

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP-HCM
TRUNG TÂM THÔNG TIN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



BÁO CÁO PHÂN TÍCH XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ

Chuyên đề:

**XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG CHỦNG LỢI KHUẨN
PROBIOTIC TRONG Y HỌC VÀ THỰC PHẨM CHỨC NĂNG**



Biên soạn: Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ TP. HCM

Với sự cộng tác của:

✦ PGS.TS. Trần Cát Đông
Đại học Y Dược TP.HCM

TP. Hồ Chí Minh, 08/2015

MỤC LỤC

I. TỔNG QUAN VỀ PROBIOTIC - XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG	3
1. Khái niệm, định nghĩa	3
2. Probiotic - Lợi khuẩn	6
3. Xu hướng tìm kiếm chủng mới	8
4. Xu hướng tìm kiếm chức năng mới	12
5. Xu hướng dạng chế phẩm	13
6. Phạm vi, lĩnh vực ứng dụng	17
II. XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG PROBIOTIC TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ.....	20
1. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế liên quan đến Probiotic theo thời gian ...	20
2. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế liên quan đến Probiotic ở các quốc gia.	20
3. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế liên quan đến probiotic theo các hướng nghiên cứu:	22
III. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU VỀ PROBIOTIC TẠI ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP.HCM.....	24
1. Bacillus làm probiotic	24
2. Dự án Colorsproes: Probiotic sinh carotenoid	25
3. Probiotic sinh chất chống oxi hóa	32
4. Nghiên cứu ứng dụng, chức năng	40
5. Nghiên cứu chế phẩm yogurt chứa vi khuẩn sinh carotenoid.....	54
6. Các nghiên cứu đang thực hiện.....	55
TÀI LIỆU THAM KHẢO	57

XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG CHỨNG LỢI KHUẨN PROBIOTIC TRONG Y HỌC VÀ THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

I. TỔNG QUAN VỀ PROBIOTIC - XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG

1. Khái niệm, định nghĩa

1.1. Hệ vi sinh vật đường ruột

Hệ vi sinh vật đường ruột người bao gồm khoảng 10^{14} vi khuẩn và ước tính lên đến 1000 – 1150 loài vi khuẩn khác nhau với tổng khối lượng khoảng 1 – 1.5 kg [1]. Các quần xã vi sinh vật được tìm thấy trong các ổ sinh thái (ecological niche) rất đa dạng, bao gồm các bề mặt niêm mạc của hệ tiêu hóa, niệu sinh dục, đường hô hấp trên (họng-mũi xoang) và đường hô hấp. Dạ dày và tá tràng có pH rất thấp nên là nơi có mật độ vi sinh vật thấp nhất (khoảng 10^4 tế bào/ml dịch). Đi dần xuống ruột non thì mật độ vi sinh vật tăng dần do pH của ruột tăng dần lên. Ruột già là nơi có mật độ vi sinh vật cao nhất với trung bình 10^{11} tế bào vi khuẩn trong 1 gam phân. Thành phần các loại vi sinh vật cũng thay đổi theo từng phân đoạn của đường tiêu hóa. Cho đến nay chỉ có 8 ngành vi khuẩn (bacterial phyla) được tìm thấy trong hệ đường ruột người. Các ngành vi khuẩn chiếm ưu thế nhất là ngành vi khuẩn Gram âm *Bacteroidetes* (trong đó chi *Bacteroides* chiếm tới 9 – 42% tổng số vi khuẩn trong hệ đường ruột người) và ngành vi khuẩn Gram dương *Firmicutes* (trong đó các chi *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*). Tổng số vi khuẩn của hai ngành này có thể đại diện cho hơn 90% nhóm vi sinh vật trong ruột của con người [2].

Mỗi cá thể vật chủ là nơi cư trú đặc trưng của một tập hợp các loài vi khuẩn, bao gồm ít nhất 57 loài vi khuẩn lõi được coi là chung ở tất cả các cá thể người, giúp duy trì một trạng thái cân bằng tương đối phức tạp theo thời gian từ ngày này qua ngày khác và thậm chí qua các năm. Nếu xảy ra sự thay đổi trong các ổ sinh thái bền vững thì có thể dẫn đến hoặc là cảm ứng khả năng gây bệnh đặc trưng (như mất cân bằng hệ vi sinh ở các mức độ trao đổi chất, thoái hóa hoặc miễn dịch) hoặc là có cơ chế ngăn ngừa bệnh xảy ra (như hoạt tính probiotic giúp cải thiện cân bằng hệ vi sinh ở các mức độ tương tự) [3].

Sự đa dạng của hệ vi sinh vật đường ruột là tương đối đơn giản ở trẻ em nhưng trở nên phức tạp hơn khi tuổi tác ngày càng tăng và đạt tới một mức độ phức tạp cao ở người lớn [4]. Trong hệ vi sinh vật bản địa của trẻ sơ sinh có một

hoặc một vài chi vi khuẩn chiếm ưu thế. Trong số này, ở những trẻ bú sữa mẹ, các chủng *Bifidobacterium* chiếm ưu thế nhất, do đó hệ vi sinh vật đường ruột được thành lập ngay sau khi sinh. Tỷ lệ số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium* ngày càng giảm khi độ tuổi của con người ngày càng tăng. Ở người lớn, chi vi khuẩn này có mật độ tế bào cao thứ ba (chiếm 25% tổng số vi sinh vật đường ruột), xếp sau các chi vi khuẩn ưu thế nhất là *Bacteroides* và *Eubacterium* [5].

1.2. Chức năng sinh lý của hệ vi sinh đường ruột

Người ta ngày càng nhận thức được vai trò của hệ vi sinh vật đường ruột đối với sức khỏe con người. Những nỗ lực đáng kể đã được thực hiện nhằm khám phá vai trò cộng sinh phức tạp của hệ vi sinh vật đường ruột đối với chức năng sinh lý của vật chủ. Các chức năng sinh lý cơ bản của hệ vi sinh vật đường ruột là: (i) chức năng bảo vệ niêm mạc ruột bao gồm ngăn ngừa các bệnh nhiễm trùng niêm mạc bằng cách ức chế các tác nhân gây bệnh xâm nhập và duy trì một hàng rào ruột nguyên vẹn; (ii) chức năng trao đổi chất bao gồm nội cân bằng năng lượng, tiêu hóa và tích lũy sinh học các chất dinh dưỡng, hỗ trợ chuyển hóa chất béo, lên men các carbohydrate không tiêu hóa được, đồng thời sản xuất các acid béo chuỗi ngắn (SCFA); (iii) chức năng điều hòa miễn dịch bao gồm điều hòa thần kinh ruột, duy trì nội cân bằng biểu mô đường ruột và điều hòa miễn dịch ở niêm mạc, trong đó hệ vi sinh vật hoạt động như một nguồn kích thích miễn dịch quan trọng [6].

1.3. Cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột

Hệ vi sinh vật đường ruột được biết đến với vai trò đặc biệt quan trọng đối với cơ thể vật chủ như: bảo vệ niêm mạc ruột, hỗ trợ tiêu hóa, điều hòa miễn dịch ..., nhưng chúng cũng là nguyên nhân chính gây ra một số bệnh cho cơ thể như tiêu chảy, ung thư ruột kết, ung thư dạ dày ... Ảnh hưởng có lợi hay có hại của hệ vi sinh vật đường ruột đối với vật chủ phụ thuộc vào “trạng thái cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột” [6]. Cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột (gut flora balance, euobiosis) là trạng thái chung sống có lợi giữa các vi sinh vật với nhau và với vật chủ. Đây chính là trạng thái bình thường của hệ vi sinh vật đường ruột ở vật chủ khỏe mạnh. Cân bằng của hệ vi sinh vật trong đường tiêu hóa bị tác động bởi một số nhân tố như: trạng thái sinh lý vật chủ, khẩu phần thức ăn và thành phần hệ vi sinh vật. Bất kể một thay đổi nào của các yếu tố trên cũng làm cho trạng thái cân bằng của hệ vi sinh đường ruột bị phá vỡ. Mất cân bằng vi sinh đường ruột (gut flora imbalance, dysbiosis) là trạng thái chung sống có hại giữa các vi sinh vật với nhau và với vật chủ, gây ra bệnh cho vật chủ.

1.4. Một số khái niệm

Thực phẩm chức năng, được công bố có lợi ích đối với sức khỏe: thực phẩm bổ sung dinh dưỡng (thực phẩm bổ sung) / thực phẩm tăng cường vi chất dinh dưỡng / thực phẩm dinh dưỡng y học / thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

-**Thực phẩm bổ sung (Supplemented Food)** là thực phẩm thông thường được bổ sung vi chất và các yếu tố có lợi cho sức khỏe như vitamin, khoáng chất, axit amin, axit béo, enzym, probiotic, prebiotic và chất có hoạt tính sinh học khác.

-**Thực phẩm dinh dưỡng y học / mục đích y tế đặc biệt (Food for Special Medical Purposes, Medical Food)** là loại thực phẩm có thể ăn bằng đường miệng hoặc bằng ống xông, được chỉ định để điều chỉnh chế độ ăn của người bệnh và chỉ được sử dụng dưới sự giám sát của nhân viên y tế.

-**Thực phẩm bảo vệ sức khỏe (Health Supplement, Food Supplement, Dietary Supplement)** là sản phẩm được chế biến dưới dạng viên nang, viên hoàn, viên nén, cao, cốm, bột, lỏng và các dạng chế biến khác có chứa một hoặc hỗn hợp của các chất sau đây: (a) Vitamin, khoáng chất, axit amin, axit béo, enzym, probiotic và chất có hoạt tính sinh học khác; b) Hoạt chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên từ động vật, chất khoáng và nguồn gốc thực vật ở các dạng như chiết xuất, phân lập, cô đặc và chuyển hóa.

-**Thực phẩm dùng cho chế độ ăn đặc biệt (Food for Special Dietary Uses)** dùng cho người ăn kiêng, người già và các đối tượng đặc biệt / được chế biến / phối trộn theo công thức đặc biệt / đáp ứng các yêu cầu về chế độ ăn đặc thù theo thể trạng hoặc theo tình trạng bệnh lý và các rối loạn cụ thể của người sử dụng.

Thực phẩm tăng cường (fortified food) là thực phẩm được bổ sung vi chất.

Dược thực phẩm (nutraceutical) là chất có nguồn gốc thực phẩm, có dạng dùng và cách dùng của dược phẩm.

Dược mỹ phẩm (cosmeceutical) là mỹ phẩm chứa chất có hoạt tính sinh học.

Probiotic là các vi sinh vật sống khi được bổ sung một lượng vừa đủ sẽ có tác động có lợi lên sức khỏe vật chủ.

Prebiotic là những thành phần có thể lên men được có khả năng làm thay đổi thành phần và/hoặc hoạt tính của hệ vi sinh vật đường ruột, mang lại thể trạng và sức khỏe tốt cho vật chủ.

Synbiotic là những thành phần dinh dưỡng bổ sung có chứa probiotic và prebiotic.

Postbiotics là những sản phẩm vi sinh vật không sống hoặc các sản phẩm được tạo ra trong quá trình trao đổi chất của một vi sinh vật probiotic, có hoạt tính sinh học đối với vật chủ.

Công bố chức năng:

-**Công bố dinh dưỡng:** có đặc tính dinh dưỡng có lợi: “ít béo”, “không đường”, “giàu chất xơ”, ...

-**Công bố sức khỏe:** có lợi ích sức khỏe khi sử dụng: tăng cường miễn dịch, khả năng học tập, phát triển chiều cao, giảm béo, ...

-**Công bố giảm nguy cơ (bệnh tật):** tim mạch, ung thư, viêm khớp, ...

-**Bằng chứng khoa học** bởi cơ quan có thẩm quyền về NCKH, tạp chí KH, tài liệu về y học cổ truyền, cây thuốc, vị thuốc trong ấn bản khoa học.

Lượng dùng khuyến cáo là nhu cầu dinh dưỡng khuyến nghị cho người Việt Nam do Viện Dinh dưỡng quốc gia (Bộ Y tế) công bố.

GRAS (Generally Regarded As Safe) là chứng nhận của FDA (Hoa Kỳ) xác nhận tình trạng an toàn của một chất theo ý kiến các chuyên gia để có thể bổ sung vào thực phẩm.

QPR (Qualified Presumption of Safety) là chứng nhận của EFSA (Châu Âu) khuyến nghị một tác nhân sinh học là an toàn trước khi đưa ra thị trường.

2. Probiotic - Lợi khuẩn

2.1. Probiotic

Probiotic là các vi sinh vật sống và có lợi, được bổ sung vào đường tiêu hóa của vật chủ với một lượng vừa đủ nhằm cải thiện cân bằng của hệ vi sinh đường ruột, ức chế các vi sinh vật có hại, từ đó cải thiện sức khỏe của vật chủ. Hiện nay đã có rất nhiều chế phẩm probiotic sử dụng cho người và động vật nuôi đã được thương mại hóa, trong đó thường chứa các chủng vi khuẩn lactic (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ...), nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, ...), và các vi khuẩn khác (*E. coli*, *Bacillus*, *Lactococcus*, ...) [7]. Probiotic có thể được sản xuất dưới dạng chế phẩm probiotic hoặc được bổ sung vào thức ăn. Sự có mặt của

probiotic trong đường tiêu hóa có tác dụng cạnh tranh, ức chế và loại trừ các vi sinh vật có hại trong đường ruột, duy trì hệ vi sinh đường ruột ở trạng thái cân bằng. Cơ chế cạnh tranh và loại trừ vi sinh vật gây bệnh của probiotic bao gồm: cạnh tranh vị trí bám dính, cạnh tranh nguồn dinh dưỡng, sản sinh các chất ức chế, kích thích hệ miễn dịch, ...

2.2. Yêu cầu của một chủng probiotic:

2.2.1. Yêu cầu chung

Nói chung các vi sinh vật được lựa chọn làm probiotic phải đáp ứng được các tiêu chuẩn về an toàn, chức năng và đặc tính kỹ thuật. Trước khi một probiotic có thể mang lại những lợi ích trên sức khỏe con người chúng phải đáp ứng được các chỉ tiêu sau:

-Chủng vi sinh vật phải có những đặc điểm phù hợp với công nghệ để có thể đưa vào sản xuất.

-Có khả năng sống và không bị biến đổi chức năng khi đưa vào vào sản phẩm.

-Không gây các mùi vị khó chịu cho sản phẩm.

-Các vi khuẩn sống phải đến được nơi tác động, nghĩa là các vi sinh vật phải có khả năng sống sót khi đi qua đường tiêu hóa (dạ dày-ruột non) nếu được sử dụng qua đường này.

-Có khả năng thực hiện chức năng trong môi trường nơi chúng được định hướng.

2.2.2. Yêu cầu an toàn:

Những tiêu chuẩn an toàn về probiotic gần đây được đề cập rất nhiều, bao gồm những điểm cụ thể sau:

-Có nguồn gốc rõ ràng, định danh chính xác

-Được chứng minh là không có khả năng gây bệnh (GRAS, QPS).

-Không liên quan tới bệnh tật, ví dụ như nhiễm trùng nội mạc cơ tim, hay gây rối loạn tiêu hóa.

-Đặc điểm di truyền ổn định.

-Không mang các gen đề kháng kháng sinh có thể truyền được.

2.2.3. Yêu cầu chức năng:

Những yêu cầu về chức năng của probiotic cần được chứng minh bằng các phương pháp thử nghiệm trên in vitro, và kết quả của những nghiên cứu này phải thể hiện trong những nghiên cứu có kiểm soát trên người. Khi lựa chọn một chủng probiotic thì các yếu tố chức năng cần được quan tâm là:

- Có khả năng dung nạp với acid và dịch vị của người
- Có khả năng dung nạp với muối mật
- Có khả năng bám dính vào bề mặt niêm mạc ruột và tồn tại lâu dài trong đường tiêu hóa
- Có khả năng kích thích miễn dịch nhưng không có tác động gây viêm
- Có khả năng cạnh tranh với hệ vi sinh vật tự nhiên
- Sản xuất các chất kháng sinh vi sinh vật (ví dụ bacteriocin, hydrogen peroxide, acid hữu cơ)
- Có hoạt tính đối kháng với tác nhân gây bệnh như *Helicobacter pylori*, *Samonella sp.*, *Listeria monocytogenes* và *Clostridium difficile*...
- Có khả năng chống đột biến và các yếu tố gây ung thư
- Các lợi ích khác được chứng minh một cách khoa học

2.2.4. Yêu cầu công nghệ:

Một chủng probiotic đã thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu về tính an toàn cũng như chức năng thì tiêu chí công nghệ vẫn là một yếu tố cực kỳ quan trọng. Các yếu tố công nghệ cần phải xem xét khi lựa chọn một probiotic bao gồm: Có những đặc tính tốt về cảm quan.

- Đề kháng với thực khuẩn.
- Dễ sản xuất: tăng trưởng đủ mạnh, dễ thu hoạch.
- Có khả năng sống sót trong quá trình sản xuất.
- Ổn định trong quá trình sản xuất và bảo quản.
- Có thể đánh giá chất lượng khi được trộn vào sản phẩm cuối cùng.

3. Xu hướng tìm kiếm chủng mới

3.1. Nhu cầu chủng mới:

Hầu hết các probiotic hiện nay được sử dụng để phòng ngừa, điều trị các tình trạng liên quan đến sức khỏe, bị giới hạn trong các chủng *Lactobacillus* và

Bifidobacterium. Các vi khuẩn này gọi chung là các vi khuẩn lactic, được xếp vào các chủng vi khuẩn probiotic truyền thống. Các chủng vi khuẩn này được lấy từ các sản phẩm lên men truyền thống như sữa chua, rau cải chua, ... Vì đã được sử dụng rất lâu đời, các chủng vi khuẩn này cho thấy tính an toàn và có lợi đối với sức khỏe vật chủ. Các chủng vi khuẩn này được sử dụng như là các sản phẩm thực phẩm, do vậy mà việc định danh các chủng không rõ ràng, thiếu các bằng chứng khoa học và không thích hợp cho dạng chế phẩm hiện đại. Cùng với cách sử dụng truyền thống, các ảnh hưởng có lợi chỉ được đánh giá về phương diện sức khỏe chung chung, chưa có những nghiên cứu đánh giá về một chức năng cụ thể.

Việc phân lập thuần chủng các vi sinh vật probiotic và việc tìm kiếm chủng mới sẽ phần nào giải quyết được những hạn chế của các chủng truyền thống. Việc phân lập chủng thuần và tìm kiếm chủng mới giúp các nhà nghiên cứu có được các bằng chứng khoa học cụ thể, nghiên cứu và đánh giá được chức năng của một chủng vi sinh vật. Nhờ đó, có cơ sở khoa học để cho ra đời các sản phẩm đa dạng hơn, với đối tượng sử dụng cũng được mở rộng. Và hơn hết, với việc sở hữu một chủng vi khuẩn probiotic có nguồn gốc và những chứng cứ khoa học rõ ràng sẽ giúp cho chủ sở hữu có những lợi thế cạnh tranh nhất định trong việc phát triển sản phẩm và việc đăng ký sở hữu trí tuệ được dễ dàng.

3.2. Những nguồn phân lập mới

Trước đây, nguồn phân lập chủng probiotic chủ yếu từ hệ đường ruột của vật chủ (người, động vật), các thực phẩm lên men truyền thống (yogurt, sữa). Ngày nay, các vi sinh vật probiotic có nguồn gốc mới hơn như da, âm đạo, miệng của người, các sinh vật thủy sản (cá, tôm, sinh vật biển), thực phẩm (bơ, phô mai, chocolate, ...), đất, nước, biển, thực vật, ... Những nguồn chủng mới này cho phép phân lập được các chủng mà trước đây chưa từng được sử dụng làm probiotic, cũng như có các đặc tính và ứng dụng mới.

3.3. Phân loại các chủng mới

Về mặt phân loại, các chủng vi khuẩn probiotic mới được phân thành các nhóm như sau:

-VK lactic: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Sporolactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* ...

-Nấm men: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Isaatchenkia*...

-Vi khuẩn Gram âm: *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Roseobacter*, *Escherichia*...

-Vi khuẩn Gram dương: *Bacillus*, *Faecalibacterium*, *Clostridium*

Trong đó, các chủng vi sinh vật probiotic thế hệ mới được nghiên cứu gần đây bao gồm *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridia clusters* IV, XIVa, và XVIII, *Akkermansia muciniphila* và *Bacteroides uniformis* - ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật này đã được đánh giá trên các thử nghiệm tiền lâm sàng, hứa hẹn nhiều kết quả tốt trong trị liệu các bệnh viêm ruột và béo phì [8-10].

3.4. Một số nghiên cứu phân lập chủng mới:

Faecalibacterium prausnitzii

F. prausnitzii là vi khuẩn kỵ khí thuộc họ *Clostridiaceae*, là thành viên của hệ vi sinh vật đường ruột ở người khỏe mạnh. Ở những bệnh nhân bị bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD) thì luôn thiếu *F. prausnitzii*. Nghiên cứu của Qiu 2013, cho thấy *F. prausnitzii* và những chất chuyển hóa của nó có khả năng điều trị IBD khi so sánh với *Bifidobacterium longum* trên cả mô hình tế bào và thú thử nghiệm [11].

Akkermansia muciniphila

A. muciniphila là vi khuẩn Gram âm, kỵ khí tuyệt đối, không di động, không sinh bào tử, chiếm khoảng 3-5% hệ vi sinh vật đường ruột ở người khỏe mạnh. Trong mô hình chuột bị béo phì do cảm ứng chế độ ăn thiếu leptin và chuột có chế độ ăn giàu chất béo, *A. muciniphila* giảm lần lượt là 3300 lần và 100 lần so với chuột đối chứng. Trong thí nghiệm này, *A. muciniphila* có vai trò cải thiện những rối loạn chuyển hóa ở chuột trong mô hình tiểu đường và béo phì. Việc ứng dụng *A. muciniphila* trong phòng ngừa, điều trị bệnh tiểu đường type 2, bệnh béo phì và những bệnh liên quan đến chuyển hóa là một hướng đi nhiều triển vọng [10, 12].

Bacteroides uniformis

B. uniformis CECT 7771 là vi khuẩn Gram âm, không sinh bào tử, thuộc hệ vi khuẩn đường ruột của người. Thí nghiệm trên mô hình chuột béo phì do chế độ ăn giàu chất béo, vi khuẩn *B. uniformis* CECT 7771 có những ảnh hưởng có lợi và làm cải thiện các chuyển hóa trong cơ thể như giảm cân nặng, chứng gan nhiễm mỡ, giảm nồng độ cholesterol và triglyceride ở gan, làm tăng các acid béo mạch ngắn. Chủng vi khuẩn này cũng làm giảm glucose, cholesterol và triglyceride huyết thanh, giảm hấp thu chất béo từ khẩu phần ăn. Ngoài ra, vi

khuẩn này còn giúp cải thiện đáp ứng miễn dịch của cơ thể bằng cách gia tăng sản xuất TNF- α bởi tế bào tua đáp ứng với sự kích thích của LPS và tăng sự thực bào [13].

Probiotic từ miệng

Các vi khuẩn thuộc hệ vi sinh vật ở miệng gồm *L. crispatus* YIT 12319, *L. fermentum* YIT 12320, *L. gasseri* YIT 12321, và *S. mitis* YIT 12322 được phân lập từ các mảng bám ở cổ răng và lưỡi từ những người Nhật tình nguyện khỏe mạnh. Các vi khuẩn này được xem như các chủng probiotic đầy tiềm năng khi các nhà khoa học thấy rằng các vi khuẩn này không có khả năng sinh các hợp chất hợp chất khí sulfur (Volatile Sulfur Compounds, VSCs). Những chất sulfur dễ bay hơi như hydrogen sulfide (H_2S), methyl mercaptan (CH_3SH), dimethylsulfide (CH_3SCH_3), hoặc dimethyl disulfide được sinh ra bởi các vi khuẩn ở miệng khi chuyển hóa những thức ăn trong các mảng bám ở răng và lưỡi. Các VSC được xem như là nguyên nhân chủ yếu trong chứng hơi thở hôi. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn này còn được chứng minh khả năng đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh trong miệng, khả năng bám dính cao vào các tế bào biểu mô niêm mạc miệng trong in vitro, không có tiềm ẩn khả năng gây sâu răng như vôi răng và làm giảm nguy cơ nhiễm trùng nội tâm mạc trên mô hình chuột. Đây quả thực là một hướng nghiên cứu nhiều tiềm năng trong việc áp dụng các probiotic này trong nha khoa với nhiều đặc tính có lợi cho răng miệng và hoàn toàn vô hại [14].

Các vi sinh vật khác

Các vi sinh vật cung cấp chất hữu ích cho cơ thể (chất chuyển hóa, enzym) như:

- Carotenoid: tiền vitamin A, chống oxi hóa, giảm nguy cơ tim mạch, ung thư, tăng cường hấp thu sắt, giảm nguy cơ thiếu máu do thiếu sắt.

- Chất chống oxi hóa: bảo vệ gan, chống sốc nhiệt, giảm nguy cơ tim mạch, ung thư, chống lão hóa.

- Các enzym: hỗ tiêu hóa, phân giải phytate

Các vi sinh vật này bao gồm:

- *Bacillus subtilis* B6: sinh phytase

- *Bacillus* sinh carotenoid (dự án Colorspores - Khoa Dược, ĐH Y Dược TP. HCM)

- Vi khuẩn sinh chất chống oxi hóa.

4. Xu hướng tìm kiếm chức năng mới

Trong nhiều thế kỷ qua, chế phẩm probiotic đã được sử dụng rất nhiều ở dạng các thực phẩm lên men. Ngày nay, việc sử dụng các chế phẩm probiotic ngày càng tăng dần ở các dạng sản phẩm khác nhau. Các báo cáo gần đây đều cho thấy rằng các chế phẩm probiotic có thể đóng vai trò chức năng kép, vừa là thực phẩm, vừa là các sản phẩm có nhiều lợi ích về sức khỏe cho con người.

4.1. Nhu cầu tìm kiếm chức năng:

Các chức năng truyền thống của một probiotic bao gồm: cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, phòng ngừa và điều trị tiêu chảy do loạn khuẩn, tăng cường miễn dịch, tăng cường sức khỏe chung chung. Ngày nay, do xu thế phát triển của thời đại, các sản phẩm probiotic được thương mại hóa ngày càng nhiều. Việc công bố những chức năng phải được công nhận bởi các cơ quan có thẩm quyền thông qua các bằng chứng khoa học cụ thể. Do vậy, việc đưa ra những bằng chứng khoa học về chức năng của các probiotic là rất cần thiết. Hơn nữa, bên cạnh việc nghiên cứu những chức năng đã biết, các chức năng mới cũng được nghiên cứu nhằm mở rộng ứng dụng, tăng nhu cầu và đối tượng sử dụng.

Mặc dù, việc ứng dụng probiotic trên lâm sàng khá phổ biến và quen thuộc. Và probiotic nhìn chung được dung nạp khá tốt, thậm chí ở những bệnh nhân xơ gan, như thế cũng không loại trừ những nguy cơ tiềm ẩn đặc biệt trên những bệnh nhân có thể trạng yếu hoặc suy giảm miễn dịch. Do vậy, cần có những nghiên cứu sâu hơn nữa về những khía cạnh an toàn cũng như hiệu quả điều trị của probiotic trên những đối tượng bệnh nhân này.

Hơn nữa, các lợi ích về sức khỏe của vi khuẩn probiotic đặc hiệu theo chủng. Vì thế, không có một chủng vi khuẩn probiotic toàn năng nào có thể mang lại tất cả lợi ích đã được đưa ra và không phải tất cả các chủng của cùng loài đều có hiệu quả giống nhau.

4.2. Một số chức năng mới:

Các bệnh đường ruột:

Viêm ruột hoại tử, dự phòng tiêu chảy do nhiễm trùng ở trẻ em, dự phòng tiêu chảy do loạn khuẩn (AAD), dự phòng tái phát tiêu chảy do Clostridium difficile (CDAD), tiêu chảy do xạ trị, hội chứng ruột kích thích (IBS), viêm loét đại tràng, Crohn's disease, hội chứng không dung nạp lactose, táo bón.

Viêm nhiễm và dị ứng:

Đôi kháng các tác nhân nhiễm trùng, nhiễm trùng đường tiêu, nhiễm trùng hô hấp, viêm họng, AIDS, viêm khớp, dị ứng, hen suyễn.

Các bệnh liên quan đến tim mạch và chuyển hóa:

Nhồi máu cơ tim, giảm cholesterol, chống cao huyết áp, béo phì và các biến chứng.

Bệnh về gan, tụy:

Bệnh não gan, bệnh gan mạn tính, xơ gan do rượu, viêm tụy cấp, tiểu đường typ 2.

Các bệnh ung thư:

Ung thư ruột kết, ung thư dạ dày.

Cung cấp các chất cho cơ thể:

Vitamin, khoáng chất, carotenoid, chất chống oxi hóa, tăng cường hấp thu sắt, enzym.

5. Xu hướng dạng chế phẩm

5.1. Thực phẩm probiotic:

5.1.1. Các sản phẩm từ sữa:

Sản phẩm từ sữa là một nhóm lớn các sản phẩm có khả năng mang và vận chuyển các vi khuẩn probiotic, trong số đó, sữa lên men và phô mai được tiêu thụ nhiều nhất trên thế giới. Sữa và các sản phẩm từ sữa có đặc tính dinh dưỡng riêng biệt, cụ thể là hàm lượng lactose cao cho phép các probiotic sống sót và phát triển. Ngoài ra, một số sản phẩm sữa, đặc biệt là sữa lên men và phô mai, do một số đặc điểm của chúng như pH và khả năng đệm, cấu trúc mạng lưới dày đặc, và hàm lượng chất béo cao giúp tăng cường sự bảo vệ cho các vi sinh vật trong quá trình di chuyển qua hệ tiêu hoá, đặc biệt là chống lại môi trường axit của dạ dày. Một số dạng chế phẩm từ sữa phổ biến như sữa lên men dạng lỏng, sữa chua, phô mai, ..

- Sữa lên men dạng lỏng là một thực phẩm truyền thống, được tạo ra nhằm kéo dài thời gian sử dụng của các loại sữa khác nhau như bò, cừu, dê, ngựa, trâu, lạc đà. Ngày nay, sữa lên men được sản xuất và tiêu thụ rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới.

- Các sản phẩm đồ uống từ sữa bổ sung probiotic thương mại cho thấy các chủng vi khuẩn được ứng dụng nhiều nhất là *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* và *L. plantarum*. Sự hiện diện của chất xơ từ cam quýt trong các sữa

lên men đã được chứng minh là làm tăng cường sự sinh trưởng và tồn tại của vi khuẩn probiotic trong các sản phẩm sữa lên men. Và việc thêm bột mầm đậu nành có thể giải phóng các isoflavone có hoạt tính sinh học quan trọng trong suốt quá trình lên men mà có thể bảo vệ *L. reuteri* khỏi tính độc của muối mật trong ruột non. Ngoài ra, sự chọn lọc các chủng probiotic và tối ưu hoá các điều kiện sản xuất đều vô cùng quan trọng cho sự tồn tại của vi khuẩn probiotic trong sữa lên men [15].

- Sữa chua là một trong những nguồn probiotic đầu tiên và cho đến nay vẫn còn được sử dụng phổ biến. Sữa chua được sản xuất bằng việc sử dụng dịch nuôi cấy của *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Ngoài ra đôi khi các vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* được thêm vào trong hoặc sau quá trình lên men. Mặc dù sữa chua được sử dụng rộng rãi như là chất mang probiotic, nhưng hầu hết các sản phẩm sữa chua thương mại lại có số lượng tế bào thấp tại thời điểm sử dụng. Khả năng tồn tại của probiotic trong sữa chua phụ thuộc vào các dưỡng chất sẵn có, các chất kích thích và ức chế sinh trưởng, nồng độ các chất hoà tan, lượng giống, nhiệt độ ủ, thời gian lên men và nhiệt độ bảo quản. Để cải thiện khả năng tồn tại và ổn định của các chủng probiotic trong sữa chua, một số nghiên cứu đã đưa ra các phương pháp như: cố định vi khuẩn probiotic trong các hạt alginate, alginate được bao bởi chitosan, alginate tinh bột, alginate-prebiotic, alginate-pectin hoặc bằng cách thêm các prebiotic hoặc cysteine vào sữa chua [16].

- Phô mai được xem là một chất mang tốt của vi khuẩn probiotic vì nó cho phép sự di chuyển và sống sót của chúng qua đường tiêu hoá của người sử dụng. Thêm vào đó, đặc tính cảm quan, các giá trị dinh dưỡng và sự phù hợp của phô mai với nhiều nhóm đối tượng sử dụng có độ tuổi khác nhau làm gia tăng tầm quan trọng của loại thực phẩm chức năng từ sữa này. Việc lựa chọn các chủng vi khuẩn là rất quan trọng trong sự phát triển các sản phẩm phô mai chứa probiotic. Các chủng probiotic chủ yếu được sử dụng trong các loại phô mai bao gồm: *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Enterobacteria*, *Lactococci* [15].

5.1.2. Các sản phẩm không từ sữa

-Nước trái cây bổ sung probiotic ngày càng được quan tâm nhiều hơn bởi nhiều nguyên do. Trước tiên, nước trái cây bổ sung probiotic sẽ thay thế các sản phẩm sữa có probiotic vì có thể thỏa mãn các đối tượng dị ứng và không dung nạp sữa. Ngoài ra, nước trái cây còn có hàm lượng calo thấp, cholesterol thấp hơn các chế phẩm từ sữa nên được người tiêu dùng có nhu cầu năng lượng thấp ưa chuộng hơn. Ngoài việc dị ứng với các sản phẩm từ sữa, các yếu tố khác như

truyền thống và các lý do kinh tế hạn chế việc tiêu thụ các sản phẩm sữa ở các nước như Trung Quốc hay Nhật Bản cũng cố cho nhu cầu về các sản phẩm không làm từ sữa thay thế để cung cấp probiotic [17].

-Sản phẩm thực phẩm probiotic khác bao gồm các sản phẩm probiotic khô như ngũ cốc ăn sáng, công thức cho trẻ sơ sinh, và các công thức sữa khô với trái cây sấy khô hoặc sản phẩm có hàm lượng lipid cao như sô cô la. Trong số các sản phẩm này, bao vi nang đã được báo cáo là một cách nâng cao tính khả thi, cụ thể là trong các sản phẩm với môi trường khắc nghiệt, ví dụ như probiotic trong sữa chua đông lạnh khô, trong sữa bột phun khô... Một số loại trái cây sấy khô đã được sử dụng để kết hợp các vi khuẩn probiotic.

-Rau quả lên men bao gồm atisô, bắp cải, ô liu, cà chua, củ cải đỏ... được xem là các chất mang probiotic tốt dựa vào khả năng lên men lactic bởi *L. plantarum* và các chủng vi khuẩn lactic khác. Việc sử dụng probiotic trong rau lên men đòi hỏi nhiệt độ bảo quản sản phẩm thấp [16]. Các sản phẩm probiotic từ đậu nành cũng được các nhà nghiên cứu quan tâm do hàm lượng protein cao và nhiều lợi ích về sức khỏe. Natto là sản phẩm probiotic từ đậu nành lên men, được dùng như một món ăn với đậu nành khô được tráng với một loại bột trắng mịn của *Bacillus subtilis* var. Natto, các thành phần hoạt chất cần thiết cho ra các hương vị và kết cấu của Natto. Tuy nhiên, những lợi ích sức khỏe liên quan với Natto bao hàm việc tiêu thụ đậu nành và các loại vi khuẩn, chứ không phải chỉ là *B. subtilis* var. Natto [18].

-Chocolate cũng là một chất mang tốt cho probiotic. Possemiers và cs. (2010) đề xuất chocolate đen và chocolate sữa là chất mang của hỗn hợp *L. helveticus* CNCM I-1722 và *B. longum* CNCMI-3470. Cả hai chocolate cung cấp sự bảo vệ cao hơn sữa thường (91% và 80% sống sót trong chocolate sữa cho *L. helveticus* và *B. longum*, tương ứng, so với 20% và 31%). Các lớp phủ probiotic trong chocolate có thể tạo thành một chiến lược tuyệt vời cho phép bảo vệ probiotic trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt. [19].

5.2. Dạng dược phẩm

Probiotic phải có khả năng phát triển trong điều kiện gia công công nghiệp và tồn tại, duy trì chức năng của chúng trong quá trình bảo quản. Các sản phẩm probiotic đầu tiên chủ yếu là các công thức dạng lỏng, cho thấy khả năng di động thấp sau khi uống, chủ yếu là bởi vì vi khuẩn không thể sống sót trong điều kiện dạ dày. Ngày nay, sự phát triển của các dạng bào chế rắn phù hợp cho phép đạt được mức độ cao hơn của sự tồn tại của vi khuẩn [15].

Dạng bào chế có thể là viên nang, viên nén, dạng bột (trong gói) hoặc lỏng theo liều lượng, và dạng bào chế dược phẩm, bao gồm gel hoặc thuốc nhỏ mắt.

5.2.1. Một số chế phẩm dạng rắn bao gồm:

- Bột đường uống là dạng bào chế rắn, khô, hạt mịn (Eur Pharmacopeia 2008; USP31 2008). Chúng có thể chứa các probiotic và/ hoặc các tá dược khác như chất tạo màu, hương liệu, và các chất tạo ngọt. Bột chứa probiotic thường được sử dụng để phân tán trong nước.

- Viên nang là dạng bào chế rắn với vỏ cứng hay mềm hoặc vỏ làm từ gelatin hay từ vật liệu thích hợp khác (Eur Pharmacopeia 2008; USP31 2008). Viên nang cứng thường được ưa thích để sản xuất probiotic.

- Viên nén có chứa probiotics được sản xuất bằng cách nén trực tiếp hỗn hợp tá dược và probiotic đông khô. Viên nén có thể được thiết kế để tăng cường sự phân tán và độ bám dính của các vi sinh vật probiotic vào niêm mạc biểu mô vật chủ bằng cách sử dụng các loại tá dược viên phù hợp [20]. Các polyme khác nhau đã được nghiên cứu để tạo thành chất nền (matrix) bảo vệ probiotic như alginate và whey protein [21].

- Thuốc đạn là một hệ thống phân phối thuốc rắn với trọng lượng khác nhau và hình dạng phù hợp để đưa vào trực tràng (thuốc nhét hậu môn), âm đạo (thuốc đạn đặt âm đạo), hoặc niệu đạo (thuốc đạn đặt niệu đạo). Thuốc đạn thường tan chảy, mềm ra, hoặc hòa tan ở nhiệt độ cơ thể (USP31 2008; Sweetman 2009).

5.2.2. Một số chế phẩm dạng lỏng bao gồm:

- Hỗn dịch uống, sirô/ sirô khô là những dạng chế phẩm có ưu điểm sử dụng thuận tiện cho trẻ em.

- Viên nhai, kẹo cao su là một hình thức cổ xưa và phổ biến rộng rãi của bánh kẹo mà gần đây đã được sử dụng như một hệ thống phân phối probiotic (Sweetman 2009) điều trị chứng hôi miệng [22].

- Viên ngậm chứa probiotic có vị ngọt, hòa tan hoặc tan rã từ từ trong miệng (USP31 2008; Sweetman 2009) điều trị viêm đường họng.

- Gel là hệ thống nửa rắn gồm các hạt vô cơ nhỏ, tạo thành một mạng lưới các hạt nhỏ rời rạc hoặc các phân tử hữu cơ lớn trong một chất lỏng mà không có ranh giới rõ ràng tồn tại giữa chúng (USP31 2008). Gel có thể được sử dụng để phân phối thuốc tại chỗ, vào cơ thể hoặc khoang miệng. Gel âm đạo thương

mại hóa chứa vài probiotic có sẵn như Trophigil® và Florgynal® chứa *L. acidophilus*.

- Thuốc giọt, thuốc nhỏ mắt là các chế phẩm dạng lỏng có chứa vi khuẩn probiotic như *L. acidophilus* trong điều trị viêm kết mạc [23].

6. Phạm vi, lĩnh vực ứng dụng

6.1. Ứng dụng probiotic trong thực phẩm

Ngày nay, với những hiểu biết ngày càng nhiều về thực phẩm chức năng (functional food) đã dẫn đến sự phát triển của các thành phần có lợi cho sức khỏe bên cạnh sự cân bằng dinh dưỡng. Sự hiện diện của probiotic trong các sản phẩm thực phẩm thương mại đã cho thấy những lợi ích về sức khỏe. Điều này đã làm cho nền công nghiệp tập trung vào những ứng dụng khác nhau của probiotic trong các sản phẩm thực phẩm và tạo ra những thực phẩm thế hệ mới chứa probiotic [24].

- Probiotic trong sữa: các sản phẩm sữa tươi và sữa lên men dạng lỏng, sữa chua, phô mai, ...

- Probiotic trong rau, trái cây, ngũ cốc, thịt.

6.2. Ứng dụng probiotic trong y học

Nhiều nghiên cứu về tác dụng probiotic liên quan đến phòng và điều trị các rối loạn về tiêu hóa, cho thấy các chế phẩm probiotic có khả năng ngăn chặn và làm giảm các triệu chứng của bệnh tiêu chảy, bệnh viêm ruột, chứng dị ứng lactose, các bệnh nhiễm trùng đường ruột và hội chứng kích ứng ở ruột [25]. Bên cạnh đó, một số chế phẩm probiotic cũng đã được nghiên cứu trong việc giảm tỷ lệ mắc bệnh eczema dị ứng, các nhiễm trùng âm đạo, viêm khớp dạng thấp, xơ gan và tăng cường đáp ứng miễn dịch. Các tác dụng ức chế của probiotic đối với các tác nhân gây bệnh răng miệng ở trẻ em cũng đã được công bố. Gần đây, nhiều công bố về các tiềm năng của các chế phẩm probiotic trong việc kháng gen độc tính (antigenotoxicity) và kháng ung thư (anticarcinogenicity) [26, 27]. Ngoài phòng và điều trị bệnh, probiotic còn được xem như một nguồn cung cấp chất dinh dưỡng (vitamin, khoáng chất), chất chống oxy hóa (carotenoid), các chất giúp tăng cường chuyển hóa các chất (ví dụ như tăng cường hấp thu sắt), ...

6.3. Ứng dụng probiotic trong chăn nuôi

Đối tượng của probiotic được mở rộng từ người sang động vật bằng việc phát triển các dạng thức ăn tăng cường (fortified feed) hệ vi sinh vật đường ruột

có lợi cho động vật. Cũng như ở người, hệ vi sinh vật trong đường ruột của động vật đóng vai trò quan trọng trong các quá trình tiêu hóa và duy trì sức khỏe động vật. Đã có nhiều công bố về khả năng cải thiện năng suất vật nuôi bởi sự tăng trọng hàng ngày, tăng sản xuất sữa ở bò sữa, cải thiện sức khỏe ở bê con và thúc đẩy sự tăng trưởng ở gà nhờ sử dụng các chế phẩm probiotic cho động vật nuôi [28].

6.4. Ứng dụng probiotic trong thủy sản

Việc sử dụng probiotic trong nuôi trồng thủy sản là hướng ứng dụng còn khá mới mẻ nhưng đầy triển vọng. Điều này là do sự khác biệt về môi trường sống trên cạn và dưới nước dẫn tới tính khả thi và hiệu quả trong việc sử dụng probiotic vi sinh vật là khác nhau. Việc ứng dụng probiotic trên thế giới và ở Việt Nam còn chưa được chú trọng một cách tương xứng so với sự phát triển mạnh mẽ của nghề nuôi trồng thủy sản trong những năm gần đây. Trong các giải pháp kỹ thuật nhằm đảm bảo an toàn môi trường, các nhà khoa học khuyến cáo sử dụng các công nghệ thân thiện môi trường. Theo đó, kháng sinh truyền thống được phép sử dụng rất hạn chế vì làm tăng khả năng kháng thuốc ở vi sinh vật có hại, hủy hoại hệ vi sinh tự nhiên và làm tích lũy hàm lượng kháng sinh tồn dư trong các sản phẩm thủy sản ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Do đó, xu hướng hiện nay là thay thế các chất kháng sinh truyền thống bằng vaccine, kháng sinh thế hệ mới hoặc là các chế phẩm sinh học (prebiotic và probiotic) [29, 30].

Các chế phẩm probiotic thương mại được cấp phép ở Anh và các nước châu Âu khác chứa các vi sinh vật bao gồm *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, vi khuẩn nitrat hóa, *Streptococci*, *Roseobacter* và *Bacillus* sp. đã được chứng minh là những ảnh hưởng có lợi lên sự phát triển của các loài nước [30].

6.5. Ứng dụng probiotic trong nông nghiệp

Các loại phân bón vô cơ, thuốc bảo vệ thực vật đã góp phần không nhỏ cho tình trạng ô nhiễm môi trường trên toàn thế giới. Để hạn chế hậu quả do ô nhiễm gây nên, thế giới và Việt Nam đang hướng tới ngành nông nghiệp hữu cơ an toàn, bền vững bằng cách sử dụng chế phẩm vi sinh. Vi sinh vật có vai trò rất quan trọng trong đời sống cũng như trong nông nghiệp. Chế phẩm vi sinh là chế phẩm, có chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật sống, có ích cho cây trồng đã được tuyển chọn, sử dụng bón vào đất hoặc xử lý cho cây để cải thiện hoạt động của vi sinh vật trong đất vùng rễ cây. Nhờ đó, chế phẩm vi sinh giúp tăng cường cung cấp các chất dinh dưỡng từ đất cho cây trồng, cung cấp chất điều hòa sinh

trưởng, các loại men, vitamin có lợi cho các quá trình chuyển hóa vật chất, cung cấp kháng sinh để giúp cho cây trồng có khả năng chống chịu các loại sâu bệnh hại, góp phần nâng cao năng suất, phẩm chất nông sản và tăng độ màu mỡ của đất [31].

Các loại chế phẩm vi sinh được sử dụng trong nông nghiệp gồm:

- Phân bón vi sinh: cố định đạm, phân giải lân, phân giải silicat, tăng cường hấp thu phốt pho, kali, sắt, mangan cho thực vật.
- Phòng và trị bệnh cho cây trồng: chế phẩm vi sinh chứa vi sinh vật tiết ra các hợp chất kháng sinh hoặc các phức chất có tác dụng kìm hãm, ức chế nhóm vi sinh vật gây bệnh khác.
- Kích thích tăng trưởng: chế phẩm vi sinh chứa các vi sinh vật tiết ra các hormone sinh trưởng thực vật thuộc nhóm IAA, Auxin, Gibberellin ... vào môi trường.

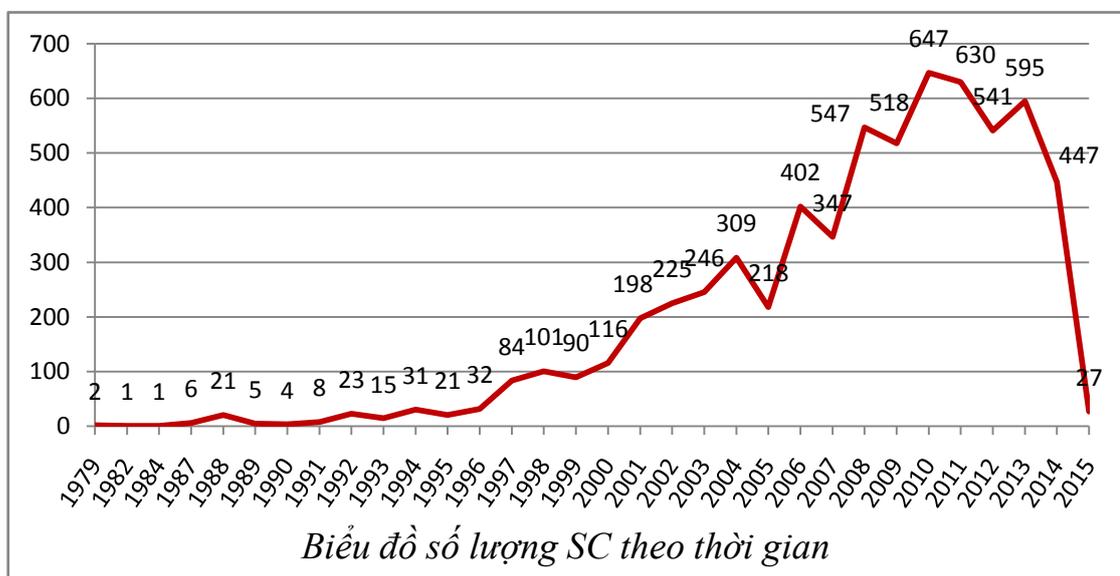
II. XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG PROBIOTIC TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ

1. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế liên quan đến Probiotic theo thời gian

Theo khảo sát tình hình đăng ký sáng chế dựa trên CSDL Thomson Innovation, hiện có khoảng 6458 sáng chế có liên quan đến Probiotic đã được đăng ký bảo hộ.

Sáng chế đầu tiên có liên quan đến probiotic được nộp đơn đăng ký bảo hộ vào năm 1979, đề cập đến việc bổ sung probiotic trong thức ăn gia súc.

Theo thời gian, lượng SC cũng tăng dần và nhiều nhất vào năm 2010 với 647 SC đã đăng ký



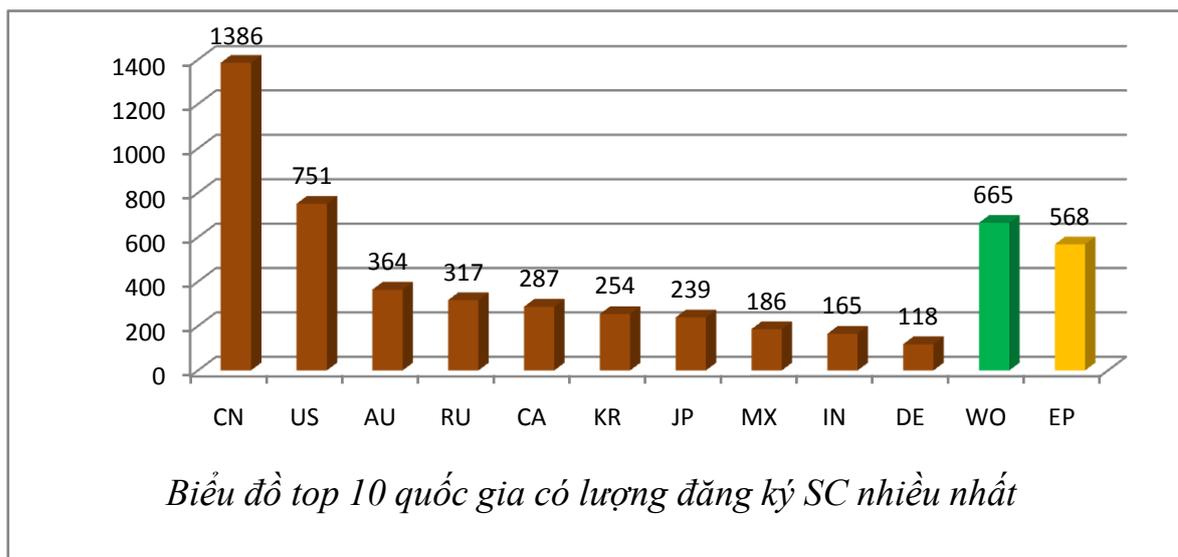
2. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế liên quan đến Probiotic ở các quốc gia

Cũng theo khảo sát trên CSDL Thomson Innovation, hiện nay sáng chế có liên quan đến probiotic đang được nộp đơn đăng ký bảo hộ ở khoảng 55 quốc gia trên toàn thế giới. Trong đó, 10 quốc gia được các chủ sở hữu sáng chế nộp đơn đăng ký nhiều nhất là: Trung Quốc (CN), Mỹ (US), Úc (AU), Nga (RU), Canada (CA), Hàn Quốc (KR), Nhật Bản (JP), Mexico (MX), Ấn Độ (IN), Đức (DE).

Bên cạnh việc nộp đơn đăng ký bảo hộ ở các quốc gia, sáng chế liên quan đến probiotic còn được nộp đơn đăng ký bảo hộ ở 2 tổ chức sở hữu trí tuệ lớn:

- Tổ chức sở hữu trí tuệ thế giới (WO): 665 SC

- Tổ chức sở hữu trí tuệ châu Âu (EP): 568 SC



Giai đoạn đầu, từ 1979 đến 1996 các SC được nộp đơn đăng ký bảo hộ chủ yếu ở các quốc gia như: Anh, Mỹ, Nhật, Đức, Úc, Canada, Nga, ...

Đến năm 1997 mới bắt đầu có sáng chế nộp đơn đăng ký bảo hộ ở Trung Quốc. Tuy nhiên từ đó đến nay Trung Quốc vẫn luôn là thị trường lớn, được các chủ sở hữu sáng chế chọn để nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế của mình, lượng sáng chế đăng ký bảo hộ tại đây lớn hơn rất nhiều lượng sáng chế nộp đơn đăng ký bảo hộ ở các quốc gia khác.

Tính đến thời điểm hiện nay cũng có khoảng 29 sáng chế liên quan đến probiotic đã đăng ký bảo hộ tại Việt Nam

Các sáng chế nộp đơn đăng ký bảo hộ tại Việt Nam bắt đầu từ năm 2006 đến 2013. Trong số các nhà nộp đơn đa số là những công ty nổi tiếng trên thế giới về các sản phẩm dinh dưỡng, dược phẩm, thực phẩm chức năng như:

- ABBOTT LABORATORIES: công ty chuyên nghiên cứu, phát triển, sản xuất và đưa ra các sản phẩm và dịch vụ chăm sóc sức khỏe có chất lượng cao trong lĩnh vực dinh dưỡng, dược phẩm, thiết bị chẩn đoán và điều trị

- MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY: công ty chuyên về dinh dưỡng dành cho trẻ em

- UNILEVER N.V : tập đoàn của Anh và Hà Lan chuyên sản xuất các mặt hàng tiêu dùng như mỹ phẩm, hóa chất giặt tẩy, kem đánh răng, dầu gội, thực phẩm...

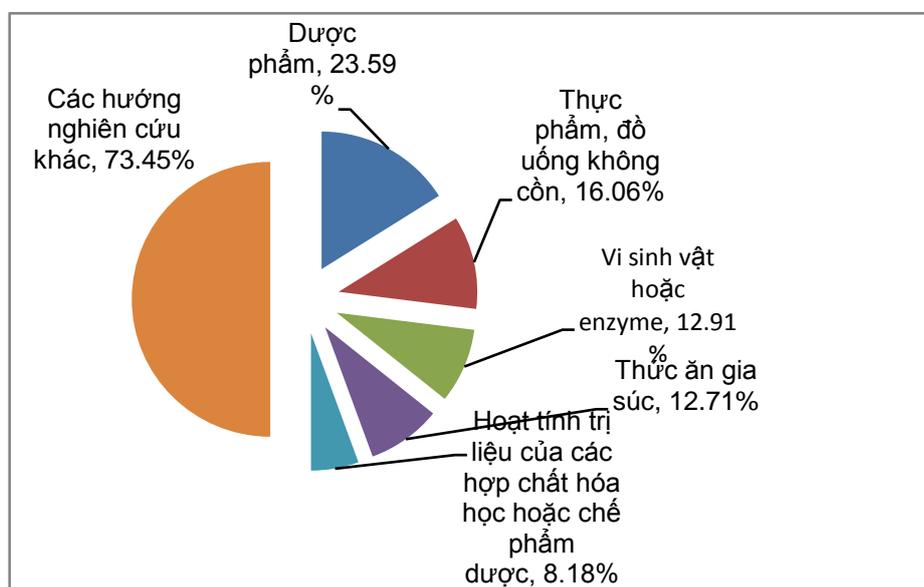
- CJ CHEILJEDANG CORPORATION: một tập đoàn của Hàn Quốc về nhiều lĩnh vực trong đó có thực phẩm, dược phẩm, thức ăn gia súc,...

- ALIMENTARY HEALTH LIMITED: công ty về chăm sóc sức khỏe, dinh dưỡng tại Cộng hòa Ireland

3. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế liên quan đến probiotic theo các hướng nghiên cứu:

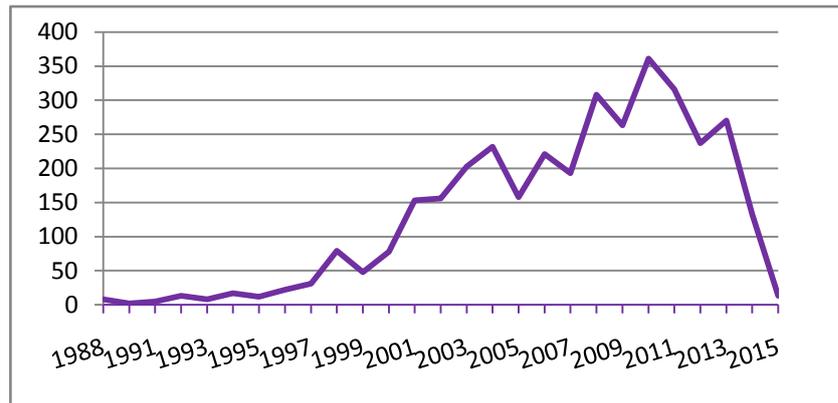
Với hơn 6400 sáng chế liên quan đến probiotic nộp đơn đăng ký bảo hộ, khi đưa vào bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC, nhận thấy lượng sáng chế tập trung nhiều ở các chỉ số phân loại A61K, A23L, C12N, A61P, A23K, A23C thể hiện các hướng nghiên cứu sau:

- Dược phẩm dùng để chữa bệnh
- Thực phẩm hoặc các đồ uống không cồn, bảo quản thực phẩm,...
- Vi sinh vật hoặc enzyme, các hợp phân chứa chúng
- Thức ăn cho gia súc
- Hoạt tính trị liệu đặc hiệu của các hợp chất hóa học hoặc các chế phẩm dược như: Thuốc điều trị những rối loạn ống tiêu hoá hoặc hệ tiêu hoá; Thuốc chống nhiễm khuẩn, như kháng sinh, sát khuẩn, liệu pháp hóa học .
- Sản phẩm sữa; Sữa bột hoặc các sản phẩm của nó

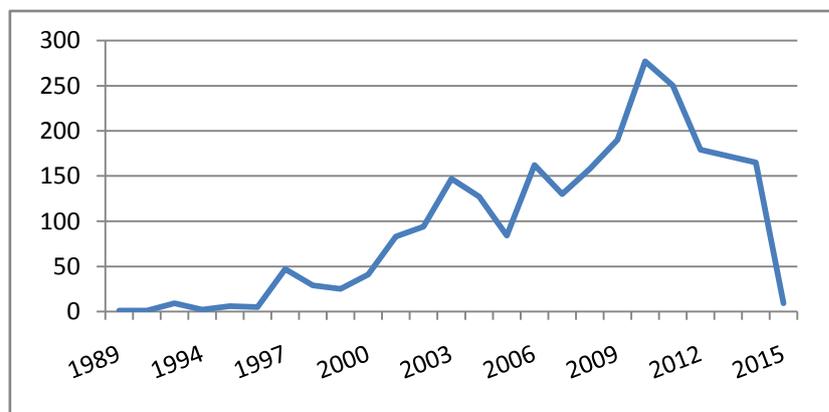


Biểu đồ tỷ lệ các hướng nghiên cứu theo IPC

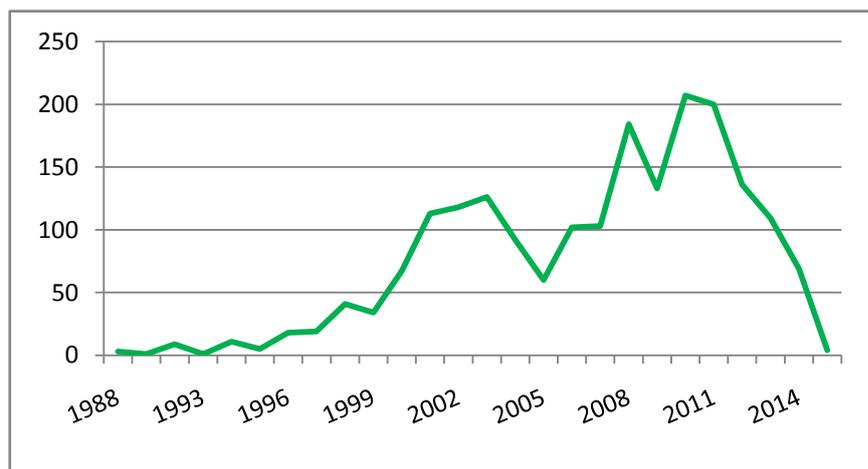
Khi xem xét các hướng nghiên cứu dựa trên các chỉ số phân loại, theo thời gian nhận thấy phần lớn các hướng NCUD probiotic đều có lượng SC tăng dần, điển hình 3 hướng NCUD probiotic trong dược phẩm, thực phẩm và nông nghiệp.



Biểu đồ lượng sáng chế NCUD probiotic trong dược phẩm theo thời gian



Biểu đồ lượng sáng chế NCUD probiotic trong thực phẩm theo thời gian



Biểu đồ lượng sáng chế NCUD probiotic trong thức ăn gia súc theo thời gian

Khi xem xét các hướng nghiên cứu dựa trên các chỉ số phân loại sáng chế nộp đơn tại 5 quốc gia và tổ chức có lượng sáng chế đăng ký nhiều nhất là

Trung Quốc, Mỹ, Úc, tổ chức WO và EP nhận thấy phần lớn các sáng chế liên quan đến NCUD probiotic đều tập trung vào các lĩnh vực:

- Dược phẩm có chứa thành phần vi khuẩn
 - Thực phẩm có chứa chất phụ gia
 - Vi sinh vật: vi khuẩn, các môi trường nuôi cấy VK
 - Thức ăn gia súc có thêm thành phần dinh dưỡng bổ sung
- Thuốc điều trị những rối loạn ống tiêu hoá hoặc hệ tiêu hoá

III. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU VỀ PROBIOTIC TẠI ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP.HCM

1. *Bacillus* làm probiotic

Theo Bergey, *Bacillus* thuộc giới *Bacteria*, ngành *Firmicutes*, lớp *Bacilli*, bộ *Bacillales*, họ *Bacillaceae*, chi *Bacillus*, *Geobacillus* [32]. Họ *Bacillaceae* được Fischer trình bày có hệ thống năm 1895 thì nội bào tử được dùng trong khóa phân loại vi khuẩn. Đặc điểm của chi *Bacillus* là tất cả có nội bào tử, hiếu khí, có thể bắt buộc hay tùy ý, hình que và tạo catalase. Bào tử *Bacillus* tồn tại trong đất, ở đường ruột bào tử có thể nảy mầm và phát triển. Bào tử *Bacillus* bền với các điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao, pH cực đoan, tia UV, lysozyme và các chất tẩy rửa nên được ứng dụng làm probiotic.

Vi khuẩn *Bacillus* được ứng dụng nhiều làm probiotic để điều trị cũng như phòng bệnh ở người, trên thị trường Việt Nam hiện cũng đang phát triển nhiều sản phẩm probiotic chứa *Bacillus* như:

- Nhật: Natto (*Bacillus subtilis* var. Natto)
- Ý: Enterogermina (*Bacillus clausii*)
- Việt Nam: Biosubtyl (*Bacillus subtilis*)

Hiện nay, một số vi khuẩn *Bacillus* cũng tạo ra một số loại carotenoid như β -caroten, carotenoid C₅₀ đang được nghiên cứu và ứng dụng làm probiotic vì đây là loài có khả năng sinh bào tử tồn tại trong những điều kiện nhiệt độ cao và môi trường acid của dịch vị dạ dày [33].

2. Dự án Colorspores: Probiotic sinh carotenoid

2.1. Carotenoid

Carotenoid là các hợp chất được tạo thành từ tám đơn vị isopren (ip) có cấu trúc sắp xếp bị đảo ngược ở trung tâm của phân tử tạo nên bộ khung carbon (C40). Bộ khung này có thể được thay đổi bằng cách: (1) tạo vòng ở một đầu hoặc cả hai đầu của phân tử để tạo thành bảy nhóm cấu trúc khác nhau, (2) thay đổi mức hydro hóa và (3) thêm các nhóm chức chứa oxy [34], [35].

2.1.1. Tác dụng sinh học của carotenoid

- Tồn tại trong tự nhiên với một số lượng lớn nhưng qua nghiên cứu chỉ có khoảng 20 loại carotenoid được hấp thu và dự trữ trong cơ thể người. Carotenoid là những phân tử kỵ nước nên thường ở trong lớp màng kép của tế bào và giữ vai trò điều hòa trạng thái lỏng của màng. Carotenoid là thành phần thường gặp trong máu và mô của người và động vật. Ở người khỏe mạnh, carotenoid hiện diện ở mô mỡ (80-85%), gan (8-12%) và cơ (2-3%) và một lượng nhỏ trong các mô khác. Hầu hết carotenoid được hấp thu ở ruột non. Tuy nhiên, một số carotenoid và các tiền tố vitamin A được hấp thu ở võng mạc và các cơ quan khác [36].

- Hàm lượng carotenoid được hấp thụ tùy thuộc vào từng người, sự hấp thu và chuyển hoá carotenoid cũng đặc hiệu ở mỗi cơ thể. Huyết thanh người chứa β -caroten, cryptoxanthin, lycopene, lutein, một lượng nhỏ zeaxanthin, các xanthophyl khác và các polyen như phytofluene, phytoene [36].

2.1.2. Vai trò của carotenoid trong y học

- Tiền tố của vitamin A, ngăn ngừa các bệnh về thị giác. Khoảng 800 loại carotenoid từ tự nhiên đã được xác định, trong đó khoảng 10% là tiền tố của vitamin A, trong đó β -caroten có giá trị cao nhất, chiếm 15-30% toàn bộ carotenoid trong huyết thanh. Khi vào đến thành ruột non một phân tử β -caroten sẽ phân hủy tạo thành hai phân tử vitamin A nhờ xúc tác của caroten dioxygenase [37].

- Bắt giữ gốc tự do. Carotenoid bắt giữ các gốc tự do trong các phản ứng dây chuyền của quá trình oxy hóa với vai trò của một chất ngắt mạch để ngăn chặn sự sản sinh các sản phẩm độc hại đối với cơ thể. Do đó, carotenoid được bào chế ở dạng dược phẩm bổ sung hay thực phẩm chức năng đem lại lợi ích sức khỏe cho con người [38].

- Ngăn ngừa ung thư. Với khả năng chống lại các gốc tự do tấn công vào các ADN làm sai lệch vị trí các cặp base dẫn đến đột biến gây ung thư, carotenoid đã và đang được nghiên cứu trên lâm sàng để chứng minh khả năng giảm nguy cơ hay ngăn ngừa ung thư như ung thư phổi, ung thư da, ung thư vú, tuyến tiền liệt, thực quản...[39, 40].

- Phòng ngừa bệnh tim mạch. Carotenoid là một chất chống oxy hóa tự nhiên, giúp ngăn chặn và làm chậm quá trình oxy hóa là nguyên nhân gây tăng quá trình peroxy hóa - làm tổn thương thành động mạch, làm hư hao các cơ, và tiến sâu vào thành động mạch với tốc độ nhanh hơn 20 - 30 lần tác động của LDL. Do vậy, carotenoid có vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa các bệnh lý tim mạch là phòng chống sự oxy hóa LDL [41] [36, 41].

- Chống lão hóa. Carotenoid được xem là các chất chống oxy hóa do có thể tác dụng được với dạng oxy đơn bội (1O_2), dạng oxy hoạt động mạnh gây phá hủy mô. Do đó, carotenoid có tác dụng bảo vệ cơ thể chống lại sự hủy hoại mô do gốc tự do, đồng thời ngăn chặn tác động của các gốc tự do lên cấu trúc collagen ở da [36, 38].

2.1.3. Ứng dụng của carotenoid

- Chất màu tự nhiên
- Chăn nuôi và thủy sản
- Cung cấp vitamin A an toàn
- Probiotic, thực phẩm chức năng

2.1.4. Nguồn cung cấp carotenoid

- Thực vật
- Tảo
- Tôm / cua
- Nấm / vi nấm
- Nấm men
- Tổng hợp hóa học
- Vi khuẩn

2.2. Nghiên cứu *Bacillus* làm nguồn cung cấp carotenoid

- Có thể nuôi cấy trên môi trường rẻ tiền

- Vì tồn tại ở dạng bào tử nên ổn định khi bảo quản
- Bào tử có khả năng chịu được acid dịch vị và muối mật nên Bacillus dễ dàng sống sót qua đường tiêu hóa
- Sử dụng dưới dạng probiotic, không cần chiết xuất carotenoid do đó tránh được các vấn đề về xử lý dung môi hóa chất sau khi chiết cũng như năng suất tinh sạch của carotenoid do carotenoid dễ dàng bị bhu hỏng khi bị tác động.

2.2.1. Phân lập và khảo sát đặc tính

Phân lập chủng mới

Từ 250 mẫu đất và nước thu được ở Cần Giờ, Đà Nẵng, Nha Trang, Bình Thuận và Bà Rịa-Vũng Tàu, tiến hành phân lập vi khuẩn trên môi trường TSA và thu được 72 chủng vi khuẩn tạo khuẩn lạc có nhiều màu sắc khác nhau từ vàng đến đỏ trong đó có 38 chủng tạo bào tử trên môi trường DSM.

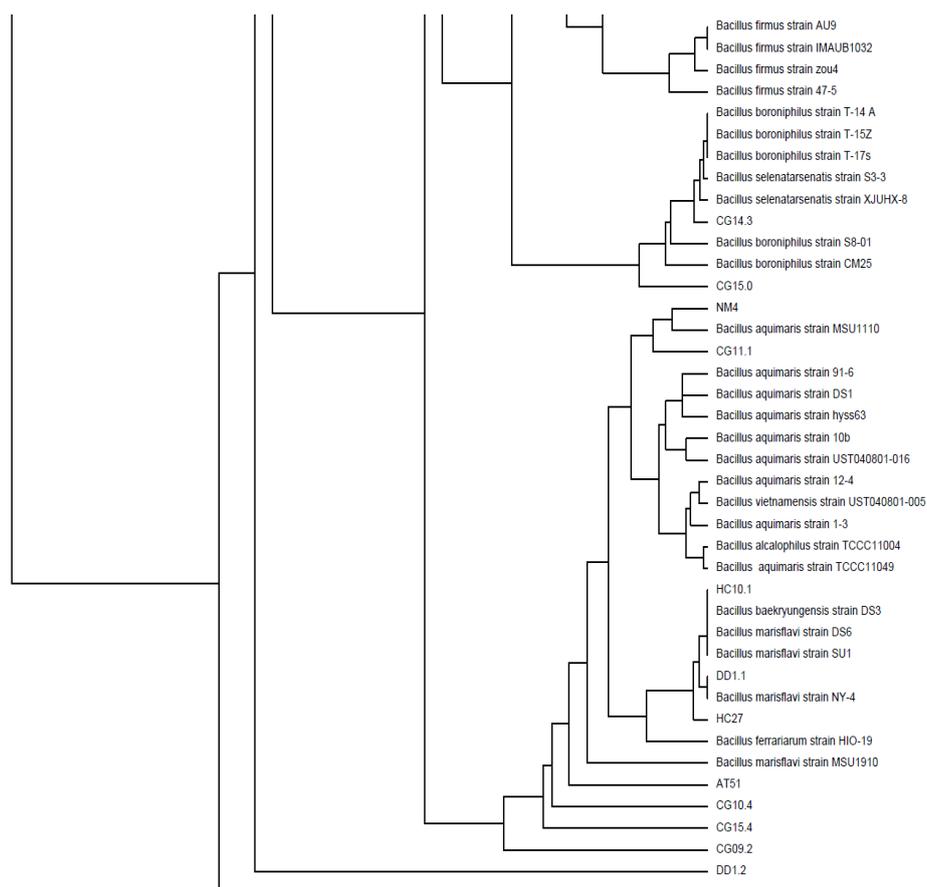


Hình 2.1. Khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn phân lập

Định danh

Gen 16S rADN của tất cả các chủng được khuếch đại thành công với hai mồi P1 và P2 và được gửi đi giải trình tự với 2 mồi này.

Kết quả định danh cho thấy 38 chủng phân lập thuộc chi Bacillus và thuộc các loài sau đây: *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* và *B. indicus*.



Hình 2.2. Cây phát sinh loài của các chủng sinh carotenoid

2.2.2. Khảo sát các đặc điểm probiotic

- Khả năng sinh enzym ngoại bào và đối kháng vi khuẩn gây bệnh. Hầu hết các chủng có khả năng sinh enzym protease (caseinase hoặc gelatinase) và enzym amylase, trong đó có 15 chủng sinh được cả ba loại enzym caseinase, gelatinase và amylase. Như vậy các chủng vi khuẩn này ngoài khả năng cung cấp carotenoid còn có khả năng tiết các enzym hỗ trợ cho hệ tiêu hóa.

- Chịu acid dịch vị và muối mật. Ở môi trường pH 2 và pH 3 sau 90 phút, các chủng AT14, AT22, CG17.0, DD1.1 và HC28 có khả năng sống sót cao nhất khoảng 40 - 50%. Khảo sát khả năng chịu muối mật 0,15% và 0,3% của 38 bào tử chủng vi khuẩn ở thời điểm 1 giờ và 3 giờ. Kết quả cho thấy chủng AT14, AT22, BC1, CG9.2, CG10.4, CG11.1, CG17.0, DD1.1, HC28, NM4, NM5 có khả năng sống sót cao nhất với tỷ lệ khoảng 25% - 60%.

- Tính nhạy cảm kháng sinh. Thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh của 38 chủng vi khuẩn để khảo sát sự đề kháng kháng sinh bằng phương pháp pha loãng trong thạch. Kết quả cho thấy có 24 chủng nhạy cảm hoàn toàn với 15 kháng sinh thử nghiệm. Đó là các chủng AT11, AT14, AT17, AT17.2, AT19,

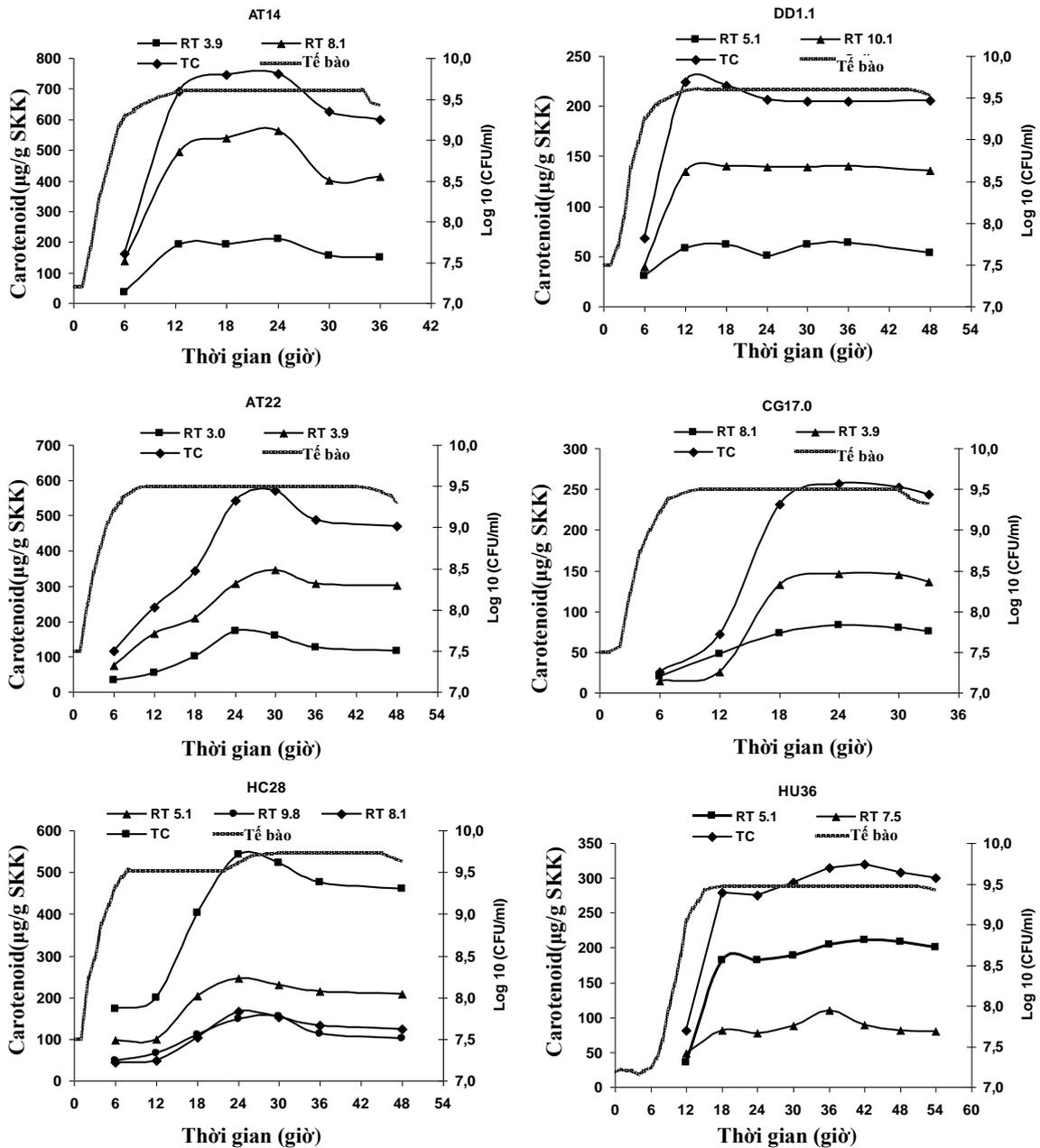
AT22, AT26, BC6, BC8, BC11, CG05.0, CG09.1, CG09.2, CG11.3, CG12.2, CG15.0, CG15.4, CG17.0, DD1.1, DD1.2, DD2.2, HC10, HC28, NM3. Các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng biến nạp và trao đổi gen rất cao, do đó chúng có thể chuyển các gen đề kháng sang các chủng khác, kể cả các gen nằm trên nhiễm sắc thể. Do đó, để đảm bảo an toàn trong việc ứng dụng làm probiotic, các chủng nhạy cảm với tất cả các kháng sinh sẽ được chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp tục.

2.2.3. Khảo sát đặc điểm sinh carotenoid

Sự tương quan giữa hàm lượng carotenoid và đường cong tăng trưởng được xác định trong từng thời điểm phát triển của vi khuẩn. Kết quả khảo sát cho thấy carotenoid ở các chủng khảo sát đều xuất hiện từ đầu pha tăng trưởng lũy thừa và tăng dần cùng với sự gia tăng sinh khối, nhưng tùy theo từng chủng vi khuẩn mà thời điểm đạt hàm lượng carotenoid cao nhất khác nhau và được chia làm 2 nhóm (Hình 3).

- Nhóm đạt cực đại vào đầu pha ổn định: gồm các chủng DD1.1 và AT14, chủng đối chứng HU36 cũng thuộc nhóm này. Ở các chủng này, carotenoid đã tạo ra sau 6 giờ nuôi cấy, hàm lượng carotenoid tăng cùng với sinh khối trong pha lũy thừa, đạt đến cực đại vào đầu pha ổn định và duy trì đến cuối pha ổn định.

- Nhóm đạt cực đại từ giữa pha ổn định: gồm các chủng AT22, CG17.0 và HC28. Carotenoid bắt đầu được tích lũy trong pha lũy thừa và tiếp tục tăng trong pha ổn định và đạt cực đại vào giữa pha ổn định, giữ ổn định trong một khoảng thời gian sau đó giảm.



Hình 2.3. Lượng carotenoid tạo ra theo thời gian của 6 chủng khảo sát

RT: Thời gian lưu, TC: Tổng carotenoid

2.2.4. Sinh khả dụng của carotenoid vi khuẩn

Tích lũy ở gan chuột

Cho chuột (20 - 25 g) uống NaCl 0,85%, hoặc carotenoid, hoặc huyền dịch vi khuẩn sinh carotenoid trong nước muối sinh lý một lần duy nhất lúc bụng đói (khoảng 9-10 giờ sáng) trong 60 ngày. Chủng vi khuẩn sinh carotenoid gồm *Bacillus marisflavi* (DD1.1), *Bacillus firmus* (GB1), *Bacillus indicus* (HU36). Chủng đối chứng *Bacillus subtilis* (HU58) (không sinh carotenoid). Chuột được uống bào tử vi khuẩn với liều 2×10^8 bào tử/ngày.

Thực hiện chiết tách carotenoid từ gan chuột, định lượng carotenoid thông qua đường chuẩn canthaxanthin bằng HPLC. Hàm lượng carotenoid trong gan chuột được thể hiện trong bảng sau:

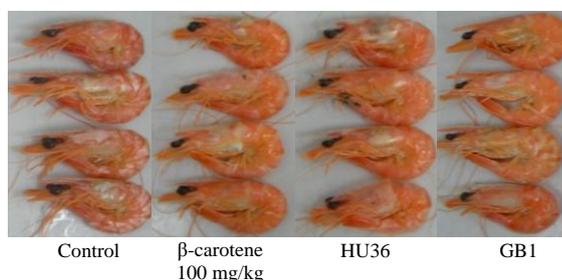
Bảng 2.1. Hàm lượng carotenoid trong gan chuột sau 2 tháng thử nghiệm.

Lô thử nghiệm	Carotenoid tổng (ng/g)
DD1.1	6,51
HU36	6,40
GB1	13,66
HU58	0,4
NaCl 0,85%	0,15

Kết quả cho thấy lô chuột thử nghiệm với chủng DD1.1 có hàm lượng carotenoid tổng là 6,51 ng/g gan, HU36 là 6,4 ng/g gan và GB1 là 13,66 ng/g gan. Trong khi đó, lô đối chứng HU58 và lô chứng NaCl 0,85% chỉ xuất hiện một lượng rất nhỏ 0,4 ng/g và 0,15 ng/g gan. Từ đó cho thấy chủng DD1.1, GB1, HU36 có khả năng sinh carotenoid và cung cấp cho cơ thể vật chủ qua niêm mạc ruột.

Tích lũy ở tôm sú

Tôm cỡ trung với trọng lượng 7 - 8 g, đã được kiểm tra không nhiễm bệnh. Tôm được nuôi trong bể với 30 con trong một bể nuôi. Tôm được cho ăn thức ăn Tomboy trong 1 tuần trước khi bắt đầu thử nghiệm. Tôm sú (ở mỗi nhóm nghiên cứu) được chia 4 lô với 30 con/lô gồm có lô đối chứng, lô chứng dương (β -caroten 100 mg/kg), lô thử nghiệm HU36 (10^7 bào tử/g), lô thử nghiệm GB1 (10^7 bào tử/g). Tôm được cho ăn 3 lần mỗi ngày với tổng lượng thức ăn 5% trọng lượng tôm.



Hình 2.4. Màu của tôm khi sử dụng bào tử sau khi luộc 5 phút

Màu sắc của tôm sau khi luộc cho thấy việc sử dụng bào tử HU36 và GB1 làm tăng màu sắc của tôm so với nhóm đối chứng.

Phân tích Carotenoid: Kết quả sắc ký đồ HPLC của dịch chiết từ 4 lô thử nghiệm gần như tương tự nhau. Qua sắc ký đồ của astaxanthin chuẩn, ta nhận thấy astaxanthin tự do là đỉnh hấp thụ chính của dịch chiết tôm với thời gian lưu là 3,9 phút. Ngoài ra, sắc ký đồ còn cho thấy xuất hiện một đỉnh ở thời gian lưu 4,5 phút với hàm lượng thấp ở cả 4 nhóm thử nghiệm. Hàm lượng astaxanthin chiếm trên 80% carotenoid tổng ở cả 4 lô thí nghiệm được tổng hợp trong bảng. Trong đó, nhóm thử nghiệm với chủng GB1, HU36 và β -caroten đều có hàm lượng carotenoid tổng và astathanthin cao hơn so với nhóm chứng.

Bảng 2.2. Hàm lượng carotenoid tổng (mg/kg) của tôm cỡ trung ở các lô thử nghiệm sau 4 tuần.

	Tổng carotenoid (mg/g)	Astaxanthin (mg/g)
Đối chứng	9.10±0.13	6.34±0.11
100 mg/kg thức ăn	11.94±0.11	8.41±0.08
HU36	12.02±0.40	9.27±0.16
GB1	10.46±0.32	8.24±0.02

3. Probiotic sinh chất chống oxi hóa

3.1. Chất chống oxi hóa - chức năng và vai trò đối với sức khỏe

3.1.1. Khái niệm

Các chất chống oxi hóa là những chất phản ứng với các gốc tự do và do đó ngăn cản hay làm chậm quá trình oxi hóa. Chất chống oxi hóa có tác dụng ngăn cản sự hình thành của các gốc tự do hoạt động hoặc kết thúc phản ứng dây chuyền của các gốc tự do (dập tắt gốc tự do). Hiệu lực tác động của chất chống oxi hóa cao khi năng lượng hoạt hóa để khử thấp, thế oxi hóa cao, thế khử chuẩn của hệ thấp và độ bền của gốc tự do tạo thành.

3.1.2. Phân loại

Dựa vào nguồn gốc, chất chống oxi hoá được chia thành chất chống oxi hóa nội sinh và chất chống oxi hóa ngoại sinh.

Chất chống oxi hóa nội sinh:

Trong cơ thể sinh vật, bên cạnh các gốc tự do thì bản thân sinh vật đã tự phát triển hệ thống các chất chống oxi hóa nội sinh (tức có sẵn trong cơ thể) để cân bằng lại, vô hiệu hoá các gốc tự do có hại. Các chất chống oxi hóa nội sinh

bao gồm các enzym chống oxi hóa, các vitamin và các chất chống oxi hóa nội sinh không enzym.

Hệ thống enzym bao gồm superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase đây là các enzym điều hòa sự tạo thành gốc tự do nhằm duy trì giới hạn an toàn của anion superoxide, H₂O₂, và hydroperoxide hữu cơ tương ứng, chúng được xem là các enzym khử độc chính trong cơ thể. Trong đó, enzym SOD xúc tác phản ứng dị ly superoxid thành H₂O₂, enzym có nồng độ cao nhất ở gan, thận và hồng cầu và giúp giữ nồng độ superoxid trong tế bào ở mức 10⁻¹¹M. Sau đó enzym catalase sẽ xúc tác phản ứng phân hủy H₂O₂ thành H₂O, hoặc phản ứng giữa H₂O₂ và các chất cho proton, enzym có ở mọi mô nhưng chủ yếu trong peroxisome của gan và thận. Enzym glutathion peroxidase, gồm glutathion dạng khử (GSH) và glutathion dạng oxi hóa (GSSG). GSH xúc tác sự khử hóa của H₂O₂, các hydro peroxid và peroxid hữu cơ tạo thành các GSSG. Sau đó các GSSG sẽ chuyển thành GSH nhờ sử dụng NADPH như một cofactor. Enzym glutathion peroxidase gặp chủ yếu trong bào tương.

Tuy nhiên hệ thống bảo vệ này có thể bị quá tải nếu các dạng oxi hoạt động được tạo ra quá nhiều và hệ thống chất chống oxi hoá nội sinh không đủ sức cân bằng, cơ thể sẽ sinh ra rối loạn bệnh lí. Chính vì vậy các chất chống oxi hoá cung cấp từ bên ngoài sẽ góp phần trung hoà các gốc tự do [42, 43].

Chất chống oxi hóa ngoại sinh:

Chất chống oxi hoá ngoại sinh (tức là từ bên ngoài đưa vào cơ thể) sẽ tác động như những chất ngắt mạch của dây chuyền phản ứng của gốc tự do hay nói cách khác là trung hoà các gốc tự do. Đó là lý do chúng ta luôn cần có nguồn bổ sung chất chống oxi hoá thường xuyên từ bên ngoài thông qua chế độ ăn uống hay sử dụng dược phẩm bổ sung, thực phẩm chức năng. Các chất chống oxi hóa ngoại sinh chia làm 2 nhóm: các chất chống oxi hóa có nguồn gốc tự nhiên và các chất chống oxi hóa tổng hợp.

Chất chống oxi hoá tự nhiên

Chất chống oxi hóa tự nhiên được cung cấp từ bên ngoài có hoạt tính chống oxi hoá cao đã được chứng minh có lợi cho cơ thể như vitamin C, vitamin E, selen, flavonoid, polyphenol, carotenoid, các acid béo nhiều nối đôi, nhằm ngăn chặn các quá trình oxi hoá không mong muốn để bảo vệ và nâng cao sức khoẻ cho con người [42].

Chất chống oxi hóa tổng hợp

Các chất chống oxi hóa tổng hợp gồm: Vitamin C tổng hợp, Vitamin E (hay Tocopherol) tổng hợp, Butylated hydroxyl anisole (BHA), Butylated hydroxyl toluene (BHT), Tert- Butylhydroquinon (BTHQ)... nhóm chất này tác động lên gốc tự do đóng vai trò như những chất ngắt mạch.

3.1.3. Vai trò của chất chống oxi hoá đối với sức khỏe

Các chất chống oxi hoá đóng vai trò như một chất ngắt mạch sẽ dập tắt các gốc tự do trong các phản ứng dây chuyền của quá trình oxi hoá để ngăn chặn sự sản sinh các sản phẩm độc hại đối với cơ thể [43]. Như vậy, các chất chống oxi hóa sẽ có khả năng ngăn ngừa và bảo vệ sức khỏe con người trước một số bệnh liên quan đến các gốc tự do bao gồm:

- Ngăn ngừa các bệnh tim mạch
- Ngăn ngừa ung thư
- Ngăn ngừa và chống lão hoá
- Ngăn ngừa các bệnh về thị giác
- Tăng cường miễn dịch

3.2. Nguồn thu nhận chất chống oxi hoá tự nhiên

3.2.1. Chất chống oxi hóa từ động vật

Chất chống oxi hóa tự nhiên quan trọng có nguồn gốc động vật là các hợp chất amin: aminoacid, peptid và protein. Chất chống oxi hóa trong nhóm này chủ yếu liên quan đến các aminoacid có chứa nhóm thiol như methionin, cystein. Các loại protein, hoạt động như chất chống oxi hóa, có tác dụng đánh bắt các gốc tự do tạo ra trong quá trình sinh hóa của tế bào [44, 45]. Trong một số nghiên cứu, casein và whey protein đã được chứng minh có thể ức chế quá trình tự oxi hóa của lipid. Trong đó, casein ức chế enzym, và các hợp chất không là enzym trong quá trình oxi hóa lipid [45]. Thiol chính trong các protein ở mô động vật là glutathion (GSH). Chức năng cơ bản của GSH trong cơ thể là bảo vệ của các nhóm protein thiol khỏi quá trình oxi hóa. Glutathion và các hợp chất khử khác của thiol có thể tái tạo dạng oxi hóa của tocopherol để phục hồi vitamin E [44]. Trong mô mỡ ở động vật còn tồn tại các hợp chất có hoạt tính chống oxi hóa như vitamin E (tocopherol và tocotrienol), caroten và ubiquinon (coenzyme Q) Tocopherol có trong cấu trúc của lớp đôi phospholipid của màng tế bào, và cùng với cholesterol quyết định tính toàn vẹn của màng tế bào. Vitamin E giúp đánh bắt các gốc tự do như hydroxyl, alcoxyl, hydroxyperoxid, peroxy, và có khả năng dập tắt oxy đơn bội [46].

3.2.2. Chất chống oxi hóa từ thực vật

Thực vật bị stress oxi hóa gây ra bởi tia UV nhiều hơn so với động vật và người, nhưng không thể tự bảo vệ mình bằng các chất chống oxi hóa ngoại sinh như con người và động vật do đó các loài thực vật cần tạo ra các chất chống oxi hóa có hiệu quả để chống lại các tác động của môi trường. Ví dụ, Edelweiss hoặc địa y có chứa các chất tự nhiên hấp thụ UVB và hoạt động như một chất sàng lọc tác nhân oxi hóa [46-48].

Thực vật có chứa nhiều chất chống oxi hóa hiệu quả (phytoantioxidant) có khả năng của cả bảo vệ tế bào của chính nó và cung cấp các chất chống oxi hóa ngoại sinh cho động vật và người khi sử dụng thực vật. Hầu hết các chất chống oxi hóa từ thực vật là các polyphenol hoặc terpen gồm rất nhiều các hợp chất từ các loại thực vật khác nhau.

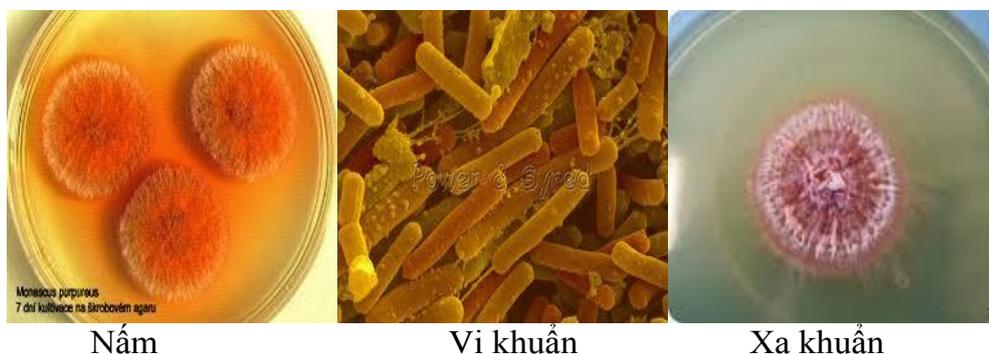
Polyphenol được tổng hợp bởi thực vật, tham gia vào quá trình trao đổi chất của thực vật, và giúp cho thực vật chống lại các tác động của môi trường. Polyphenol được tìm thấy trong rễ, thân, cành, hoa và lá của tất cả các thực vật. Các polyphenol này khác nhau về trọng lượng phân tử, độ phân cực, và độ hòa tan. Polyphenol là các hợp chất có nhiều có chứa các nhóm -OH gắn với một hoặc nhiều vòng benzen. Số lượng nhóm -OH cũng như vị trí tương đối của các nhóm -OH là yếu tố quan trọng quyết định hoạt tính chống oxi hóa của polyphenol: các nhóm phenol phát huy tác dụng chống oxi hóa trực tiếp, điều chỉnh phosphoryl hóa protein, và ức chế sự peroxid hóa lipid bằng cách ngắt phản ứng chuỗi của các gốc tự do. Các nhóm như flavonoid, stilben, và các terpen giúp ngăn ngừa stress oxi hóa nội bào và ngoại bào, làm chậm sự lão hóa của da, các carotenoid có thể đánh bắt oxi đơn bội. Hơn 4000 flavonoid có khác nhau đã được xác định, quan trọng nhất là anthocyanidin, flavanol, isoflavon, và flavanon.

Việc sản xuất các chất chống oxi hóa từ nguồn từ thực vật được cho là an toàn hơn vì ít tạo các dạng đồng phân cấu trúc ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người so với con đường tổng hợp hóa học. Tuy nhiên việc thu nhận và sản xuất các chất chống oxi hóa từ thực vật tốn kém về mặt diện tích đất cho trồng trọt và ảnh hưởng của thời tiết [48].

3.2.3. Chất chống oxi hoá từ vi sinh vật

Vi sinh vật được cho là nguồn cung cấp có tiềm năng lớn trong việc sản xuất các chất chống oxi hoá có nguồn tự nhiên vì việc sử dụng vi sinh vật có nhiều ưu thế như dễ nuôi cấy ở quy mô lớn, tăng trưởng nhanh, sử dụng cơ chất

rẻ tiền, hiệu quả kinh tế cao hơn. Hơn nữa vi sinh vật đã và đang được ứng dụng làm probiotic hay thực phẩm chức năng do tính kinh tế, dễ sản xuất, dễ sử dụng và an toàn.



Hình 3.1. Một số vi sinh vật có khả năng sinh chất chống oxy hoá

Trong các sinh vật bậc thấp, chất chống oxy hóa cũng được tìm thấy nhiều ở vi nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng nhóm chất chống oxy hóa như carotenoid, flavonoid hiện diện trong tế bào của vi khuẩn và vi nấm. Tuy nhiên việc nghiên cứu và sản xuất chất chống oxy hoá từ nguồn này chưa được quan tâm nhiều.

3.3. Phương pháp thu thập và phân lập mẫu

Dựa trên các tài liệu về vi khuẩn sinh chất chống oxy hoá có điều kiện sống liên quan đến môi trường sống khắc nghiệt như nhiệt độ cao và ánh sáng mặt trời, hạn hán, nơi bị chiếu xạ UV mạnh, độ mặn cao [49], chúng tôi tiến hành lấy mẫu đất, cát, nước và bùn ở một số tỉnh vùng khác nhau ở Việt Nam như Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi, Bình Định, Gia Lai, Khánh Hoà, Ninh Thuận, Bình Thuận, Đồng Nai, Tp. Hồ Chí Minh, Tây Ninh, Tiền Giang, Đồng Tháp, An Giang.

Vì mục tiêu cần phân lập là các vi khuẩn hiếu khí nên tiến hành lấy mẫu đất (độ sâu khoảng 5-10 cm) và nước (độ sâu khoảng 10-20 cm) cho vào ống Falcon 50ml, trong đó đất chiếm khoảng $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ ống và nước đến vạch từ 30 - 40 ml. Các mẫu sau khi thu thập được giữ ở nhiệt độ phòng trong 48 - 72 giờ cho đến khi phân lập.

Mẫu sau khi thu thập được trải lên môi trường TSA. Ủ ở 37°C trong 24 đến 36 giờ. Quan sát và chọn các khuẩn lạc khác nhau, cấy phân lập qua một hộp môi trường TSA mới để thu khuẩn lạc thuần. Nhuộm Gram, quan sát dưới kính hiển vi xem màu sắc, hình dạng và cách sắp xếp.

Sau khi thực hiện phân lập trên môi trường TSA đã thu được 367 chủng vi khuẩn. Trong đó, có 47 chủng có hoạt tính chống oxi hóa, bao gồm:

- 11 chủng có hoạt tính chống oxi hóa ngoại bào
- 36 chủng có hoạt tính chống oxi hóa nội bào tan trong chloroform
- 13 chủng có hoạt tính chống oxi hóa nội bào tan trong nước

3.4. Định danh 47 chủng sinh chất chống vi khuẩn

Gen 16S rADN của tất cả các chủng được khuếch đại thành công với hai môi P1 và P2 và được gửi đi giải trình tự với 2 môi này.

Tất cả các trình tự của các chủng sau khi xử lý được so sánh với ngân hàng gen bằng công cụ NCBI BLAST.

Chủng	Giải trình tự Gen 16S rDNA	Chủng	Giải trình tự Gen 16S rDNA
BD5.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GL2.1	<i>Bacillus megaterium</i>
BD6.8	<i>Bacillus subtilis</i>	GL2.3	<i>Bacillus mycoides</i>
BD8.2	<i>Bacillus niacini</i>	HR04	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BH6	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	KP3	<i>Bacillus subtilis</i>
BT2.4	<i>Bacillus subtilis</i>	MK1.1	<i>Bacillus subtilis</i>
CR3	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	MK3.2	<i>Bacillus fusiformis</i>
DN14	<i>Bacillus mycoides</i>	NH1	<i>Staphylococcus sciuri</i>
DN4.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NT7.1	<i>Bacillus fusiformis</i>
DN5.2	<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	PT3.7	<i>Bacillus subtilis</i>
DQ11	<i>Bacillus subtilis</i>	PT6.1	<i>Bacillus marisflavi</i>
DQ15.2	<i>Bacillus cereus</i>	QN1.1	<i>Citrobacter youngae</i>
DQ20	<i>Bacillus subtilis</i>	QN1.2	<i>Bacillus cereus</i>

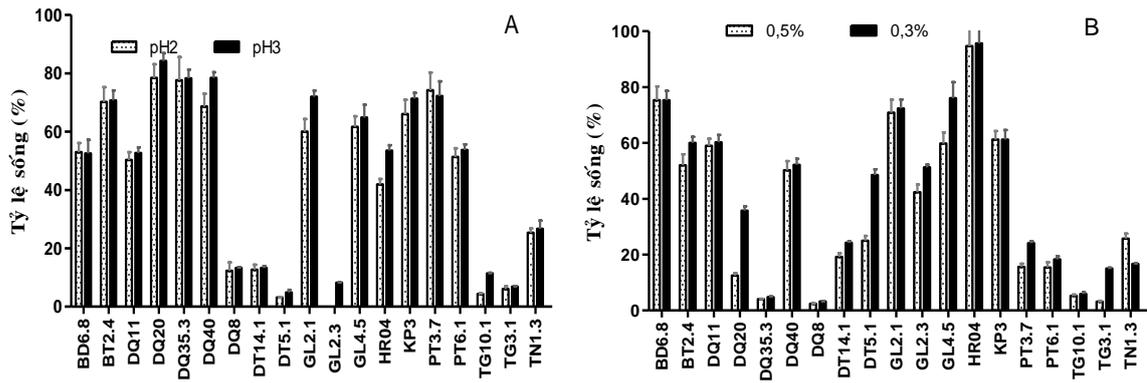
DQ24.4	<i>Micrococcus luteus</i>	QN2.2	<i>Ralstonia picketti</i>
DQ30.2	<i>Bacillus mycoides</i>	TG10.1	<i>Bacillus pumilus</i>
DQ35.3	<i>Bacillus pumilus</i>	TG3.1	<i>Bacillus subtilis</i>
DQ35.2	<i>Bacillus fusiformis</i>	TG4.1	<i>Staphylococcus sciuri</i>
DQ40	<i>Bacillus pumilus</i>	TG6.1	<i>Acinetobacter bereziniae</i>
DQ8.2	<i>Bacillus subtilis</i>	TN1.1	<i>Lysinibacillus macroides</i>
DT11.3	<i>Micrococcus luteus</i>	TN1.3	<i>Bacillus subtilis</i>
DT14.1	<i>Bacillus marisflavi</i>	TN12.3	<i>Bacillus sphaericus</i>
DT17.1	<i>Bacillus mycoides</i>	TN13.1	<i>Chromobacterium violaceum</i>
DT5.1	<i>Bacillus subtilis</i>	TN2.4	<i>Bacillus cereus</i>
DT6.1	<i>Bacillus mycoides</i>	TN2.5	<i>Bacillus safensis</i>
GL12.5	<i>Bacillus cereus</i>		

Chúng tôi chọn 19 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có kết quả định danh bằng sinh hóa và gen 16S rDNA phù hợp để có thể ứng dụng làm probiotic cung cấp chất chống oxy hóa.

3.5. Khảo sát đặc điểm probiotic của các chủng *Bacillus*

3.5.1. Khả năng chịu pH acid và muối mật

Kết quả thu được được trình bày trong Hình 1. Nhìn chung, các chủng có khả năng chịu acid và muối mật ở mức độ khác nhau, môi trường càng acid và nồng độ muối mật càng cao thì tỷ lệ sống càng thấp. Các chủng có tỷ lệ sống cao trên 50% trong môi trường acid sau 90 phút là BD6.8, BT2.4, DQ11, DQ20, DQ35.3, DQ40, GL2.1, GL4.5, HR04, KP3, PT3.7, PT6.1. Trong môi trường bổ sung muối mật một số chủng có tỷ lệ cao trên 50% gồm BD6.8, BT2.4, DQ11, DQ40, GL2.1, GL4.5, HR04 và KP3. Tổng hợp hai thử nghiệm chịu acid và muối mật, chúng tôi nhận thấy các chủng BD6.8, BT2.4, DQ11, DQ40, GL2.1, GL4.5, HR04 và KP3 có khả năng chịu cả acid và muối mật cao hơn 50%.



Hình 3.2. Tỷ lệ sống sót của 19 chủng *Bacillus* trong môi trường acid và muối mật

A: Môi trường acid sau 90 phút.

B: Môi trường muối mật sau 3 giờ.

3.5.2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Kết quả thử nghiệm trên 19 chủng vi khuẩn *Bacillus* về khả năng sinh enzyme ngoại bào cho thấy các chủng không có khả năng sinh enzyme lipase, 12 chủng có khả năng sinh 2 loại enzyme protease và amylase là BD6.8, BT2.4, DQ8, DQ11, DQ20, DQ35.3, DQ40, DT5.1, GL2.1, GL4.5, HR04, KP3, PT6.1, TG10.1 và TN1.3, các chủng còn lại DT14.1, GL2.3 và TG3.1 chỉ sinh được 1 loại enzyme protease.

3.5.3. Khả năng đối kháng với các chủng gây bệnh kháng khuẩn

Thử nghiệm đối kháng vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch MHA cho thấy các chủng *Bacillus* thử nghiệm có khả năng đối kháng với các vi khuẩn Gram âm gây bệnh đường ruột: các chủng BT2.4, DT14.1 và HR04 đối kháng với *E. coli* với đường kính vùng ức chế từ 3-5 mm, BT2.4, DQ11 và HR04 đối kháng với *Salmonella* với đường kính vùng ức chế từ 1-4 mm, chủng BT2.4, DQ20, DQ35.3, DQ40, DT14.1, HR04, KP3, PT3.7 và TG3.1 có khả năng đối kháng với *Shigella* với đường kính vùng ức chế từ 2-7 mm. Bên cạnh đó hầu hết các chủng có khả năng đối kháng với *Sarcina*, *Staphylococcus aureus*, ngoại trừ chủng BD6.8. Như vậy đa số các chủng vi khuẩn khảo sát có khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp, có thể ứng dụng làm probiotic, giúp vật chủ chống lại các vi khuẩn gây bệnh.

4. Nghiên cứu ứng dụng, chức năng

4.1. Hạn chế hậu quả sốc nhiệt

Sốc nhiệt (heat stroke) là tình trạng tăng thân nhiệt quá mức, thường trên 40°C và kèm theo đáp ứng viêm hệ thống, dẫn tới tổn thương các cơ quan cùng tổn thương trên thần kinh và tình trạng bí mồ hôi (anhidrosis) khiến cho cơ thể mất đi khả năng điều nhiệt [50]. Sốc nhiệt được chia thành 2 nhóm: sốc nhiệt cổ điển và sốc nhiệt do gắng sức. Sốc nhiệt do gắng sức thường gặp ở những người phải hoạt động thường xuyên dưới trời nắng như vận động viên, công nhân xây dựng... ; trong khi đó, sốc nhiệt cổ điển xảy ra khi nhiệt độ môi trường tăng trên 39,2°C trong thời gian dài (trong 3 ngày liên tiếp) ở những người có sức khỏe kém (người già, người bệnh, trẻ em...) [50].

Sốc nhiệt sẽ tác động đầu tiên đến đường tiêu hóa. Đường tiêu hóa có vai trò như lớp rào chắn, bảo vệ các cơ quan bên trong cơ thể khỏi vi khuẩn và nội độc tố (LPS) của các vi khuẩn Gram âm [51]. Khi đáp ứng điều hòa nhiệt của cơ thể không đủ để duy trì cân bằng nội mô, sốc nhiệt sẽ xảy ra, dẫn tới sự giải phóng các yếu tố gây viêm và làm tăng tính thấm của đường ruột, thay đổi cấu trúc nhung mao hồi tràng. Đây được xác định là nguyên nhân chủ yếu của nhiều triệu chứng liên quan đến sốc nhiệt [52]. Ngoài ra, sốc nhiệt còn gây tác động xấu lên các cơ quan khác như não, gan, thận, hệ tuần hoàn [53] [54] [50].

Việc gây tổn thương các cơ quan do sốc nhiệt làm gia tăng các gốc oxi tự do trong cơ thể gây ra sốc oxi hóa. Sốc nhiệt gây sốc oxi hóa sớm nhất ở ruột, dẫn đến hiện tượng siêu thấm ở ruột, tạo điều kiện cho vi khuẩn, LPS và các sản phẩm của vi khuẩn đi vào trong hệ tuần hoàn. Sự tăng nồng độ của LPS trong hệ tuần hoàn kích thích đại thực bào và tế bào bạch cầu trung tính đa nhân sản sinh ra các gốc tự do có chứa oxy. Các ROS này tác động lên màng lipid của tế bào sinh vật gây nên sự peroxid hóa lipid của chuỗi acid béo chưa bão hòa [55]. Điều này dẫn đến việc sinh vật chống lại với sự peroxid hóa lipid gây nên bởi các ROS trong quá trình bị oxy hóa thông qua một hệ thống gồm các enzym hoặc các chất chống oxy hóa.

Các biện pháp để hạn chế hậu quả của sốc nhiệt nhưng chủ yếu là nhắm đến việc trị liệu sau khi đã bị sốc nhiệt:

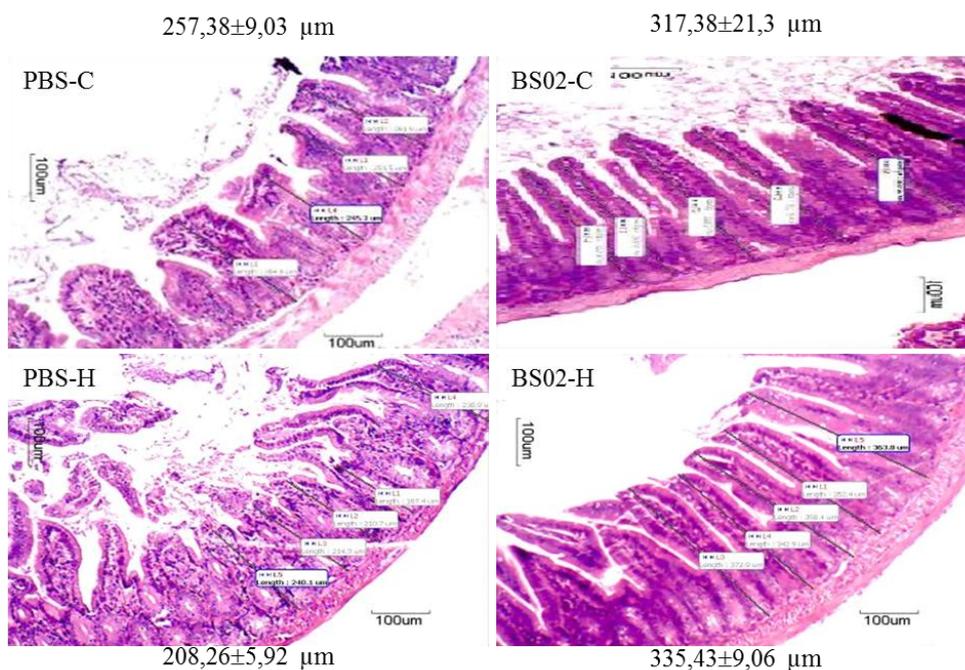
– Phương pháp làm mát bằng tác nhân vật lý: đưa bệnh nhân ra khỏi môi trường nóng, làm mát cơ thể.

– Phương pháp hạn chế hậu quả sốc nhiệt bằng tác nhân dược lý: cân bằng điện giải, thuốc an thần nếu bệnh nhân có dấu hiệu co giật, thuốc giãn cơ giúp giảm sản sinh nhiệt từ hoạt động của cơ bắp.

– Phương pháp hạn chế hậu quả sốc nhiệt bằng cách cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột là một hướng nghiên cứu mới được nhiều tác giả đưa ra. Sự cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và tính rào cản của hệ tiêu hóa có vai trò rất quan trọng trong việc bảo vệ chức năng của niêm mạc ruột, do đó tính ổn định của hệ vi sinh vật đường ruột xác định khả năng chịu đựng sốc nhiệt của sinh vật [56]. Các nghiên cứu hiện nay cho thấy tác dụng có lợi của probiotic đối với các rối loạn chức năng hàng rào ruột thông qua cơ chế kháng lại các vi khuẩn gây bệnh bám trên niêm mạc ruột, kích hoạt hệ miễn dịch của vật chủ.

4.1.1. Thử nghiệm bảo vệ nhung mao hồi tràng ở chuột bị sốc nhiệt

Chuột nhắt trắng (18 - 20g) được cho uống bào tử BS02 trong 1 tuần với liều 10^6 bào tử/10g thể trọng, 2 lần 1 ngày. Lô đối chứng thử nghiệm trong cùng điều kiện, thay bào tử BS02 bằng dung dịch đệm phosphat (PBS). Sau đó, tiến hành sốc nhiệt chuột ở lô thử và lô đối chứng với điều kiện sốc nhiệt ở 42°C trong 12 phút. Sau sốc nhiệt 2 giờ, giải phẫu thu hồi tràng chuột, nhuộm hồi tràng với H&E và xem xét sự thay đổi hình thái nhung mao hồi tràng.



Hình 4.1. Nhung mao hồi tràng chuột ở các lô thí nghiệm

PBS-C: lô đối chứng uống PBS, không sốc nhiệt; BS02-C: lô uống bào tử BS02, không sốc nhiệt; PBS-H: lô uống PBS, sốc nhiệt; BS02-H: lô uống bào tử BS02, sốc nhiệt

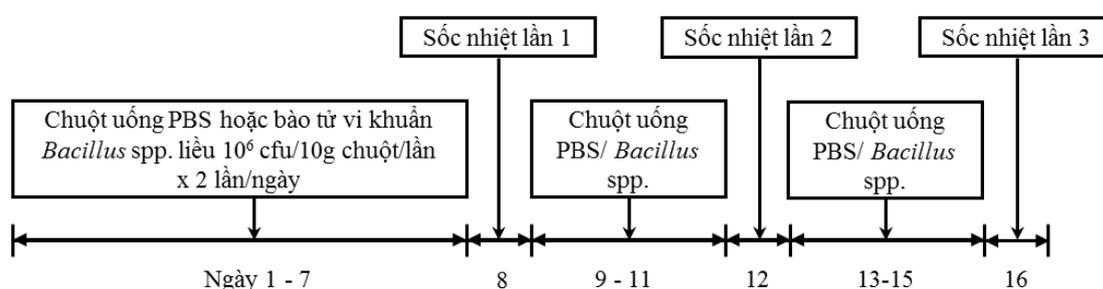
Ở chuột không sốc nhiệt, chiều dài nhung mao của chuột uống BS02 có sự khác biệt so với chuột uống PBS, dài hơn 60,00 μm .

Ở lô chuột sốc nhiệt, chiều dài nhung mao của chuột uống BS02 có sự khác biệt so với chuột uống PBS, dài hơn 127,2 μm .

4.1.2. Thay đổi chỉ số chống oxy hóa ở gan và não

Thí nghiệm sốc nhiệt

Thí nghiệm sốc nhiệt lặp lại được tiến hành như sau:



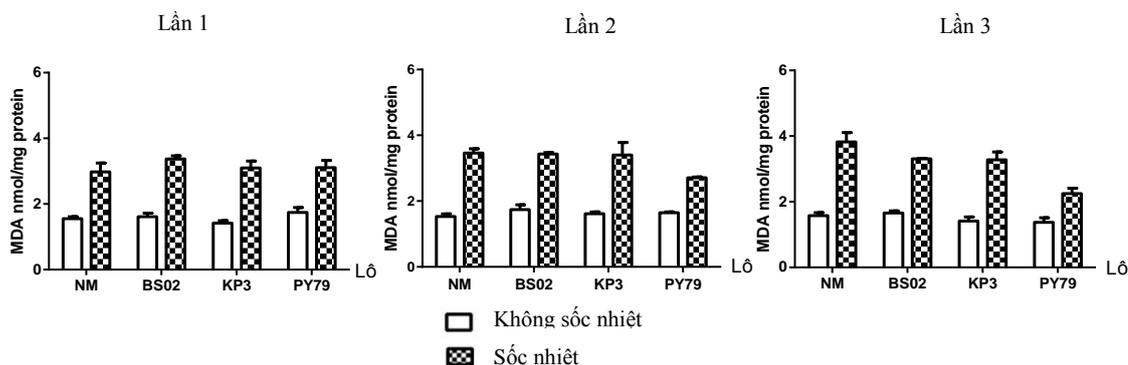
Hàm lượng MDA gan

Ở chuột không sốc nhiệt, trong cùng một lô NM hoặc bào tử ở các lần sốc nhiệt, hàm lượng MDA gan khác biệt không có ý nghĩa. Khi so sánh giữa các lô không sốc nhiệt, hàm lượng MDA gan giữa các lô bào tử khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô NM trong suốt thời gian thử nghiệm, chứng tỏ bào tử không làm tăng MDA gan của chuột.

Ở mỗi đợt sốc nhiệt, hàm lượng MDA gan ở các lô sốc nhiệt đều tăng khi so sánh với các lô chuột không sốc nhiệt ở cả lô NM và lô uống bào tử vi khuẩn. Ngoài ra, ở lô NM sốc nhiệt, hàm lượng MDA ở lần sốc nhiệt thứ 3 lớn hơn ở lần 1 có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy, sốc nhiệt lặp lại gây tăng hàm lượng MDA gan chuột uống NM.

Ở lần sốc nhiệt đầu tiên, khi so sánh hàm lượng MDA ở lô NM sốc nhiệt với các lô bào tử sốc nhiệt, chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Ở lô BS02 và KP3, hàm lượng MDA gan qua 3 lần sốc nhiệt khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, bào tử BS02 và KP3 có tác dụng ngăn cản sự gia tăng MDA gan qua các lần sốc nhiệt so với lô chứng NM. Ở lô PY79, hàm lượng MDA gan ở lần 2 và 3 giảm có ý nghĩa thống kê so với lần

sốc nhiệt đầu tiên. Điều này cho thấy bào tử PY79 có tác dụng giúp chuột giảm sự gia tăng MDA gan khi bị sốc nhiệt.



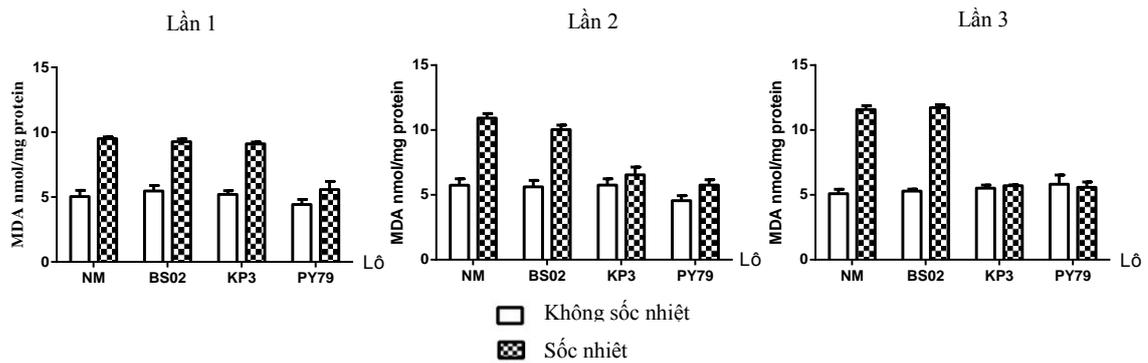
Hình 4.2. Hàm lượng MDA trong gan chuột

Hàm lượng MDA não

Tương tự như ở gan, ở chuột không sốc nhiệt, trong cùng một lô NM hoặc bào tử ở các lần sốc nhiệt, hàm lượng MDA não khác biệt không có ý nghĩa. Khi so sánh giữa các lô không sốc nhiệt, hàm lượng MDA não giữa các lô bào tử khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô NM, chứng tỏ việc uống bào tử không làm tăng MDA não.

Ở lô NM, hàm lượng MDA não chuột bị sốc nhiệt tại mỗi đợt sốc nhiệt đều tăng có ý nghĩa khi so sánh với chuột không sốc nhiệt. Đồng thời, hàm lượng MDA ở lần sốc nhiệt thứ 2 và 3 lớn hơn ở lần 1 có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy, sốc nhiệt gây tăng hàm lượng MDA não và giá trị này tăng theo số lần sốc nhiệt.

Ở lần sốc nhiệt đầu tiên, chuột uống BS02 và KP3 bị sốc nhiệt có hàm lượng MDA não khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô NM sốc nhiệt. Riêng lô PY79, hàm lượng MDA não ở lô sốc nhiệt tăng không có ý nghĩa so với lô không sốc nhiệt. Ở lô BS02, hàm lượng MDA não ở cả 3 lần sốc nhiệt khác biệt không có ý nghĩa so với lô NM sốc nhiệt. Như vậy, việc uống bào tử BS02 không có tác dụng ngăn cản sự gia tăng MDA não. Ở lô KP3, hàm lượng MDA não ở lần sốc nhiệt 2 và 3 giảm có ý nghĩa so với lần sốc nhiệt 1 và về mức không khác biệt so với lô NM không sốc nhiệt ở lần sốc nhiệt thứ 3.

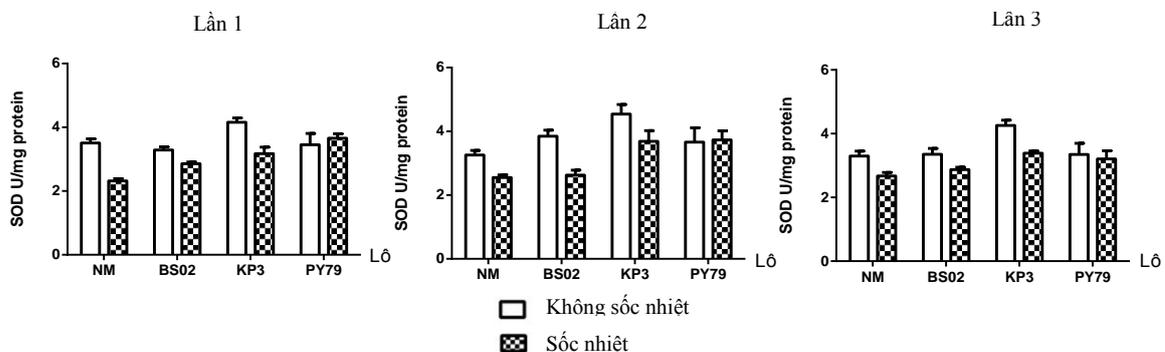


Hình 4.3. Hàm lượng MDA trong não chuột

Hoạt tính SOD gan

Khi không sốc nhiệt, trong cùng một lô NM hoặc bào tử, hoạt tính SOD gan khác biệt không có ý nghĩa ở các lần sốc nhiệt. Khi so sánh giữa các lô không sốc nhiệt, hàm lượng ở SOD gan giữa các lô BS02 và PY79 khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô NM trong suốt thời gian thử nghiệm, trong khi lô KP3 có hoạt tính SOD tăng có ý nghĩa so với lô NM. Chứng tỏ việc uống bào tử BS02 và PY79 không làm tăng hoạt tính SOD trong gan của chuột, trong khi uống bào tử KP3 có thể có lợi khi làm tăng hoạt tính enzym này.

Trong mỗi lần sốc nhiệt, hoạt tính SOD gan ở lô NM, BS02 và KP3 sốc nhiệt đều giảm so với các lô chuột không sốc nhiệt, trong khi lô PY79 có hoạt tính SOD duy trì ở mức bằng với chuột không sốc nhiệt. Ở lô BS02, hoạt tính SOD gan qua 3 lần sốc nhiệt khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô NM. Như vậy, việc uống bào tử BS02 không có tác dụng bảo vệ hoạt tính enzym SOD gan. Ở lô KP3, hoạt tính SOD gan qua 3 lần sốc nhiệt lớn hơn có ý nghĩa so với lô NM. Có thể là do chuột uống KP3 có hoạt tính SOD cao hơn ngay từ ban đầu. Như vậy bào tử vi khuẩn KP3 có tác dụng gia tăng hoạt tính SOD gan. Ở lô PY79, hoạt tính SOD gan qua 3 lần sốc nhiệt khác biệt không có ý nghĩa so với lô không sốc nhiệt. Như vậy bào tử PY79 có tác dụng bảo vệ hoạt tính SOD ở mức bằng với lô chuột không sốc nhiệt.



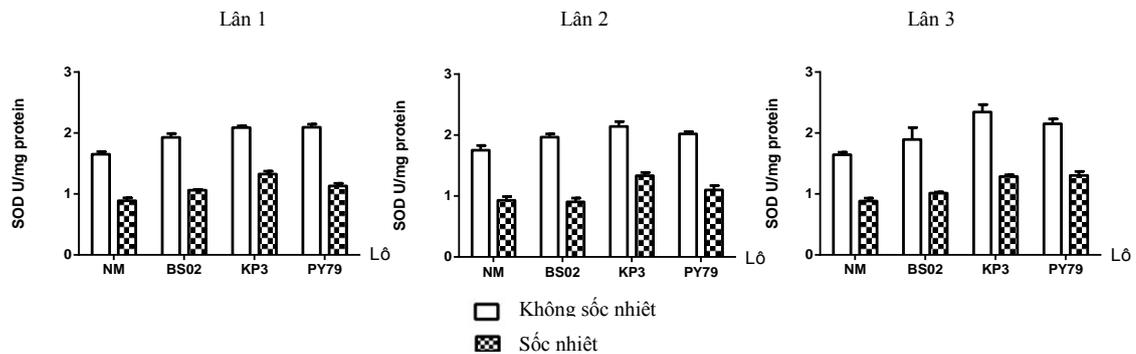
Hình 4.4. Hoạt tính SOD trong gan chuột

Hoạt tính SOD não

Tương tự ở gan, khi không sốc nhiệt lô PBS hoặc lô bào tử của cùng một chủng vi khuẩn, hoạt tính SOD não khác biệt không có ý nghĩa qua các lần sốc nhiệt chứng tỏ hoạt tính SOD não ở chuột không sốc nhiệt không thay đổi theo thời gian.

Ở các lô không sốc nhiệt, hoạt tính SOD não ở các lô bào tử tăng có ý nghĩa so với lô NM và duy trì trong suốt thời gian thí nghiệm. Như vậy, bào tử vi khuẩn BS02, KP3 và PY79 có thể có lợi khi làm tăng hoạt tính SOD não.

Ở mỗi đợt sốc nhiệt, hoạt tính SOD não ở tất cả các lô sốc nhiệt đều giảm có ý nghĩa so với các lô không sốc nhiệt, và duy trì ở cả ba lần sốc nhiệt. Tuy nhiên, hoạt tính SOD ở các lô bào tử sốc nhiệt cao hơn có ý nghĩa so với lô NM sốc nhiệt. Như vậy, bào tử vi khuẩn có thể có tác dụng trong việc hạn chế sự giảm hoạt tính SOD não khi chuột bị sốc nhiệt.

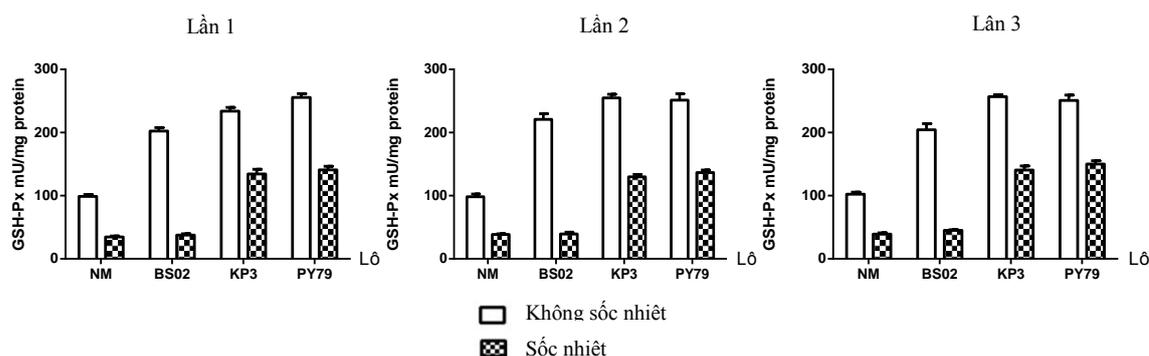


Hình 4.5. Hoạt tính SOD trong não chuột

Hoạt tính GSH-Px gan

Ở chuột không sốc nhiệt, trong cùng một lô uống PBS hoặc bào tử ở các lần sốc nhiệt, hàm lượng GSH-Px gan khác biệt không có ý nghĩa. Khi so sánh giữa các lô không sốc nhiệt, hàm lượng GSH-Px gan giữa các lô uống bào tử tăng có ý nghĩa thống kê so với lô NM trong suốt thời gian thử nghiệm. Vì vậy, việc uống bào tử có thể có tác dụng có lợi khi xét trên hoạt tính GSH-Px gan.

Trong mỗi lần sốc nhiệt, hoạt tính GSH-Px gan ở các lô sốc nhiệt đều giảm có ý nghĩa khi so sánh với các lô không sốc nhiệt ở cả lô NM và lô bào tử. Ở lô BS02, hoạt tính GSH-Px gan qua 3 lần sốc nhiệt khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô NM sốc nhiệt. Như vậy, bào tử BS02 không có tác dụng bảo vệ hoạt tính GSH-Px khi chuột bị sốc nhiệt. Ở các lô KP3 và PY79, khi so sánh với lô NM sốc nhiệt, hoạt tính GSH-Px gan cao hơn có ý nghĩa thống kê. Điều này chứng tỏ, bào tử KP3 và PY79 có thể có lợi trong sốc nhiệt khi hạn chế sự giảm hoạt tính GSH-Px gan so với lô NM sốc nhiệt.



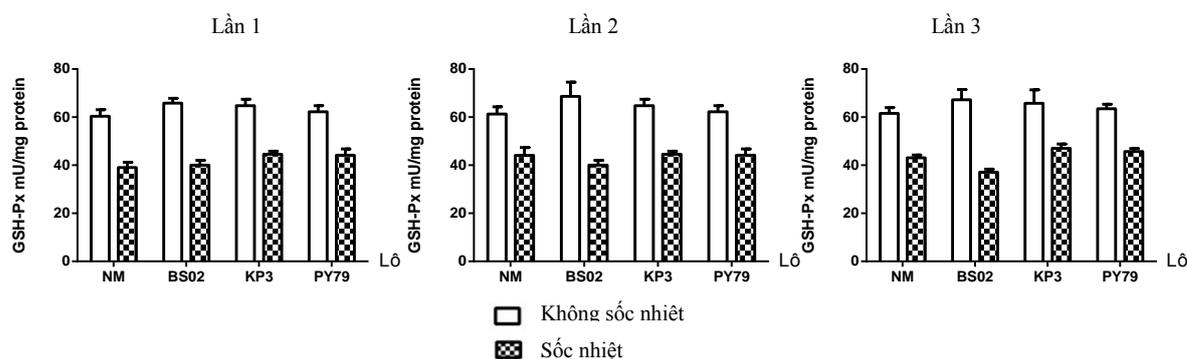
Hình 4.6. Hoạt tính GSH-Px trong gan chuột

Hoạt tính GSH-Px não

Tương tự ở gan, khi so sánh các lô NM hoặc bào tử của cùng một chủng vi khuẩn, hoạt tính GSH-Px não khác biệt không có ý nghĩa qua các lần sốc nhiệt, chứng tỏ việc uống các chủng vi khuẩn thử nghiệm không tác động đến hoạt tính GSH-Px não của chuột không sốc nhiệt, đồng thời giá trị này không đổi theo thời gian.

Trong mỗi lần sốc nhiệt, hoạt tính GSH-Px não ở các lô sốc nhiệt đều giảm có ý nghĩa khi so sánh với các lô không sốc nhiệt trên cả lô NM và lô bào tử.

Ở lô chuột uống BS02, hoạt tính GSH-Px não khi chuột bị sốc nhiệt giảm xuống thấp hơn có ý nghĩa so với lô NM sốc nhiệt qua 3 lần sốc nhiệt. Như vậy, việc uống bào tử BS02 có thể gây bất lợi khi làm giảm hoạt tính GSH-Px não ở chuột bị sốc nhiệt. Hoạt tính GSH-Px não của lô chuột uống bào tử KP3 và PY79 bị sốc nhiệt không khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với lô NM sốc nhiệt, chứng tỏ bào tử KP3, và PY79 không có tác dụng hạn chế sự giảm GSH-Px trên não chuột khi bị sốc nhiệt và qua các lần sốc nhiệt lặp lại.



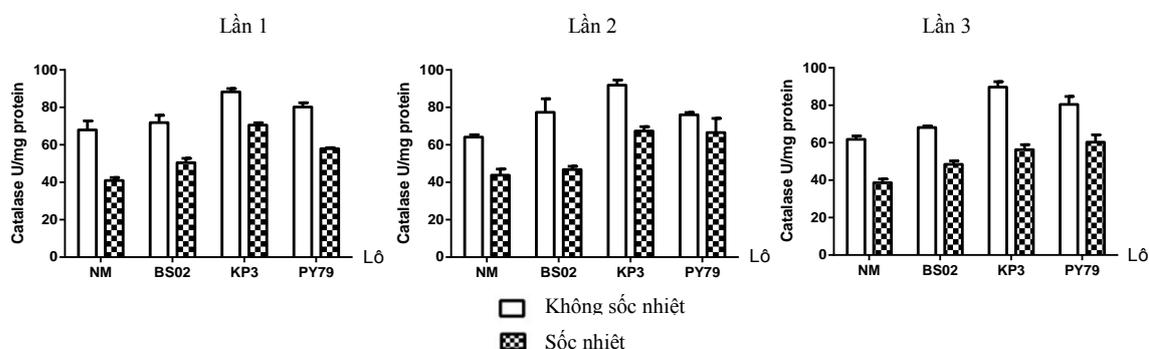
Hình 4.7. Hoạt tính GSH-Px trong não chuột

Hoạt tính Catalase gan

Từ kết quả thu được, ở chuột không sốc nhiệt, khi so sánh trong cùng một lô NM hoặc bào tử, hoạt tính Catalase gan khác biệt không có ý nghĩa qua các lần sốc nhiệt.

Khi không sốc nhiệt, hoạt tính Catalase gan ở các lô bào tử tăng có ý nghĩa so với lô NM và duy trì ở cả ba lần sốc nhiệt. Như vậy, việc uống bào tử vi khuẩn BS02, KP3 và PY79 có thể có lợi khi làm tăng hoạt tính catalase gan.

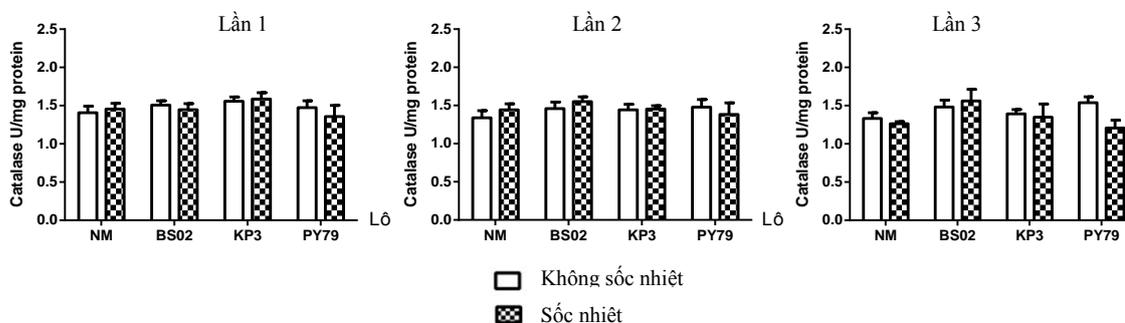
Trong mỗi lần sốc nhiệt, hoạt tính Catalase gan ở tất cả các lô sốc nhiệt đều giảm có ý nghĩa so với các lô chuột không sốc nhiệt. Như vậy, sốc nhiệt làm giảm hoạt tính Catalase gan trong cả 3 lần sốc nhiệt. Ở các lô bào tử, hoạt tính Catalase gan khi chuột bị sốc nhiệt cao hơn có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô NM sốc nhiệt. Như vậy, việc uống bào tử có thể có lợi khi hạn chế sự giảm hoạt tính Catalase gan khi chuột bị sốc nhiệt.



Hình 4.8. Hoạt tính Catalase trong gan chuột

Hoạt tính Catalase não

Ở các lô chuột uống bào tử BS02, KP3 và PY79, hoạt tính Catalase não khi chuột bị sốc nhiệt khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô NM sốc nhiệt, chứng tỏ việc uống bào tử BS02, KP3 và PY79 không ảnh hưởng đến hoạt tính Catalase não.



Hình 4.9. Hoạt tính Catalase trong não chuột

Tóm tắt kết quả:

Bảng 4.1. Bảng tóm tắt kết quả thử nghiệm hạn chế hậu quả sốc nhiệt

Lô chuột sốc nhiệt		MDA (nmol/mg pro)*		SOD (U/mg pro)*		GSH-Px (U/mg pro)*		Catalase (U/mg pro)*	
		Gan	Não	Gan	Não	Gan	Não	Gan	Não
BS02	Lần 1	ND	ND	ND	Tăng✓	ND	ND	Tăng✓	ND
	Lần 2	Tăng*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Lần 3	Tăng*	ND	ND	Tăng✓	ND	Giảm*	Tăng✓	ND
KP3	Lần 1	ND	ND	Tăng✓	Tăng✓	Tăng✓	ND	Tăng✓	ND
	Lần 2	ND	Giảm✓	Tăng✓	Tăng✓	Tăng✓	ND	Tăng✓	ND
	Lần 3	ND	Giảm✓	Tăng✓	Tăng✓	Tăng✓	ND	Tăng✓	ND
PY79	Lần 1	ND	Giảm✓	Tăng✓	Tăng✓	Tăng✓	ND	Tăng✓	ND
	Lần 2	Giảm✓	Giảm✓	Tăng✓	Tăng✓	Tăng✓	ND	Tăng✓	ND
	Lần 3	Giảm✓	Giảm✓	Tăng✓	Tăng✓	Tăng✓	ND	Tăng✓	ND

✓: Có lợi, ND: Không khác biệt, *: Gây bất lợi

Tổng kết lại, sử dụng bào tử bằng đường uống tác động lên sự thay đổi các chỉ dấu chống oxy hóa trong sốc nhiệt theo những cơ chế khác nhau, vì vậy, hiệu quả hạn chế hậu quả của sốc nhiệt cũng sẽ có sự khác biệt. Tuy nhiên, từ kết quả nghiên cứu cũng cho thấy tiềm năng trong việc sử dụng bào tử *Bacillus subtilis* KP3 và PY79 trong việc hạn chế hậu quả của sốc nhiệt dẫn đến sốc oxy hóa.

4.2. Bảo vệ gan chống stress oxy hóa của các vi khuẩn sinh chất chống oxy hóa

4.2.1. Mô hình gây viêm gan bằng CCl₄

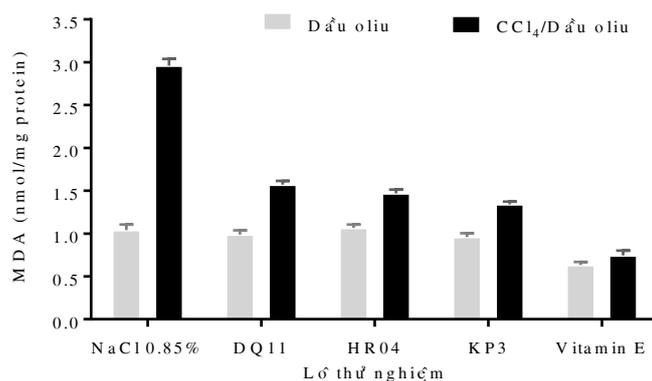
Mô hình gây viêm gan bằng CCl₄ chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 3 lô được tiến hành như sau:

	Lô (n=20)	Dung dịch dùng trong 30 ngày	Tiêm phúc mô ở ngày 30
Nhóm không tiêm CCl ₄	Đối chứng	Dung dịch nước muối sinh lý 0,85%	Dung dịch dầu oliu
	Thử	Huyền dịch bào tử của vi khuẩn khảo sát (KP3, ĐQ11, hoặc HR04) với liều 10 ⁶ CFU/ g chuột	
	Đối chiếu	Dung dịch Vitamin E hàng ngày (0,1 g/kg chuột)	
Nhóm tiêm CCl ₄	Đối chứng	Dung dịch nước muối sinh lý 0,85%	Dung dịch CCl ₄ 5% trong dầu oliu (0,5 g/kg chuột)
	Thử	Huyền dịch bào tử của vi khuẩn khảo sát (KP3, ĐQ11, hoặc HR04) với liều 10 ⁶ CFU/ g chuột	
	Đối chiếu	Dung dịch Vitamin E hàng ngày (0,1g/kg chuột)	

24 giờ sau khi tiêm CCl₄, tiến hành xác định các chỉ số chống oxy hóa trong mô bao gồm: hàm lượng MDA, hoạt tính enzym SOD, hoạt tính enzym GSH-Px, hoạt tính enzym catalase.

4.2.2. Kết quả bảo vệ gan chống stress oxy hóa của các vi khuẩn sinh chất chống oxy hóa

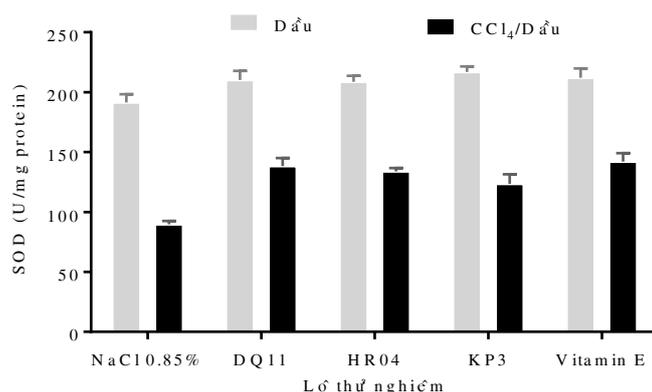
Hàm lượng MDA



Hình 4.10. Hàm lượng MDA ở các lô thử nghiệm

Các vi khuẩn thử nghiệm góp phần bảo vệ chuột khỏi tác hại của CCl₄ bằng tác động làm giảm sự peroxyd hóa lipid (khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng). So với vitamin E, các vi khuẩn có tác dụng bảo vệ kém hơn (khác biệt có ý nghĩa thống kê).

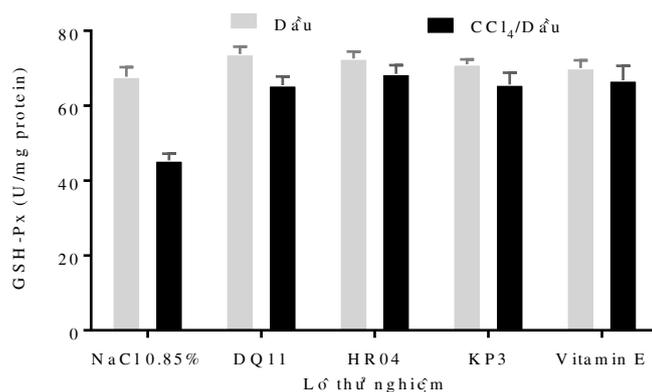
Hoạt tính enzym SOD



Hình 4.11. Hoạt tính enzym SOD ở các lô thử nghiệm

Hoạt tính SOD của lô thử nghiệm có tăng so với lô chứng nước muối, 3 chủng thử nghiệm giúp bảo vệ gan (khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng). So với vitamin E, các vi khuẩn có tác dụng tương đương (khác biệt không có ý nghĩa thống kê).

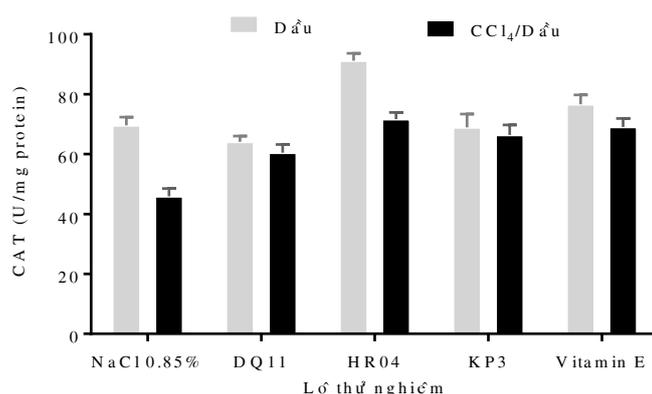
Hoạt tính enzym GSH-Px



Hình 4.12. Hoạt tính enzym GSH-Px ở các lô thử nghiệm

Hoạt tính GSH-Px của lô thử nghiệm có tăng so với lô chứng nước muối, 3 chủng thử nghiệm giúp bảo vệ gan (khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng). So với vitamin E, các vi khuẩn có tác dụng tương đương (khác biệt không có ý nghĩa thống kê).

Hoạt tính enzym catalase



Hình 4.13. Hoạt tính enzym catalase ở các lô thử nghiệm

Các chủng thử nghiệm đều có khả năng làm tăng hoạt tính enzym catalase trong các lô tiêm CCl₄ (khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng). So với vitamin E, các vi khuẩn có tác dụng tương đương (khác biệt không có ý nghĩa thống kê).

4.3. Probiotic điều trị tiêu chảy do kháng sinh

4.3.1. Gây tiêu chảy liên quan đến kháng sinh thực nghiệm trên mô hình chuột

Chuột được gây tiêu chảy bằng cách cho uống hỗn hợp hai kháng sinh phổ rộng với liều như sau: 20 mg streptomycin và 30 mg lincomycin/ 10 g chuột x 2 lần trong 4 ngày. Chuột bị tiêu chảy khi quan sát thấy trọng lượng chuột giảm, hậu môn của chuột đỏ, phân chuột bị lỏng.

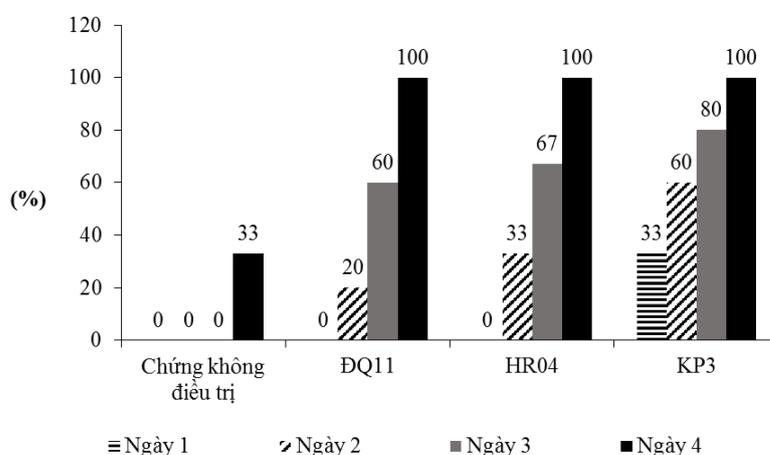
4.3.2. Thử nghiệm khả năng trị tiêu chảy trên mô hình chuột

Chuột sau khi bị tiêu chảy liên quan đến kháng sinh được chia thành các lô, mỗi lô 6 con, gồm có lô uống nước muối sinh lý và lô thử nghiệm.

Cho chuột uống bào tử vi khuẩn theo số lượng ở mỗi lô hoặc nước muối sinh lý ngày 2 lần. Đồng thời cho chuột uống kháng sinh liều duy trì bằng 1/4 liều kháng sinh gây tiêu chảy, ngày 1 lần để hạn chế khả năng tự phục hồi. Mỗi lần cho uống kháng sinh liều duy trì và uống vi khuẩn cách nhau 3 giờ. Theo dõi hiệu quả trị liệu bằng cách quan sát phân chuột hằng ngày cho đến khi hết tiêu chảy. Chuột hết tiêu chảy khi quan sát thấy trọng lượng của chuột tăng, hậu môn chuột bình thường, phân chuột khô không chảy nước.

Tỉ lệ chuột khỏi tiêu chảy sau 4 ngày điều trị với vi khuẩn sinh chất chống oxy hóa

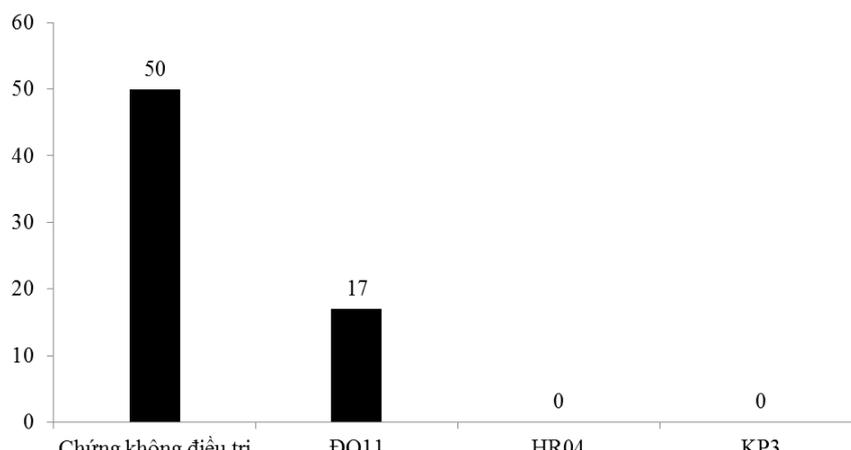
Chuột được điều trị bằng bào tử vi khuẩn DQ11 và HR04 có kết quả gần giống nhau về tỷ lệ chuột hết tiêu chảy và thời gian phục hồi. Lô chuột thí nghiệm điều trị bằng bào tử vi khuẩn KP3 có tỷ lệ chuột hết tiêu chảy theo thời gian cao hơn hai lô thí nghiệm DQ11 và HR04. Tuy nhiên cả ba lô thí nghiệm đều hết tiêu chảy hoàn toàn sau 4 ngày điều trị.



Hình 4.14. Tỷ lệ chuột khỏi tiêu chảy sau 4 ngày điều trị với vi khuẩn sinh chất chống oxy hóa

Tỉ lệ chuột chết sau 4 ngày điều trị với vi khuẩn sinh chất chống oxy hóa

Chuột được điều trị bằng bào tử vi khuẩn DQ11 do có thời gian phục hồi chậm nên có chuột chết do tiêu chảy. Ở lô chứng, do không được điều trị nên tỷ lệ chuột chết cao hơn các lô còn lại.



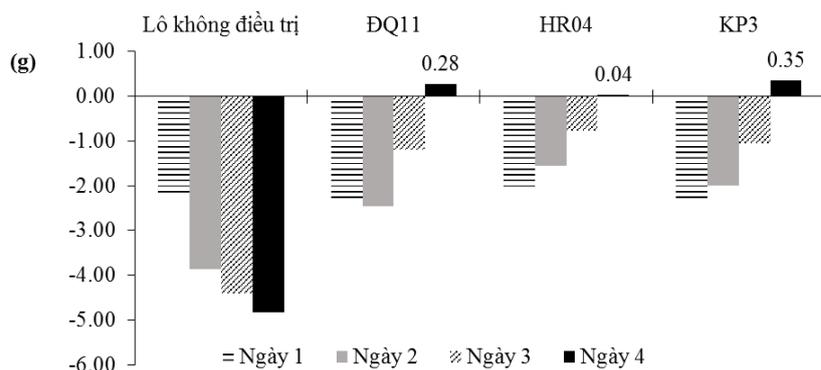
Hình 4.15. Tỷ lệ chuột chết sau 4 ngày điều trị với vi khuẩn sinh chất chống oxy hóa.

Mức độ tăng cân của chuột ở các lô thử nghiệm sau điều trị.

Ở lô chứng không điều trị, do chuột vẫn uống kháng sinh liều duy trì nên chuột không hết tiêu chảy, trọng lượng chuột giảm dần trong 4 ngày thử nghiệm. Trong khi ở lô cho uống bào tử vi khuẩn, trọng lượng của chuột ở cả 3 lô vẫn giảm sau ngày điều trị đầu tiên. Nhưng đến ngày thứ 2, trọng lượng chuột tăng lên ở các lô sử dụng bào tử vi khuẩn HR04, KP3, ngoại trừ lô uống DQ11 (tiếp tục giảm thêm 0,10 g). Sau đó, chuột ở cả 3 lô đều tăng cân, trong đó lô dùng KP3 tăng trọng nhanh hơn so với 2 lô còn lại.

Từ đó cho thấy DQ11, HR04 và KP3 có khả năng điều trị tiêu chảy với liều bào tử vi khuẩn sử dụng trong thử nghiệm.

Với liều sử dụng là 10^6 bào tử/10 g thể trọng chuột, 2 lần/ngày, liều này tương đương với liều 10^8 bào tử/1 kg thể trọng, 2 lần/ngày, tương ứng với liều của các sản phẩm probiotic chứa Bacillus của WHO, các vi khuẩn thử nghiệm đều thể hiện khả năng trị tiêu chảy liên quan đến kháng sinh; thể hiện qua tỷ lệ chuột khỏi tiêu chảy cao (100%), tỷ lệ chuột chết thấp, và tất cả chuột đều tăng cân qua mỗi ngày điều trị.



Hình 4.16. Mức độ tăng cân trung bình của các lô chuột điều trị với vi khuẩn sinh chất chống oxy hóa (g/ chuột)

5. Nghiên cứu chế phẩm yogurt chứa vi khuẩn sinh carotenoid

Đánh giá cảm quan của sữa chua bổ sung bào tử vi khuẩn sinh carotenoid.

Tiến hành khảo sát cảm quan sữa chua được bổ sung bào tử với mật độ từ 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 10^8 , $2,5 \times 10^8$, 5×10^8 CFU/ml.

Bảng 5.1. Đánh giá cảm quan của sữa chua bổ sung bào tử HU36

CFU/ml	chứng	1.10^6	5.10^6	1.10^7	$2.5.10^7$	5.10^7	$7.5.10^7$	1.10^8	$2.5.10^8$	5.10^8
Thang màu										
Màu SP										
Vị (%)	81.67	81.67	82.78	82.22	80.56	66.67	55.00	50.56	40.56	31.67
Mùi (%)	80.56	80.00	79.44	81.67	79.44	76.67	58.33	52.78	34.44	23.89
Kết cấu (%)	70.45	70.21	70.18	70.15	70.12	68.51	66.52	60.72	50.84	45.27

Bảng 5.2. Đánh giá cảm quan của sữa chua bổ sung bào tử DD1.1

CFU/ml	chứng	1.10^6	5.10^6	1.10^7	$2.5.10^7$	5.10^7	$7.5.10^7$	1.10^8	$2.5.10^8$	5.10^8
Thang màu										
Màu SP										
Vị (%)	81.67	81.11	82.22	82.22	78.33	78.89	78.33	81.11	50.56	45.04
Mùi (%)	80.56	80.00	81.11	80.56	80.56	80.00	81.67	82.78	50.56	48.89
Kết cấu (%)	70.45	70.4	70.35	70.21	70.16	70.01	65.14	60.52	50.78	48.76

Bảng 5.3. Đánh giá cảm quan của sữa chua bổ sung bào tử GB1

CFU/ml	chứng	1.10 ⁶	5.10 ⁶	1.10 ⁷	2.5.10 ⁷	5.10 ⁷	7.5.10 ⁷	1.10 ⁸	2.5.10 ⁸	5.10 ⁸
Thang màu										
Màu SP										
Vị (%)										
Mùi (%)	80.56	80.00	80.00	79.44	65.56	56.67	56.11	39.44	36.67	25.56
Kết cấu (%)	70.45	70.35	70.22	70.15	70.09	65.71	60.50	55.67	40.28	20.61

Tính ổn định trong yogurt

- Liều: 10⁷ CFU/ml yogurt
- Bảo quản: 4 °C
- Thời gian: 45 ngày

Ngày	HU36 (x 106 CFU/ml)		DD1.1 (x 106 CFU/ml)		GB1 (x 106 CFU/ml)	
	Total	Spores	Total	Spores	Total	Spores
1	6.47	3.60	5.24	2.42	7.36	3.60
7	7.56	4.12	5.80	2.66	8.46	3.77
14	7.30	3.94	5.56	2.60	9.13	4.24
21	7.71	3.89	7.98	3.82	9.70	4.64
30	8.40	4.23	10.20	4.83	9.46	4.51
45	8.93	4.51	11.16	5.14	10.64	4.65

6. Các nghiên cứu đang thực hiện

- Nghiên cứu chức năng bao gồm: viêm gan do rượu, giảm biến chứng tiểu đường, ngăn ngừa huyết khối, vaccin probiotic.
- Các thử nghiệm đang tiến hành: thử nghiệm probiotic phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm (AHPND), probiotic giúp giảm nguy cơ tim mạch, probiotic giúp tăng cường hấp thu sắt, giảm nguy cơ thiếu máu.

- Các chế phẩm đã và đang thực hiện: viên ngậm trị viêm họng chứa *Bacillus* spp., sirô chứa probiotic dùng cho trẻ em, nước uống chống sốc nhiệt, viên nang nattokinase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *nature*, 2010. 464(7285): p. 59-65.
2. Aureli, P., et al., *Probiotics and health: an evidence-based review*. *Pharmacological Research*, 2011. 63(5): p. 366-376.
3. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. *science*, 2005. 308(5728): p. 1635-1638.
4. Fanaro, S., et al., *Intestinal microflora in early infancy: composition and development*. *Acta paediatrica*, 2003. 92(s441): p. 48-55.
5. Walker, A., *Breast milk as the gold standard for protective nutrients*. *The Journal of pediatrics*, 2010. 156(2): p. S3-S7.
6. Holmes, E., et al., *Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease*. *Trends in microbiology*, 2011. 19(7): p. 349-359.
7. EFSA, *Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2010 update)*. *EFSA Journal of Applied Microbiology*, 2010. 8(12), 1944(12): p. 1994.
8. Neef, A. and Y. Sanz, *Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development*. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2013. 16(6): p. 679-687.
9. Patel, R. and H.L. DuPont, *New Approaches for Bacteriotherapy: Prebiotics, New-Generation Probiotics, and Synbiotics*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. 60(suppl 2): p. S108-S121.
10. Cani, P.D. and M. Van Hul, *Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome*. *Current opinion in biotechnology*, 2015. 32: p. 21-27.
11. Qiu, X., et al., *Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis*. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2013. 7(11): p. e558-e568.
12. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. 110(22): p. 9066-9071.

13. Cano, P.G., et al., *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. *PloS one*, 2012. 7(7): p. e41079-e41079.
14. Terai, T., et al., *Screening of Probiotic Candidates in Human Oral Bacteria for the Prevention of Dental Disease*. *PloS one*, 2015. 10(6): p. e0128657.
15. Silva, J.P.S.e. and A.C. Freitas, *Probiotic Bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects*. 2014: Pan Stanford Publishing.
16. Nguyễn Văn Duy, et al., *Công nghệ Probiotic*. 2015: NXB Khoa học và Kỹ thuật. 229.
17. Granato, D., et al., *Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products*. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2010. 9(3): p. 292-302.
18. Cutting, S.M., *Bacillus probiotics*. *Food Microbiol*, 2011. 28(2): p. 214-20.
19. Possemiers, S., et al., *Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery*. *International journal of food microbiology*, 2010. 141(1): p. 97-103.
20. Maggi, L., et al., *Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration*. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2000. 50(3): p. 389-395.
21. Rodrigues, D., et al., *On the viability of five probiotic strains when immobilised on various polymers*. *International journal of dairy technology*, 2011. 64(1): p. 137-144.
22. Iwamoto, T., et al., *Effects of probiotic Lactobacillus salivarius WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2010. 110(2): p. 201-208.
23. Iovieno, A., et al., *Preliminary evidence of the efficacy of probiotic eye-drop treatment in patients with vernal keratoconjunctivitis*. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2008. 246(3): p. 435-441.
24. Siro, I., et al., *Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review*. *Appetite*, 2008. 51(3): p. 456-467.

25. Yan, F. and D.B. Polk, *Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases*. Current opinion in gastroenterology, 2010. 26(2): p. 95.
26. Vyas, U. and N. Ranganathan, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond*. Gastroenterology research and practice, 2012. 2012.
27. Butel, M.-J., *Probiotics, gut microbiota and health*. Médecine et maladies infectieuses, 2014. 44(1): p. 1-8.
28. Rautray, A.K., et al., *POTENTIAL OF PROBIOTICS IN LIVESTOCK PRODUCTION*. MEDICAL RESEARCH, 2011: p. 20.
29. Verschuere, L., et al., *Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture*. Microbiology and molecular biology reviews, 2000. 64(4): p. 655-671.
30. De, B.C., et al., *Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses*. Fish physiology and biochemistry, 2014. 40(3): p. 921-971.
31. Nghĩa, N.Đ., *Vi sinh vật hỗ trợ nông nghiệp bền vững* Tạp chí Thông Tin Khoa Học và Công Nghệ (STINFO), 2013. Số 7/2013
32. Logan, N.A. and P.D. Vos, *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2009.
33. Khaneja, R., et al., *Carotenoids found in Bacillus*. Journal of applied microbiology, 2010. 108(6): p. 1889-1902.
34. Britton, G., *Structure and properties of carotenoids in relation to function*. Faseb J., 1995. 9(15): p. 1551-1558.
35. Delgado-Vargas, F., A. Jiménez, and O. Paredes-López, *Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000. 40(3): p. 173-289.
36. Bendich, A. and J.A. Olson, *Biological actions of carotenoids*. Faseb J, 1989. 3(8): p. 1927-32.
37. El-Agamey, A., et al., *Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties*. Arch Biochem Biophys, 2004. 430(1): p. 37-48.
38. Martin, H.D., et al., *Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions*. Pure Appl. Chem., 1999. 71(12): p. 2253-2262.

39. Smith, T.A., *Carotenoids and cancer: prevention and potential therapy*. Br J Biomed Sci, 1998. 55(4): p. 268-75.
40. Nishino, H., et al., *Cancer prevention by natural carotenoids*. BioFactors, 2008. 13(1-4): p. 89 - 94.
41. Deming, D.M., et al., *Carotenoids: linking chemistry, absorption and metabolism to potential roles in human health and disease*, in *Handbook of antioxidants* E. Cadenas and L. Packer, Editors. 2002, University of Illinois.
42. Sahnoun, Z., K. Jamoussi, and K.M. Zeghal, *Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects*. Therapie, 1998. 53(4): p. 315-39.
43. Devasagayam, T.P., et al., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*. J Assoc Physicians India, 2004. 52: p. 794-804.
44. Decker, E., C. Faustman, and C.J. Lopez-Bote, *Antioxidants in muscle foods : nutritional strategies to improve quality*. 2000, New York ; Chichester: John Wiley.
45. Yamamoto, Y., A. Kataoka, and M. Kitora, *Enhancing effect of beta-lactoglobulin on the antioxidative activity of anpha tocopherol*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998. 62: p. 1912-1916.
46. Sikora, E., E. Cieslik, and K. Topolska, *The sources of natural antioxidants*. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment, 2008. 7(1): p. 5-17.
47. Pouillot, A., et al., *Natural Antioxidants and their Effects on the Skin*, in *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products*. 2011, John Wiley & Sons, Inc. p. 239-257.
48. Augustyniak, A., et al., *Natural and synthetic antioxidants: an updated overview*. Free Radic Res, 2010. 44(10): p. 1216-62.
49. Z. R. Wang, et al., *The in vitro antioxidant properties of Bacillus simplex XJ-25 isolated from sand biological soil crusts*. African Journal of Microbiology Research 2011. 5(28): p. 4980-4986.
50. Bouchama, *Heat stroke*. New England Journal of Medicine, 2002. 346(25): p. 1978-1988.
51. Lambert, G., *Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects*. J Anim Sci, 2009. 87(14 Suppl): p. E101-E108.

52. Glazer, J.L., *Management of heatstroke and heat exhaustion*. Am Fam Physician, 2005. 71(11): p. 2133-2140.
53. Heneghan, H., et al. *Extreme Heatstroke Causing Fulminant Hepatic Failure Requiring Liver Transplantation: A Case Report*. in *Transplantation proceedings*. 2014. Elsevier.
54. Hemmelgarn, C. and K. Gannon, *Heatstroke: thermoregulation, pathophysiology, and predisposing factors*. Compend Contin Educ Vet, 2013. 35(7): p. E4.
55. Seven P. T., et al., *The Effects of Propolis in Animals Exposed Oxidative Stress, Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants*, in *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants*, D.V. Lushchak, Editor. 2012: InTech. p. 267-288.
56. Berg, R.D., *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract*, in *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2*. 1999, Springer. p. 11-30.