể chống lại sự xâm nhập của một số mầm bệnh trong đường ruột của con người, điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc duy trì sức khỏe cơ thể và bảo vệ cân bằng nội môi đường ruột. Vì vậy, việc đánh giá khả năng kháng khuẩn của nhóm vi khuẩn này là đặc biệt quan trọng (Zhang *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này, khả năng kháng các mầm bệnh Gram dương và Gram âm của chủng BfH1 được xác định bằng phương pháp phủ thạch. Kết quả bảng 1, chủng *B. bifidum* BfH1 ức chế sinh trưởng của tất cả 4 loại vi khuẩn kiểm định với các vòng kháng từ 13-25 mm. Tương tự, *Bifidobacterium longum* KABP042 và *Pediococcus pentosaceus* KABP041 phân lập từ phân trẻ sơ sinh cũng kháng tất cả các vi khuẩn kiểm định (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* và *Enterococcus faecalis*) với vòng kháng 0,7-2,6 mm (KABP041) và 0,6-1,7 mm (KABP042) bằng phương pháp phủ thạch (Astó *et al.*, 2022). *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 có giá trị ức chế *Helicobacter pylori* với đường kính ức chế trung bình là 6,59 mm từ dịch nuôi và ức chế sinh trưởng 81,94% trong môi trường lỏng (Chenoll *et al.*, 2011). Kết quả trong nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) cho thấy không phải tất cả Bifidobacteria có trong sữa mẹ đều có đặc tính kháng khuẩn, chỉ có 4 chủng Smk4 và Smk5, Smk9 và Dbs18 kháng với tất cả các mầm bệnh thử nghiệm (*E. coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella boydii*) với đường kính vòng kháng 6-13 mm. Có 9/10 chủng Bifidobacteria phân lập từ phân trẻ sơ sinh kháng *Escherichia coli* ATCC 25922 với đường kính vòng kháng từ 10,67-13,67 mm. Nhiều loài Bifidobacteria khác nhau có thể tạo ra các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, bao gồm axit hữu cơ (acetic, lactic và butyric), các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp và peptide kháng khuẩn (bacteriocin) (Zang *et al.*, 2023).

### Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng BfH1

Kết quả bảng 2 cho thấy chủng BfH1 có khả năng sinh các enzyme ngoại bào phân giải các cơ chất, được thể hiện qua các vùng quang sáng xung quanh các thỏi thạch: CMC (cellulase), chitin (chitinase), pectin (pectinase), tinh bột (amylase), và xylan (xylanase) với đường kính từ 8-14 mm và không phân giải casein (protease). Nghiên cứu của EL-Sayed và đồng tác giả (2022) cho thấy *Lactobacillus acidophilus* SAM1 sinh lipase (11 mm), *Lactiplantibacillus plantarum* SAM2 sinh protease và amylase thấp (4mm và 3mm), ngoài các đặc tính probiotic. Cả hai chủng *P. pentosaceus* KABP041 và *B. longum* KABP042 đều không sinh gelatinase phân giải gelatin (Astó *et al.*, 2022). Quá trình sản xuất các enzyme liên quan đến quá trình tiêu hóa các loại đại phân tử khác nhau như polysaccharide, lipid, protein... Việc sản xuất tại chỗ các enzyme này trong ruột vật chủ có thể đóng một vai trò tích cực trong việc cải thiện quá trình tiêu hóa thức ăn. Từ kết quả này cho thấy khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *B. bifidum* BfH1 rất đa dạng, đây là đặc điểm quý với các chủng *Bifidobacterium* sử dụng trong sản xuất các sản phẩm dùng cho con người.

**Bảng 2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng BfH1**

Vòng phân giải cơ chất (mm)					
Casein	Chitin	CMC	Pectin	Tinh bột	Xylan
0	14	12	8	10	11
					

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu *in vitro*, chủng vi khuẩn BfH1 phân lập từ phân trẻ sơ sinh mang đầy đủ các đặc tính probiotic: là loài *Bifidobacterium bifidum* an toàn, có khả năng tồn tại tốt trong các điều kiện khắc nghiệt của đường tiêu hóa, chịu phenol, chịu NaCl, có khả năng bám dính vào tế bào biểu mô ruột; kháng một số loại vi sinh vật gây bệnh, nhạy cảm với nhiều kháng sinh, sinh các enzyme ngoại bào phân giải các cơ chất hữu cơ. *Bifidobacterium bifidum* BfH1 có thể là ứng cử viên tiềm năng để trở thành probiotic sử dụng trong thực phẩm chức năng. Cần có các nghiên cứu sâu hơn để cho thấy hiệu quả ở người và động vật.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả cảm ơn Công ty CP Hóa Sinh Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali IH, Doumandjia A (2018). Characterization and screening of the potential probiotic lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* strains isolated of different biotopes. *Mediterr J Nutr Metab*, 11: 145–173.
- Astó E, Huedo P, Altadill T, Aguiló García M, Sticco M, Perez M, Espadaler-Mazo J (2022). Probiotic Properties of *Bifidobacterium longum* KABP042 and *Pediococcus pentosaceus* KABP041 Show Potential to Counteract Functional Gastrointestinal Disorders in an Observational Pilot Trial in Infants. *Front Microbiol*, 12:741391.
- Campana R, van Hemert S, Baffone W (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog*, 9(12).
- Chen J, Chen X, Ho CL (2021). Recent Development of Probiotic *Bifidobacteria* for Treating Human Diseases. *Front Bioeng Biotechnol*, 9: 770248.
- Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Astals P, Echevarría J, Iglesias JR, Balbarie P, Ramoín D, Genove´s S (2011). Novel Probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 Strain Active against the Pathogenic Bacterium *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, 77(4): 1335–1343.
- Eldy J, Daquioag L, Penuliar GM (2021). Isolation of Actinomycetes with Cellulolytic and Antimicrobial Activities from Soils Collected from an Urban Green Space in the Philippines. *Int J Microbiol*, 2021: 14.
- Garbor EM, de Vries EJ, Janssen DB (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirection methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 44(2):153-163.
- Goudarzi F, Kiani A, Nami Y, Shahmohammadi A, Mohammadalipour A, Karami A, Haghshenas B (2024). Potential probiotic *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KUMS-Y33 suppresses adipogenesis and promotes osteogenesis in human adipose-derived mesenchymal stem cell. *Sci Rep*, 14:9689.
- Huidrom S, Sharma N (2018). "Isolation and Screening of Novel Isolates of Bifidobacteria from Human Milk as Potential Probiotic with Antidiarrheal Activity". *Ann Appl Microbiol Biotech J*, 2(1): 1007-1015.
- Kim MJ, Ku S, Kim SY, Lee HH, Jin H, Kang S, Li R, Johnston TV, Park MS, Ji GE (2018). Safety Evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI. *Int J Mol Sci*, 19(5): 1422.
- Katoh T, Ojima MN, Sakanaka M, Ashida H, Gotoh A, Katayama T (2020). Enzymatic Adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to Host Glycans, Viewed from Glycoside Hydrolyases and Carbohydrate-Binding Modules. *Microorganisms*, 8(4): 481.
- Shori MB (2022). Application of *Bifidobacterium* spp. in beverages and dairy food products: an overview of survival during refrigerated storage. *Food Sci Technol*, 42(9).
- Turróni F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M (2019). *Bifidobacterium bifidum*: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. *Microorganisms*, 7(11): 544.
- Yakoob R, Pradeep BV (2019). *Bifidobacterium* sp. as Probiotic Agent - Roles and Applications. *J Pure Appl Microbiol*, 13(3): 1407-1417.
- Zhang G, Sun H, Xu Z, Tan Z, Xiao L, He M, Shang J, Tsapieva AN, Zhang L (2023). Screening of Bifidobacteria with Probiotic Potential from Healthy Infant Feces by Using 2'-Fucosyllactose. *Foods*, 12(4): 858.

## PROBIOTIC PROPERTIES OF *Bifidobacterium bifidum* BFH1 ISOLATED FROM INFANTS FECES

Nguyen Hoang Minh Duc<sup>\*</sup>, Nguyen Van Nam, Nguyen Thi Thom, Dao Thi Luong

Vietnam Biochemical Technology Joint Stock Company

### SUMMARY

Probiotics are live microorganisms that colonize the gut and supply helpful benefits. Probiotics are completely different from other varieties of microorganism in that they are considered “good” microorganism or non-pathogenic in healthy individuals. Genus *Bifidobacterium* is the primary microbe that colonizes human channel, and it has positive health effects on its host. Because of the acknowledged health benefits, it is included in several purposeful foods. The main objective of this study was to search for potential probiotic properties of native Bifidobacteria for use in functional foods. The probiotic properties and enzyme-producing ability of bacterial strain BfH1, isolated from infants feces, were evaluated *in vitro*. Strain BfH1 was identified as *Bifidobacterium bifidum* based on 16S rRNA gene sequence analysis, which is on the Generally Recognized As Safe (GRAS). Probiotic and safety properties of this strain were demonstrated: bile salt tolerance (0.5%), survives well in harsh conditions of simulated stomach and intestine, phenol tolerance (0.4%), NaCL tolerance (8%), adherence to intestinal epithelial cells, growth inhibition of 4 pathogenic bacteria, sensitive to 8/12 tested antibiotics. In addition, strain BfH1 producing multy- enzymes break down substrates to help convert food in the intestine. Therefore, the good survive through the gastrointestinal tract, high adhesion and non-toxic nature of the *Bifidobacterium bifidum* BfH1 mean that it can be used as potential probiotic in functional food.

**Keywords:** *Bifidobacterium bifidum*, enzyme, in vitro, probiotic.

---

<sup>\*</sup> Author for correspondence: Tel: 0902254556; Email: duc.nhm@bccgroup.com.vn