

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG XYLOOLIGOSACCHARIDES (XOS) CỦA *BACILLUS*

Hoàng Phương Hà¹, Phạm Thị Thu Phương¹, Trần Thị Nhung¹,
Nguyễn Thị Vân Anh², Nguyễn Hòa Anh², Nguyễn Thị Mai Phương^{1,*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên,

*Email: phuong_nguyen_99@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 30/5/ 2012; Chấp nhận đăng: 23/3/2013

TÓM TẮT

Hiện nay vi khuẩn *Bacillus* đang được sử dụng phổ biến trong các sản phẩm probiotic dùng cho người, ví dụ như *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*. Một đặc điểm ưu việt của *Bacillus* là khả năng tạo spore của chúng. Các bào tử sẽ nảy mầm thành vi khuẩn và phát triển trong ruột, nhờ đó duy trì được hệ vi khuẩn đường ruột có ích. Probiotic dạng bào tử bền ở dải pH rộng, từ acid của dạ dày đến kiềm nhẹ ở đại trực tràng và đang được sử dụng với số lượng lớn trong các chế phẩm probiotic.

Xylooligosaccharide (XOS) là một oligomer của xylose. Thị trường cho XOS đang ngày một hấp dẫn do những ưu thế về công nghệ của nó so với các oligosaccharide khác. XOS cũng là cơ chất lên men của *Bifidobacteria* và *Lactobacillus*, những vi khuẩn phổ biến trong đại trực tràng. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có bằng chứng về việc *Bacillus* có khả năng đồng hóa XOS. Số liệu thu được cho thấy trong số 5 chủng vi khuẩn *Bacillus* đã được nghiên cứu, chủng vi khuẩn *B. subtilis* HU58 có khả năng đồng hóa XOS tốt nhất với 70 % hàm lượng XOS tổng số đã được sử dụng. Hàm lượng XOS còn lại trong canh trường nuôi cấy sau 24 giờ và hình ảnh định tính XOS bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) đã chứng tỏ điều này. Sự lên men XOS của *B. subtilis* HU58 cũng sinh ra axit butyric. Hàm lượng axit này đã tăng từ 0,54 % lên 8,68 % sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường LB chứa XOS 0,25 %. Như vậy, đây là phát hiện đầu tiên về *B. subtilis* HU58 có khả năng đồng hóa XOS, gợi ý rằng XOS và *B. subtilis* HU58 có thể sử dụng để tạo sản phẩm synbiotic mới.

Keywords: xylooligosaccharide (XOS), *B. subtilis* HU58, probiotic, axit butyric

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, một số vi khuẩn *Bacillus* đang được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm probiotics, đặc biệt là *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*...Vi khuẩn *B. subtilis* đã được cơ quan quản lí thực phẩm và thuốc của Hoa Kỳ (FDA) xếp vào nhóm an toàn GRAS (Generally Regarded As Safe). Một đặc điểm nổi bật khiến *Bacillus* được quan tâm là khả năng

hình thành bào tử của chúng. Bào tử có thể nảy mầm và sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí ở đường ruột, vì thế duy trì được quần thể vi khuẩn có lợi trong ruột. Chính vì vậy, công nghệ sản xuất probiotic dưới dạng bào tử đã được hình thành và hiện nay đang được nhiều công ty dược phẩm lớn áp dụng thành công như Sanofi-Aventis, Pháp. Probiotic nếu sản xuất dưới dạng bào tử sẽ bền vững ở dải pH rộng, từ môi trường axit của dạ dày tới môi trường kiềm nhẹ của ruột [4]. Do đó, khi sử dụng qua đường uống, bào tử vẫn tồn tại ở dạng sống khi đi qua dạ dày và nhờ đó, có thể nảy mầm và sinh trưởng trong ruột của động vật và người [2, 3, 6, 7]. Probiotic dạng bào tử như *Bacillus* đang được xem là probiotic thế hệ mới có ưu điểm vượt trội hơn probiotic sử dụng tế bào sống đang phổ biến hiện nay.

Xylooligosaccharide (XOS) là các oligomer (2-7) của đường xylose. XOS trong tự nhiên có ở các hoa quả, rau, củ, tre, mật ong, sữa. Hiện nay thị trường thương mại cho sản phẩm này đang tăng lên do tính chất prebiotic đặc biệt của nó. XOS là nguồn cơ chất thích hợp cho *Bifidobacteria* và *Lactobacillus*, là những vi khuẩn phổ biến trong đường ruột của người [9]. Các kết quả nghiên cứu thu được đã khẳng định XOS có vai trò sinh học thông qua việc: **i)** ức chế hoạt động của các vi khuẩn gây bệnh đường ruột do sinh ra các axit béo mạch ngắn; **ii)** làm tăng khả năng hấp thu khoáng của cơ thể [8]. Tuy nhiên, Cho đến nay chưa có nghiên cứu nào công bố XOS có thể đồng hóa được bởi vi khuẩn *Bacillus*.

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm tìm hiểu khả năng sử dụng XOS của một số vi khuẩn probiotic *Bacillus*, qua đó có thể tạo ra một chế phẩm synbiotic mới chứa prebiotic ở dạng XOS và probiotics dạng bào tử của vi khuẩn *Bacillus*.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

2.1.11. Chủng vi khuẩn

Các chủng *Bacillus subtilis* HU58 và HU36, *B. clausii* và *B. licheniformis* là quà tặng của Giáo sư Simon Cutting, Đại học Hoàng gia Anh Quốc. Chủng *B. coagulans* được mua từ Đại học OHIO, Hoa Kỳ. Các chủng này được lưu giữ và cấy chuyển hàng tuần trên môi trường Luria Bertani (LB) agar. Tế bào được nuôi cấy ở 37 °C trong môi trường LB chứa 3 % tryptone, 0,5 % cao nấm men và 1 % NaCl.

2.1.2. Các hóa chất

Các thành phần môi trường tryptone, cao nấm men được mua từ hãng Difco, Hoa Kỳ. XOS và xylose chuẩn được mua từ hãng Wako (Nhật). Kit đo xylose được mua từ hãng Megazyme. Bản silica gel tráng sẵn F254 được mua của hãng Merk (Đức).

Các hoá chất còn lại đều đạt độ tinh khiết dành cho phân tích.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Định lượng xylose và XOS

Dựa vào phương pháp quang phổ để định lượng xylose tổng số có trong mẫu nghiên cứu sau khi xử lý với axit chlorhydric, từ đó tính được hàm lượng XOS dựa vào chất chuẩn (Wako). XOS được xử lý với HCl 1,3 M trong 1 giờ ở 100 °C để thủy phân hoàn toàn xylan thành

xylose. Sau khi trung hòa với NaOH 1,3 M mẫu nghiên cứu được li tâm và thu dịch nổi. Hàm lượng xylose trong dung dịch được xác định bằng kit D-xylose (Megazyme) theo công thức.

$$C_{[g/L]} = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta OD$$

trong đó: V: Thể tích cuối cùng (ml); MW: Khối lượng phân tử của D-xylose (g/mol); ϵ : Hệ số hấp thụ quang của NADH tại 340 nm = $6300 [l \times mol^{-1} \times cm^{-1}]$; d: bề dày cuvet (cm); v: Thể tích mẫu (mL).

Nồng độ xylose tổng số tỉ lệ với sự tăng giá trị OD tại A_{340} tương ứng với mức độ oxi hóa β -D-xylose bởi NAD^+ để tạo thành NADH.

2.2.2. Sắc kí lớp mỏng định tính đường XOS

XOS được định tính trên bản sắc kí lớp mỏng (TLC) silicagel 60 F254 (Merck 1.05554; 20 × 20) sử dụng hệ dung môi phân tách n-butanol: axit acetic: H_2O với tỉ lệ 3 : 1 : 1. Bản sắc kí được hiện màu bằng aniline trong hỗn hợp axit phthalic và n-butanol bão hòa. Các vạch đường hiện màu nâu sau khi chạy sắc kí khoảng 90 phút và phun thuốc hiện màu.

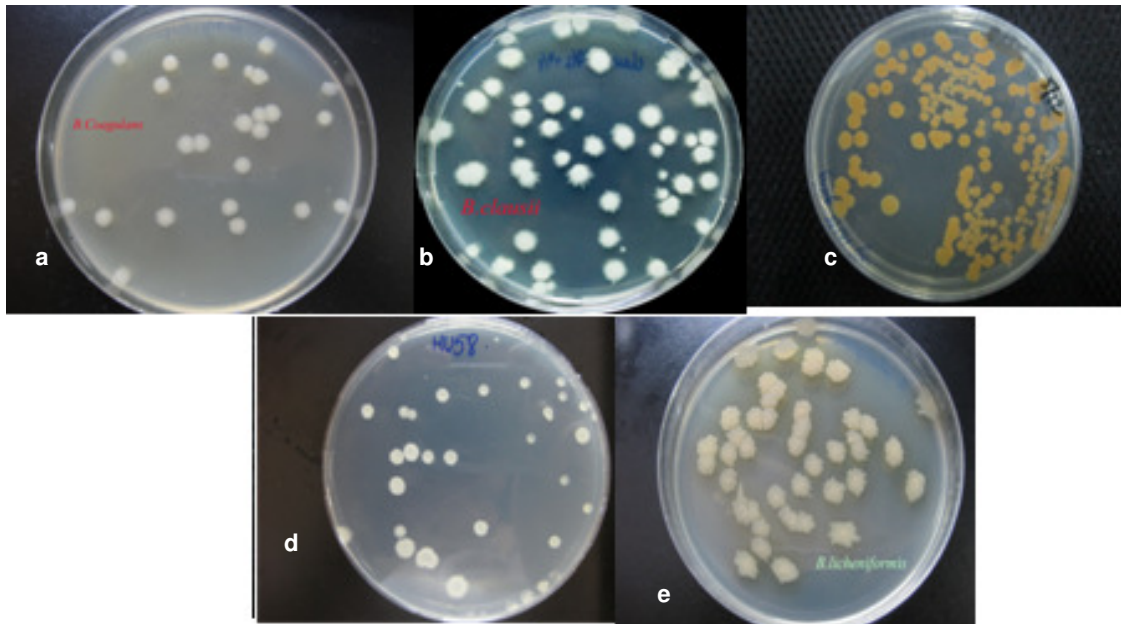
2.2.3. Xác định khả năng sinh trưởng của vi khuẩn

Sự sinh trưởng của vi khuẩn tại các thời điểm khác nhau được kiểm tra thông qua việc kiểm tra mật độ quang học (OD) của dịch nuôi cấy tại bước sóng 600 nm (A_{600}). Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trên môi trường chứa đường XOS được xác định thông qua việc:

- Đo mật độ quang học OD tại A_{600} để kiểm tra mật độ tế bào của dịch nuôi cấy,
- Xác định hàm lượng đường XOS trong dịch nuôi cấy bằng sắc kí lớp mỏng (TLC),
- Định lượng hàm lượng XOS trong dịch nuôi cấy sử dụng kit đo D-xylose (Megazyme),
- Định lượng axit béo theo tiêu chuẩn ISO/FDIS 5590: 1998, Đức. Mẫu phân tích butyric được chiết bằng chloroform: methanol theo tỉ lệ 2 : 1 và phân tích bằng máy sắc kí khí HP-6890 nối với Mass Selective Detector Agilent 5973 sử dụng cột HP-5MS, khí mang He, chương trình nhiệt độ là 80 °C (1 phút) - 40 °C/phút. -150 °C (1 phút.) -10 °C / phút - 260 °C (10 phút), sử dụng thư viện phổ khối WILEY275.L và NIST 98.L.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Để đánh giá khả năng đồng hóa XOS của chúng, các chủng vi khuẩn *Bacillus* (hình 1) được nuôi cấy trong môi trường LB có chứa XOS ở nồng độ 0,25 %. Khả năng sử dụng XOS của vi khuẩn được đánh giá thông qua việc: **i)** làm tăng mật độ tế bào trong môi trường nuôi cấy; **ii)** làm giảm hàm lượng đường XOS trong môi trường; **iii)** hình thành axit béo mạch ngắn butyric (sản phẩm chính của quá trình lên men XOS).



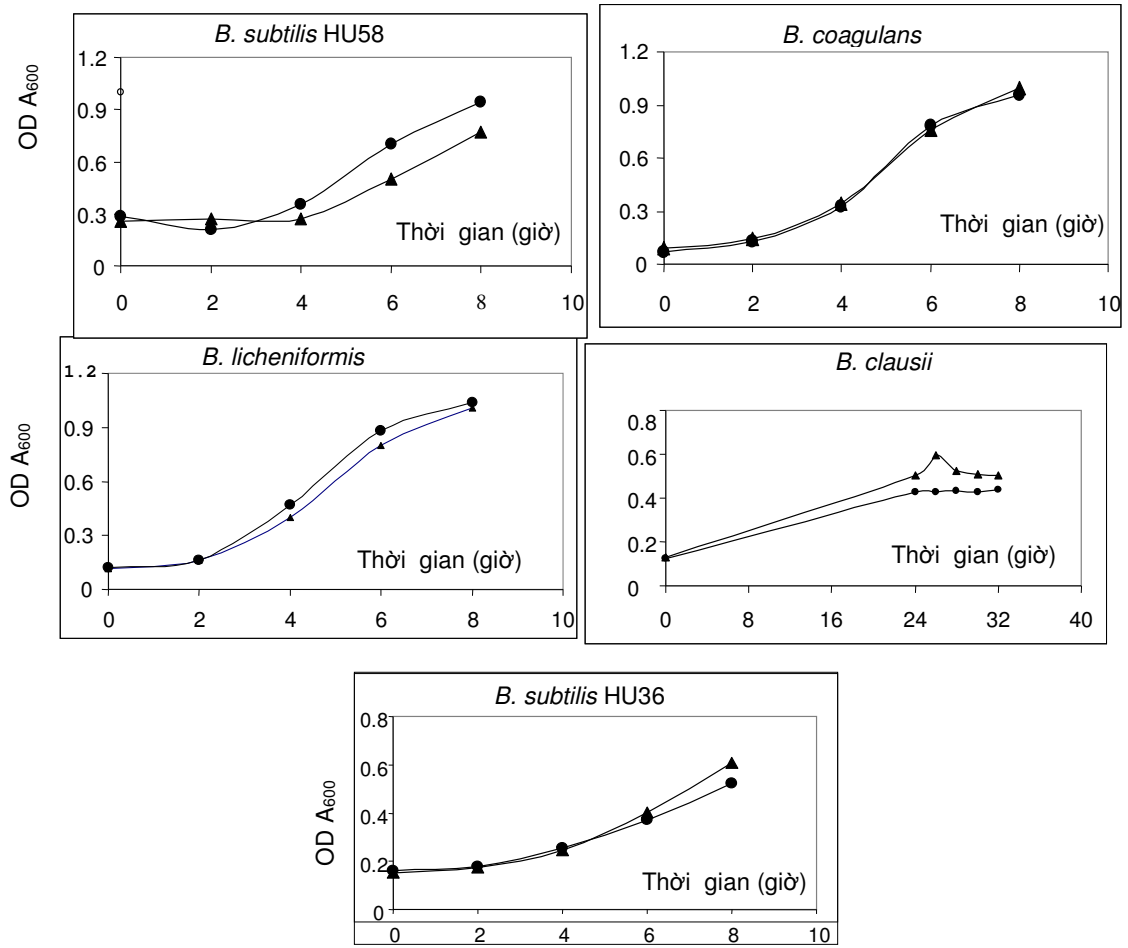
B. subtilis HU58 (d), *B. licheniformis* (e).

3.1. Khả năng sinh trưởng của *Bacillus* trong môi trường có chứa XOS

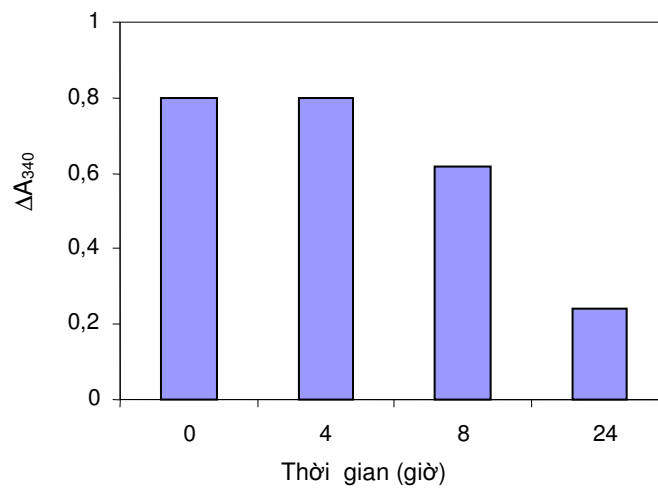
Kết quả nghiên cứu về khả năng sinh trưởng của *Bacillus* trong môi trường có chứa XOS được trình bày ở hình 2. Các số liệu trong hình 2 cho thấy trong số 5 chủng vi khuẩn probiotic đã được nghiên cứu thì chỉ có chủng *B. subtilis* HU58 có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường LB có bổ sung 0,25 % XOS. Cụ thể là mật độ tế bào sau 6 giờ nuôi cấy tại A_{600} của vi khuẩn này trong môi trường LB chỉ đạt 0,43 trong khi mật độ ở môi trường LB có chứa XOS đạt tới 0,68. Sau 8 giờ nuôi cấy, các số liệu tương ứng là 0,65 và 0,93. Sự khác biệt này thể hiện rõ ràng hơn với mẫu nuôi cấy vi khuẩn sau 24 giờ (1,13 và 1,57 theo thứ tự, số liệu không trình bày trong hình). Như vậy có thể sơ bộ kết luận rằng sự có mặt của XOS trong môi trường nuôi cấy giúp *B. subtilis* HU58 sinh trưởng tốt hơn có lẽ vì vi khuẩn này đã đồng hóa được XOS.

3.2. Khả năng đồng hóa XOS của *B. subtilis* HU58

Để khẳng định khả năng tiêu thụ XOS của *B. subtilis* HU58, hàm lượng đường XOS trong môi trường nuôi cấy đã được kiểm tra sử dụng phương pháp TLC và định lượng XOS còn lại trong môi trường sử dụng kit D-xylose (Megazyme). Kết quả thu được ở hình 3 cho thấy, sau 24 giờ nuôi cấy, hàm lượng XOS trong môi trường đã giảm đi 70 % so với lúc đầu, chứng tỏ *B. subtilis* HU58 đã sử dụng XOS trong quá trình phát triển. Khả năng đồng hóa XOS cũng đã được kiểm tra với 2 chủng *B. subtilis* khác là *B. subtilis* VTCC (Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Đại học Quốc gia Hà Nội) và *B. subtilis* PY79 (Đại học Hoàng gia Anh Quốc). Điều đáng quan tâm là các chủng *B. subtilis* này hầu như không có khả năng sử dụng XOS (số liệu không trình bày ở đây).

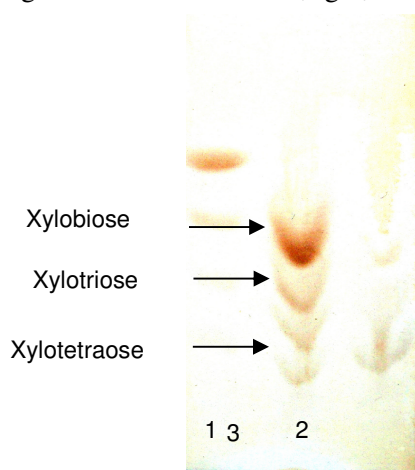


Hình 2. Khả năng phát triển của *Bacillus* trong môi trường LB có chứa XOS 0,25 %. (▲) LB; (●) LB chứa XOS.



Hình 3. Hàm lượng đường XOS còn lại trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* HU58.

Khi nghiên cứu khả năng sử dụng XOS của các vi khuẩn có hoạt tính phân giải xylan trong ruột bò là *P. ruminicola*, *Ruminicola albus*, *B. fibrisolvans* và *E. ruminantium*, Hsu và cộng sự [5] đã phát hiện thấy mức độ sử dụng XOS ở các vi khuẩn này thay đổi từ 76 % cho đến 46 %. Cụ thể là, *B. fibrisolvans* H17c. là 63 %, *P. ruminicola* D31d. là 76 %, *R. albus* là 56 % và *E. ruminantium* GA195 là 46 %. Trong thí nghiệm ở đây, *B. subtilis* HU58 có khả năng đồng hóa tới 70% đường XOS sau 24 giờ. Như vậy có thể kết luận vi khuẩn này có khả năng đồng hóa XOS ở mức độ cao tương đương so với *P. ruminicola* D31d, là chủng thể hiện hoạt tính đồng hóa XOS mạnh nhất trong nghiên cứu của Hsu và cộng sự.



Hình 4. Sắc kí đồ TLC môi trường nuôi cấy *B. subtilis* HU58 có chứa XOS. 1. XOS; 2. Môi trường LB tại 0 giờ; 3. Môi trường LB tại 24 giờ.

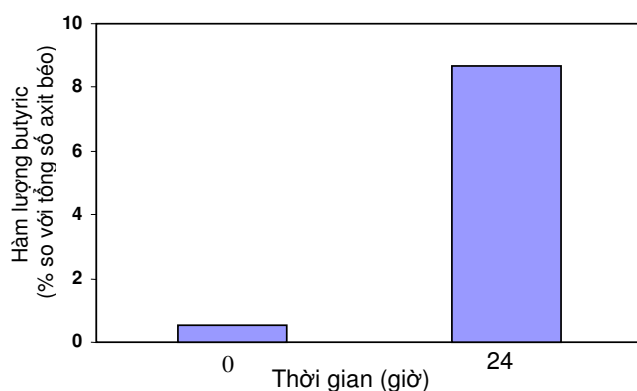
Kết quả kiểm tra hàm lượng XOS còn lại trong môi trường bằng TLC (hình 4) cũng cho thấy XOS đã giảm đi đáng kể sau 24 giờ nuôi cấy. Các vạch sắc kí gần như biến mất sau 24 giờ nuôi cấy so với mẫu đối chứng. Cho đến nay, các nghiên cứu mới chỉ phát hiện một số vi khuẩn đường ruột của động vật thuộc chi *Bifidobacteria* và *Lactobacillus* là có khả năng đồng hóa đường XOS [1]. Chưa có công bố nào chứng minh *B. subtilis* có khả năng này. Vì vậy, đây là một phát hiện mới của chúng tôi và việc tạo một chế phẩm synbiotic chứa bào tử *B. subtilis* HU58 và XOS sẽ là một sản phẩm thực phẩm bổ sung mới có tiềm năng sử dụng và thương mại cao.

3.3. Khả năng hình thành butyrate của *Bacillus subtilis* HU58 khi đồng hóa XOS

Các vi khuẩn đường ruột như *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* và một số vi khuẩn khác sau khi lên men các chất prebiotic như các oligosaccharide sẽ sinh ra các sản phẩm phụ gồm các axit béo mạch ngắn như acetate, propionate và butyrate. Đây là nguồn nhiên liệu hô hấp quan trọng cho các tế bào đại trực tràng. Nghiên cứu của Aachary và Prapulla [1] cũng chỉ ra rằng butyrate là sản phẩm lên men chủ yếu của XOS bởi vi khuẩn đường ruột. Để chứng *B. subtilis* HU58 đã đồng hóa XOS và sinh butyrate, chúng tôi tiến hành định lượng butyrate trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn ở hai thời điểm 0 giờ và 24 giờ. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở hình 5.

Kết quả thu được cho thấy hàm lượng axit béo mạch ngắn này đã tăng lên từ 0,54 % (thời điểm 0 giờ) đến 8,68% (thời điểm 24 giờ nuôi cấy), chứng tỏ *B. subtilis* HU58 đã sử dụng XOS

và sinh ra butyrate. Đây là một bằng chứng thuyết phục nữa khẳng định phát hiện mới của chúng tôi về khả năng đồng hóa XOS của *B. subtilis* HU58.



Hình 5. Hàm lượng butyrate trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* HU58 có chứa XOS.

4. KẾT LUẬN

Đã phát hiện chủng *B. subtilis* HU58 có khả năng đồng hóa đường XOS tới 70% và sinh acid butyric. Đây là phát hiện mới, có giá trị, khẳng định khả năng ứng dụng của XOS như một prebiotic hiệu quả trong chế phẩm synbiotic mới chứa XOS và vi khuẩn sinh bào tử *B. subtilis* HU58.

Lời cảm ơn. Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài KC.04.TN01/11-15, Bộ Khoa học Công nghệ, 2012.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Achary A. and Prapulla S. - Xylooligosaccharide (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications, *Comp. Rev. Food. Sci. Food. Safety* **10** (2011) 2-16.
2. Collins M. D., Gibson G. R. - Probiotic, prebiotic, and synbiotic: approaches for modulating the microbial ecology of the gut, *Am. J. Clin. Nutr.* **69** (Suppl) (1999) 1052-1057.
3. Gabriella C. and Cutting S. - *Bacillus* probiotic: spore germination in the gastrointestinal tract, *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (5) (2002) 2344-2352.
4. Hoa T. T., Duc, L. H., Isticato R., Baccigalupi L., Ricca E., Van P. H. and Cutting S. M. - The fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 3819-3823.
5. Hsu C. K., Liao J. W., Chung Y. C., Hsieh C., Chan Y. C. - Xylooligosaccharides and fructooligosaccharide affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats, *J. Nutri.* **134** (2004) 1523-1528.
6. Kanamori Y., Hashizume K., Sugiyama M., Mortomi M Yuki N., Tanaka R. - A novel synbiotic therapy dramatically improved the intestinal function of a pediatric patient with

- laryngotracheo-esophageal cleft (LTEC) in the intensive care unit, Clin. Nutr. **21** (6) (2002) 527-30.
7. Mach T. - Clinical usefulness of probiotic in inflammatory bowel diseases, J. Physiol. Pharmacol: an Official Journal of the Polish Physiological Society **57** (9) (2006) 23–33.
 8. Moura, P., Barata, R., Carvalheiro, F., Gírio, F., Loureiro-Dias M., and Esteves, P., - *In vitro* fermentation of xylooligosaccharide from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains, LWT – Food Sci. Technol. **40** (6) (2007) 963-972.
 9. Skoog K., Hahn-Hägerdal B. - Xylose fermentation, Enzyme Microbial. Technol. **10** (2) (2010) 66–80.

ABSTRACT

XYLOOLIGOSACCHARIDES (XOS) FERMENTATION BY *BACILLUS*

Hoang Phuong Ha¹, Pham Thi Thu Phuong¹, Tran Thi Nhung¹, Nguyen Thi Van Anh²,
Nguyen Hoa Anh², Nguyen Thi Mai Phuong^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

²*Hanoi University of Sciences, HUS*

*Email: phuong_nguyen_99@yahoo.com

Bacillus are now available in the probiotics for human use, for example *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*. An attractive characteristic of *Bacillus* for probiotic preparations is its spore formation. The spores can germinate into vegetative cells and grow in the anaerobic conditions of the human gastrointestinal tract, maintaining a healthy flora in the gut. Spore probiotic is stable in a wide range of pH, from acid at stomach to light alkaline in the gut. Therefore, oral supplementations of living spores provide a useful supply of beneficial bacteria for gut and are being used in a surprisingly large number of probiotic preparations.

Xylooligosaccharide (XOS) is oligomers of xylose. The market for XOS is increasing due to its technological advantages compared to other oligosaccharides. XOS is also a fermentable substrate for *Bifidobacteria* và *Lactobacillus*, which are commonly exist in the gut. However, so far no evidence on XOS metabolism by *Bacillus* has been reported. Our data indicated that among five *Bacillus* examined, *B. subtilis* HU58 was the best strain in digesting XOS with utilization capacity of total XOS supplied being about 70 %. The XOS content remaining in the LB medium culture after 24 hour growth and the TLC diagram supported this finding. XOS fermentation by *B. subtilis* HU58 also resulted in butyric acid formation. The content of this acid elevated from 0.54 % to 8.68 % after 24 hours growth in LB medium containing 0.25 % XOS. Thus, this is first time *B. subtilis* HU58 was found to metabolize XOS, suggesting that this oligosaccharide and *B. subtilis* HU58 could be used for a new synbiotic preparation.

Keywords: xylooligosaccharide (XOS), *B. subtilis* HU58, probiotics, butyric acid.