

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỐNG TRONG MÔI TRƯỜNG
ĐƯỜNG TIÊU HÓA CỦA ĐỘNG VẬT CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT
NHẪM TỪNG BƯỚC CHỌN LỌC TẠO NGUYÊN LIỆU SẢN XUẤT
PROBIOTICS**

*Hồ Trung Thông, Hồ Lê Quỳnh Châu
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

TÓM TẮT

*Nghiên cứu này đã được tiến hành nhằm bước đầu xác định tiềm năng probiotic ở mức độ in vitro của 11 chủng vi sinh vật được phân lập từ dịch dạ dày và dịch ruột non của lợn, nước muối dưa và yaourt. Các chủng vi sinh vật được thử nghiệm khả năng sống trong các điều kiện tương tự đường tiêu hóa của lợn. Kết quả nghiên cứu này cho thấy hầu hết các chủng vi sinh vật phân lập được đều không tồn tại được ở pH1. Chỉ có 4/11 chủng (LA5, LA6, LA7 và LA11) có khả năng tồn tại trong dịch dạ dày ở pH2 sau 180 phút xử lý. Các chủng này được sàng lọc tiếp qua các môi trường chứa pepsine (3 g/L, pH2), pancreatine (1 g/L, pH8) và muối mật (0,3%). Kết quả cho thấy cả 4 chủng đều có khả năng thích nghi cao trong các môi trường xử lý, có thể tồn tại được trong đường tiêu hóa của động vật. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA cho thấy chủng LA5 và LA11 thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*, chủng LA6 và LA7 thuộc loài *Kazachstania bovina*. Loài *Saccharomyces cerevisiae* thường được sử dụng trong sản xuất các chế phẩm probiotic dùng cho người và động vật. Như vậy, có thể sử dụng hai chủng LA5 và LA11 thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo cho mục đích tạo nguyên liệu sản xuất probiotics.*

Từ khóa: probiotic, thử nghiệm in vitro, vi sinh vật.

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, việc sản xuất các loại thực phẩm chức năng chứa probiotic tác động có lợi lên vật chủ đã và đang được quan tâm (Kumura và cs., 2004). Theo Fuller (1989), probiotic là những vi sinh vật được sử dụng làm thức ăn bổ sung gây ra những ảnh hưởng hữu ích lên vật chủ bằng cách ổn định hệ vi sinh vật đường ruột. Trên cơ sở những nghiên cứu gần đây, Salminen và cs. (1999) cho rằng probiotic là các chế phẩm hay các thành phần có nguồn gốc từ tế bào vi sinh vật có tác động có lợi lên vật chủ. Nhiều loại chế phẩm probiotic được lưu hành trên thị trường Việt Nam nhằm mục đích bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Tuy vậy, nguyên liệu cho sản xuất probiotic chủ yếu được sản xuất từ nước ngoài.

Về lý thuyết, bất cứ loài vi khuẩn, nấm sợi, nấm men hay sinh vật đơn bào không gây độc nào cũng đều có khả năng sử dụng làm probiotic. Tuy nhiên, do số lượng và sự đa dạng của các loài vi sinh vật làm cho việc sàng lọc trở nên khó khăn. Vì vậy, cần phải có một phương pháp đơn giản và hiệu quả để có thể tiến hành trên một số lượng lớn vi sinh vật. Thí nghiệm *in vivo* đòi hỏi nhiều thời gian và số lượng lớn động vật, do đó, phương pháp này chỉ có thể sử dụng sau khi đã chọn lọc được một số chủng có tiềm năng làm probiotic (Martins và cs., 2008). Các nghiên cứu *in vitro* được sử dụng để đánh giá các đặc tính của vi sinh vật, làm cơ sở cho việc sàng lọc các chủng có tiềm năng làm probiotic. Vi sinh vật được sử dụng làm probiotic phải chịu sự tác động đồng thời hay liên tiếp các điều kiện bất lợi như sốc nhiệt nhẹ (nhiệt độ cơ thể), tính acid của dịch dạ dày, các enzyme trong dịch tụy, lysozyme và muối mật (Klaenhammer và Kullen, 1999). Vấn đề này càng trở nên quan trọng trong trường hợp probiotic không có nguồn gốc từ đường tiêu hóa của động vật. Vì những lý do nêu trên, nghiên cứu này đã được tiến hành nhằm bước đầu sàng lọc các chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotic ở mức độ *in vitro*, thể hiện qua khả năng tồn tại trong điều kiện tương tự đường tiêu hóa của lợn khi xử lý bằng pH thấp, enzyme pepsine, pancreatine và muối mật.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dịch dạ dày, dịch ruột non của lợn, nước muối dưa và yaourt được lấy mẫu để phân lập vi sinh vật. Dịch dạ dày và ruột non được lấy từ lò mổ Bãi Dâu. Syringe và các dụng cụ được vô trùng trước khi lấy mẫu. Mỗi loại mẫu được lấy 20 ml sau đó đưa ngay về phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật

Mẫu được pha loãng trong dung dịch NaCl 0,85% (pH 7,2) ở các nồng độ từ 10^{-3} – 10^{-7} . Sau khi cấy gọt trên môi trường MRS agar, các mẫu được đem nuôi kỵ khí ở 37⁰C. Sau 24 đến 48 giờ, chọn những khuẩn lạc mọc riêng lẻ, phát triển mạnh để làm nguồn nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Đánh giá khả năng sống của các chủng vi sinh vật trong đường tiêu hóa ở điều kiện *in vitro*

Các chủng vi sinh vật được sử dụng để đánh giá khả năng chống chịu trong đường tiêu hóa của động vật dạ dày đơn ở điều kiện *in vitro* theo các phương pháp của Conway và cs. (1987), Charteris và cs. (1998), Kumura và cs. (2004). Quá trình này bao gồm các bước sau:

Đánh giá khả năng sống trong môi trường có pH thấp

Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy qua đêm trên môi trường MRS broth. Ly tâm thu sinh khối. Rửa tế bào bằng dung dịch NaCl 0,85% (pH 7,2). Sau đó, tái huyền phù trong các dung dịch dạ dày lợn pH1, pH2 và pH3. Sau khi ủ ở 39⁰C trong các khoảng thời gian 0, 1, 90 và 180 phút, các chủng vi sinh vật được cấy gạt trên môi trường MRS agar và nuôi ở 39⁰C. Sau 24 đến 48 giờ, xác định số lượng khuẩn lạc trên các đĩa petri (Conway và cs., 1987).

Đánh giá khả năng sống trong môi trường có pepsine

Nuôi cấy các chủng vi sinh vật qua đêm trên môi trường MRS broth. Ly tâm thu sinh khối. Rửa tế bào bằng dung dịch NaCl 0,85% (pH 7,2). Sau đó, tái huyền phù trong dung dịch PBS pH2 chứa 3 g/L pepsine (Merck, Đức). Khả năng chịu pepsine của các chủng vi sinh vật được đánh giá dựa trên số lượng khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri sau khi ủ ở 39⁰C trong các khoảng thời gian 0, 1, 90 và 180 phút, tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong dạ dày (Charteris và cs., 1998).

Đánh giá khả năng sống trong môi trường có pancreatine

Nuôi cấy các chủng vi sinh vật qua đêm trên môi trường MRS broth. Ly tâm thu sinh khối. Rửa tế bào bằng dung dịch NaCl 0,85% (pH 7,2). Sau đó tái huyền phù trong dung dịch PBS (pH8) chứa 1 g/L pancreatine (Nacalai Tesque, Nhật). Khả năng chịu pancreatine của các chủng vi sinh vật được đánh giá dựa trên số lượng khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri sau khi ủ ở 39⁰C trong các khoảng thời gian 0, 1, 2, 3 và 4 giờ, tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong ruột non (Charteris và cs., 1998).

Đánh giá khả năng sống trong môi trường có muối mật

Khả năng sống trong môi trường có muối mật của các chủng vi sinh vật được kiểm tra bằng cách ủ tế bào trong môi trường MRS broth chứa 0,3% muối mật (Himedia, Ấn Độ). Khả năng này được đánh giá dựa trên số lượng khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri sau khi ủ tế bào ở 39⁰C trong các khoảng thời gian 0, 1, 2, 3 và 4 giờ, tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong ruột non (Kumura và cs., 2004).

2.2.3. Định danh vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật có khả năng tồn tại trong môi trường xử lý nêu trên được tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA trên hệ thống ABI 3130XL, CEQ 8000 tại Phòng xét nghiệm NK-Biotek, thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.4. Xử lý thống kê

Các số liệu được xử lý thống kê với sự hỗ trợ của phần mềm SPSS 13.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi sinh vật

Từ các nguồn vật liệu khác nhau, 11 chủng vi sinh vật đã được phân lập. Trong đó có 6 chủng được phân lập từ yaourt (LA1, LA2, LA3, LA4, LA5 và LA11), 2 chủng từ dịch dạ dày (LA6 và LA7), 2 chủng từ dịch ruột non của lợn (LA8 và LA9), 1 chủng từ nước muối dưa (LA10). Các chủng này được sử dụng cho các thử nghiệm *in vitro* nhằm đánh giá khả năng sống trong các điều kiện bất lợi của đường tiêu hóa (pH thấp, pepsine, pancreatine và muối mật).

3.2. Khả năng sống của các chủng vi sinh vật trong môi trường có pH thấp

Kết quả đánh giá khả năng sống trong môi trường có pH thấp của 11 chủng vi sinh vật thử nghiệm được trình bày ở bảng 1. Dưới tác động của dịch dạ dày pH thấp, hầu hết các chủng đều có xu hướng giảm tỉ lệ sống khi kéo dài thời gian xử lý. Trong 11 chủng thử nghiệm, chỉ có 4 chủng (LA5, LA6, LA7 và LA11) có khả năng tồn tại ở điều kiện pH thấp. Tỉ lệ sống của 4 chủng này khi xử lý ở mức pH3 trong 180 phút vẫn còn cao so với trước xử lý, trong đó thấp nhất là chủng LA6 (57,66%) và cao nhất là chủng LA7 (98,11%). Sau 180 phút xử lý ở pH2, tỉ lệ sống của các chủng LA5, LA6, LA7, LA11 lần lượt là 53,56%, 28,42%, 23,23% và 27,81%. Tuy nhiên, sau 90 phút xử lý ở mức pH1, chỉ có 2 chủng LA7 và LA11 có thể tồn tại, nhưng với tỉ lệ rất thấp (0,09% ở LA7 và 0,1% đối với LA11).

Zhou và cs. (2007) cho rằng giá trị pH2 và pH3 được xem là giới hạn quyết định trong sàng lọc các chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotic. Kết quả nghiên cứu của Kim và cs. (2007) cho thấy khi xử lý bằng dịch dạ dày pH = 2,5, có 3/7 chủng vi khuẩn có khả năng chịu môi trường acid, tuy nhiên, tỉ lệ sống của các chủng này giảm mạnh chỉ còn 0,8% đến 8% sau 30 phút xử lý và tiếp tục giảm mạnh sau 2 giờ xử lý (từ 0,04% đến 0,2% so với ban đầu). Ngoài ra, khi nghiên cứu tác động của pH thấp đến khả năng sinh trưởng của các chủng nấm men, Kumura và cs. (2004) thấy rằng 6/8 chủng nấm men tồn tại được trong môi trường pH2, nhiệt độ 37⁰C sau 3 giờ xử lý. Như vậy, có thể thấy rằng các chủng LA5, LA6, LA7 và LA11 có khả năng sống trong môi trường acid của dạ dày, có thể tiếp tục sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Sự thay đổi số lượng tế bào theo thời gian ở các mức pH khác nhau

Ký hiệu chủng	pH xử lý	Các thông số thống kê	Số khuẩn lạc (10 ³ cfu/ml) qua các thời gian xử lý			
			0 phút	1 phút	90 phút	180 phút
LA1	pH3	TB ± SE	16,85 ± 0,65	0,02 ± 0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0,12	0	0
	pH2	TB ± SE	14,50 ± 0,50	0	0	0

		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
	pH1	TB ± SE	15,80 ± 0,06	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
LA2	pH3	TB ± SE	14,80 ± 0,08	0,02 ± 0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0,14	0	0
	pH2	TB ± SE	18,80 ± 1,20	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
	pH1	TB ± SE	14,60 ± 0,60	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
LA3	pH3	TB ± SE	5,70 ± 0,03	3,40 ± 0,20	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	59,65	0	0
	pH2	TB ± SE	6,60 ± 0,60	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
	pH1	TB ± SE	8,10 ± 1,10	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
LA4	pH3	TB ± SE	8,70 ± 0,70	4,70 ± 0,30	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	54,02	0	0
	pH2	TB ± SE	8,80 ± 0,40	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
	pH1	TB ± SE	8,90 ± 0,90	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
LA5	pH3	TB ± SE	70,50 ± 0,70	44,60 ± 0,96	41,60 ± 1,36	54,80 ± 1,16
		Tỉ lệ sống (%)	100	63,32	59,06	77,79
	pH2	TB ± SE	53,70 ± 0,50	45,70 ± 3,90	23,20 ± 0,96	28,80 ± 4,40
		Tỉ lệ sống (%)	100	85,07	43,20	53,56
	pH1	TB ± SE	28,70 ± 5,3	14,20 ± 0,3	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	49,55	0	0

LA6	pH3	TB ± SE	40,10 ± 2,50	27,20 ± 6,40	14,20 ± 0,20	23,10 ± 2,30
		Tỉ lệ sống (%)	100	67,83	35,41	57,66
	pH2	TB ± SE	29,20 ± 4,20	38,40 ± 1,60	6,81 ± 1,15	8,30 ± 0,50
		Tỉ lệ sống (%)	100	131,37	23,32	28,42
	pH1	TB ± SE	34,8 ± 7,60	15,1 ± 1,60	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	43,33	0	0
LA7	pH3	TB ± SE	12,70 ± 0,30	6,29 ± 0,07	7,57 ± 1,35	12,46 ± 0,86
		Tỉ lệ sống (%)	100	49,53	59,61	98,11
	pH2	TB ± SE	15,5 ± 0,10	7,46 ± 0,54	4,68 ± 0,32	3,60 ± 0,20
		Tỉ lệ sống (%)	100	48,13	30,19	23,23
	pH1	TB ± SE	22,00 ± 4,20	9,30 ± 1,50	0,02 ± 0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	42,27	0,09	0
LA8	pH3	TB ± SE	22,20 ± 1,80	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
	pH2	TB ± SE	26,90 ± 0,6	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
	pH1	TB ± SE	33,00 ± 1,40	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
LA9	pH3	TB ± SE	10,66 ± 1,06	0,50 ± 0,10	0,02 ± 0	0,02 ± 0
		Tỉ lệ sống (%)	100	4,69	0,19	0,19
	pH2	TB ± SE	12,50 ± 0,90	0,01 ± 0,01	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0,08	0	0
	pH1	TB ± SE	9,90 ± 1,50	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
LA10	pH3	TB ± SE	9,40 ± 0,60	1,06 ± 0,02	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	11,28	0	0
	pH2	TB ± SE	12,20 ± 0,60	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0

	pH1	TB ± SE	12,40 ± 0,40	0	0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	0	0	0
LA11	pH3	TB ± SE	54,00 ± 11,20	28,20 ± 0,80	46,20 ± 1,00	43,10 ± 1,20
		Tỉ lệ sống (%)	100	52,30	85,61	79,85
	pH2	TB ± SE	94,20 ± 10,60	41,20 ± 2,96	31,80 ± 3,00	26,20 ± 1,40
		Tỉ lệ sống (%)	100	43,91	33,76	27,81
	pH1	TB ± SE	60,70 ± 0,90	26,90 ± 0,30	0,06 ± 0	0
		Tỉ lệ sống (%)	100	44,32	0,10	0

3.3. Khả năng sống của các chủng vi sinh vật trong môi trường có pepsine

Theo Holzapfel và cs. (1998), pH thấp của dạ dày và hoạt tính kháng vi sinh vật của pepsine được xem là rào cản hữu hiệu chống lại sự xâm nhiễm của các vi khuẩn vào đường tiêu hóa. Kết quả nghiên cứu khả năng sống trong môi trường có pepsine của 4 chủng LA5, LA6, LA7 và LA11 được trình bày ở bảng 2. Khi xử lý bằng pepsine (3 g/L, pH2), các chủng LA5, LA7 và LA11 đều có xu hướng giảm dần tỉ lệ sống theo thời gian, trong đó, chủng LA5 có tỉ lệ sống thấp nhất (46,32%) và cao nhất là chủng LA7 (76,78%) sau 180 phút xử lý. Riêng ở chủng LA6, tỉ lệ sống giảm khi xử lý trong 1 phút (76,35%), sau đó, tăng đột biến ở giai đoạn 90 phút (252,84%) và 180 phút (274,97%) so với ban đầu. Điều này chứng tỏ rằng chủng LA6 rất ít bị tác động của pepsine, sự suy giảm số lượng tế bào chỉ ở thời điểm đầu tiên sau xử lý (1 phút) sau đó tế bào phát triển bình thường theo thời gian xử lý (90 phút, 180 phút). Kết quả nghiên cứu của Charteris và cs. (1998) cũng cho thấy tỉ lệ sống của các chủng vi khuẩn có xu hướng giảm dần khi tiến hành xử lý bằng pepsine (3 g/L, pH2) trong các khoảng thời gian khác nhau. Sự quan sát này đúng với các chủng LA5, LA7 và LA11.

Bảng 2. Sự thay đổi số lượng tế bào theo thời gian khi xử lý trong môi trường có pepsine (3g/L, pH2) của các chủng vi sinh vật

Ký hiệu chủng	Các thông số thống kê	Số khuẩn lạc (10^4 cfu/ml) qua các thời gian xử lý			
		0 phút	1 phút	90 phút	180 phút
LA5	TB ± SE	8,82 ± 2,06	4,95 ± 0,21	4,79 ± 0,34	4,07 ± 0,36
	Tỉ lệ sống (%)	100	56,18	54,36	46,32
LA6	TB ± SE	9,64 ± 1,24	7,36 ± 0,52	24,37 ± 1,19	26,51 ± 0,75
	Tỉ lệ sống (%)	100	76,35	252,84	274,97
LA7	TB ± SE	11,25 ± 0,46	9,41 ± 0,15	8,51 ± 0,24	8,64 ± 0,33

	Tỉ lệ sống (%)	100	83,65	75,59	76,78
LA11	TB ± SE	75,40 ± 3,60	59,20 ± 2,20	53,60 ± 1,20	47,20 ± 0,80
	Tỉ lệ sống (%)	100	78,51	71,09	62,60

3.4. Khả năng sống của các chủng vi sinh vật trong môi trường có pancreatine

Bảng 3. Sự thay đổi số lượng tế bào theo thời gian khi xử lý trong môi trường có pancreatine (1g/L, pH8) của các chủng vi sinh vật

Ký hiệu chủng	Các thông số thống kê	Số khuẩn lạc (10^3 cfu/ml) sau các thời gian xử lý				
		0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ
LA5	TB ± SE	40,10 ± 0,50	32,90 ± 2,60	31,60 ± 4,60	36,20 ± 2,70	33,60 ± 5,00
	Tỉ lệ sống (%)	100	82,00	78,84	90,31	83,79
LA6	TB ± SE	7,49 ± 1,13	42,29 ± 2,56	45,55 ± 4,04	45,87 ± 1,35	48,53 ± 2,82
	Tỉ lệ sống (%)	100	564,41	607,83	612,10	647,69
LA7	TB ± SE	9,28 ± 0,68	11,17 ± 1,67	10,29 ± 1,24	11,04 ± 1,31	9,63 ± 1,16
	Tỉ lệ sống (%)	100	120,40	110,92	118,97	103,74
LA11	TB ± SE	9,47 ± 1,19	5,87 ± 0,64	3,06 ± 0,48	3,69 ± 0,55	3,61 ± 0,14
	Tỉ lệ sống (%)	100	61,97	32,32	39,01	38,17

Khả năng chịu pancreatine (1g/L, pH8) của 4 chủng vi sinh vật thử nghiệm được trình bày ở bảng 3. Sau 4 giờ xử lý bằng dung dịch pancreatine, cả 4 chủng đều có khả năng sống sót. Khi kéo dài thời gian xử lý, ở 2 chủng LA5 và LA11 xuất hiện sự suy giảm số lượng tế bào so với ban đầu, tuy nhiên, sự suy giảm ở chủng LA5 là ít (83,97% so với trước xử lý). Ngược lại, kết quả xử lý pancreatine trên 2 chủng LA6 và LA11 cho thấy pancreatine không có tác động bất lợi đến sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Đặc biệt, ở chủng LA6 sau 4 giờ xử lý, số lượng tế bào tăng đến 647,69% so với trước khi xử lý. Điều này chứng tỏ rằng chủng LA5, LA6 và LA11 có khả năng thích nghi tốt trong môi trường chứa pancreatine (1 g/L, pH8). Nghiên cứu của Charteris và cs. (1998) cũng cho thấy khả năng chống chịu trong môi trường ruột non của các chủng vi khuẩn *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* khác nhau tùy theo từng chủng. Phần lớn các chủng thí nghiệm chống chịu tốt trong môi trường chứa pancreatine, số lượng tế bào tương đối ổn định qua các thời gian xử lý. Tuy nhiên, có một số chủng mẫn cảm với pancreatine, tỉ lệ sống giảm nhanh sau 4 giờ xử lý.

3.5. Khả năng sống của các chủng vi sinh vật trong môi trường có muối mật

Havenaar và cs. (1992) đã chỉ ra rằng probiotic chỉ phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại trong ruột non (tdt Zhou và cs., 2007). Môi trường ruột non chứa pancreatine và muối mật là các yếu tố ức chế sinh trưởng của vi sinh vật. Theo Gilliland và cs. (1984), 0,3% được xem là nồng độ quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng chống chịu muối mật. Tương tự như kết quả xử lý bằng pancreatine, cả 4 chủng vi sinh vật đều có khả năng chịu muối mật (bảng 4). Nồng độ muối mật 0,3% chỉ có tác động bất lợi đến khả năng sinh trưởng và phát triển, làm giảm tỉ lệ sống của 2 chủng LA5 và LA11 sau 4 giờ xử lý. Ngược lại, số lượng tế bào có hiện tượng tăng lên ở chủng LA6 và LA7 khi kéo dài thời gian xử lý. Chủng LA6 vẫn cho thấy sự thích nghi cao trong môi trường chứa muối mật, sau 4 giờ xử lý số lượng tế bào tăng lên đến 423,60% so với ban đầu. Tương tự kết quả nghiên cứu của chúng tôi, nghiên cứu của Kim và cs. (2007), Trần Quốc Việt và cs. (2009) cũng cho thấy, các chủng vi sinh vật thử nghiệm đều có khả năng tồn tại trong môi trường chứa muối mật với nồng độ 0,3%.

Bảng 4. Sự thay đổi số lượng tế bào theo thời gian khi xử lý trong môi trường có muối mật (0,3%) của các chủng vi sinh vật

Ký hiệu chủng	Các thông số thống kê	Số khuẩn lạc (10^3 cfu/ml) sau các thời gian xử lý				
		0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ
LA5	TB \pm SE	18,05 \pm 0,07	15,47 \pm 1,54	14,09 \pm 0,45	11,36 \pm 1,33	10,19 \pm 0,99
	Tỉ lệ sống (%)	100	85,67	78,06	62,92	56,43
LA6	TB \pm SE	8,36 \pm 1,40	31,36 \pm 0,61	38,72 \pm 1,68	35,95 \pm 3,05	35,41 \pm 1,29
	Tỉ lệ sống (%)	100	375,12	463,16	429,98	423,60
LA7	TB \pm SE	11,47 \pm 1,04	13,68 \pm 1,30	15,71 \pm 1,28	16,40 \pm 0,59	14,08 \pm 1,36
	Tỉ lệ sống (%)	100	119,30	136,98	143,02	122,79
LA11	TB \pm SE	8,96 \pm 0,66	10,05 \pm 0,60	7,42 \pm 0,48	5,19 \pm 0,32	4,72 \pm 0,49
	Tỉ lệ sống (%)	100	112,13	82,81	57,96	52,68

3.6. Kết quả định danh vi sinh vật

Các chủng đã qua sàng lọc *in vitro* (LA5, LA6, LA7 và LA11) được tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự. Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA của các chủng và so sánh mức độ tương đồng giữa các đoạn gen với dữ liệu các loài vi sinh vật đã công bố trong Ngân hàng gen được trình bày ở hình 1 (LA5), hình 2 (LA6), hình 3 (LA7) và hình 4 (LA11).

LA5	1	ACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATACGGAAATGTAGCCTTGCCTCG	60
<i>S. cerevisiae</i>	418	ACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATA-GGAAATGTAG-CTTGCCTCG	475
LA5	61	GTAAGTATTATAGCCTGTGTTGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCA	120
<i>S. cerevisiae</i>	476	GTAAGTATTATAGCCTGTGTTGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCA	535
LA5	121	AGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAACAG	163
<i>S. cerevisiae</i>	536	AGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAACAG	578

Hình 1. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng LA5 và gen 26S rRNA của *Saccharomyces cerevisiae*

LA6	1	GTTTTGCGCCCCCTGCTCCTTGTGGCGGGGATCCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCA	60
<i>K. bovina</i>	381	GTTTTGCGCCCCCTGCTCCTTGTGGCGGGGATCCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCA	440
LA6	61	GTTTTGGCGGCTGGATAAAAACCGGAGGAATGTGGCTTCTCTCGGGAAGTGTATAGCCTG	120
<i>K. bovina</i>	441	GTTTTGGCGGCTGGATAAAAACCGGAGGAATGTGGCTTCTCTCGGGAAGTGTATAGCCTG	500
LA6	121	CGGGAATGCGGCCAGCCGGGACTGAGGAACGCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCATAATG	180
<i>K. bovina</i>	501	CGGGAATGCGGCCAGCCGGGACTGAGGAACGCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCATAATG	560
LA6	181	GTTATATGCCGC	192
<i>K. bovina</i>	561	GTTATATGCCGC	572

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng LA6 và gen 26S rRNA của loài *Kazachstania bovina*

LA7	1	GTTTTGCGCCCCCTGCTCCTTGTGGCGGGGATCCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCA	60
<i>K. bovina</i>	381	GTTTTGCGCCCCCTGCTCCTTGTGGCGGGGATCCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCA	440
LA7	61	GTTTTGGCGGCTGGATAAAAACCGGAGGAATGTGGCTTCTCTCGGGAAGTGTATAGCCTG	120
<i>K. bovina</i>	441	GTTTTGGCGGCTGGATAAAAACCGGAGGAATGTGGCTTCTCTCGGGAAGTGTATAGCCTG	500
LA7	121	CGGGAATGCGGCCAGCCGGGACTGAGGAACGCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCATAATG	180
<i>K. bovina</i>	501	CGGGAATGCGGCCAGCCGGGACTGAGGAACGCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCATAATG	560
LA7	181	GTTATATGCCGC	192
<i>K. bovina</i>	561	GTTATATGCCGC	572

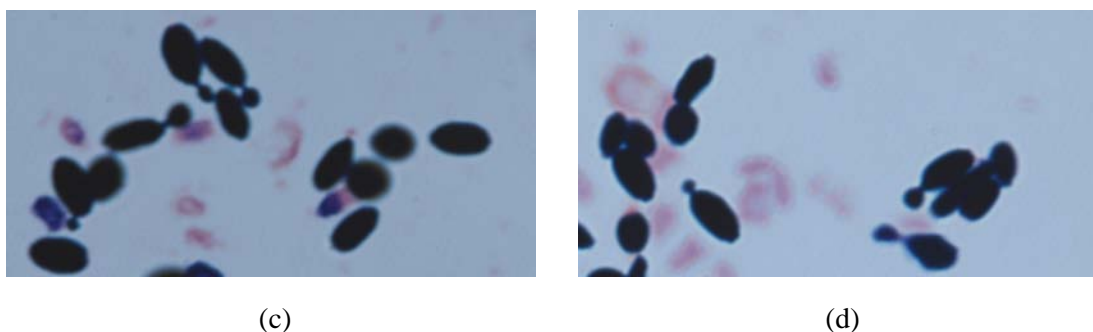
Hình 3. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng LA7 và gen 26S rRNA của loài *Kazachstania bovina*

LA11	1	TGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAG	60
<i>S. cerevisiae</i>	317	TGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAG	259
LA11	61	CATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATA	120
<i>S. cerevisiae</i>	258	CATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATA	199
LA11	121	GCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCA	180
<i>S. cerevisiae</i>	198	GCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCA	139
LA11	181	TAAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAAACACGGACCAAGGAGTC	224
<i>S. cerevisiae</i>	138	TAAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAAACACGGACCAAGGAGTC	95

Hình 4. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng LA11 và loài *Saccharomyces cerevisiae*



Hình 5. Kết quả nhuộm gram các chủng LA5 (a) và LA11 (b)



Hình 6. Kết quả nhuộm gram các chủng LA6 (c) và LA7 (d)

Các kết quả so sánh ở trên cho thấy, mức độ tương đồng giữa chủng LA5 và LA11 với *Saccharomyces cerevisiae* lần lượt là 98% và 99%. Trình tự gen của các chủng LA6 và LA7 tương đồng 100% với *Kazachstania bovina*. Có thể thấy rằng, các chủng LA5 và LA11, LA6 và LA7 tuy cùng một loài nhưng khả năng thích nghi với các điều kiện bất lợi của môi trường chọn lọc lại khác nhau. Kumura và cs. (2004) cho rằng ngay cả khi thuộc cùng 1 loài nhưng tác động probiotic của các chủng khác nhau có thể khác nhau. Việc sử dụng phương pháp *in vitro* có thể chọn lọc được các chủng probiotic mang các tính chất đặc trưng. Hiện nay, loài *Saccharomyces cerevisiae* được sử dụng rất

phổ biến trong sản xuất các chế phẩm probiotic dùng cho người và động vật. Nhiều nghiên cứu cho thấy việc bổ sung *Saccharomyces cerevisiae* vào khẩu phần sẽ giúp cải thiện tỉ lệ tiêu hóa các chất dinh dưỡng (Ghasemi và cs., 2006), tăng khả năng đáp ứng miễn dịch (Asli và cs., 2007) ở động vật. *Saccharomyces cerevisiae* còn là nguyên liệu cho sản xuất prebiotics làm thức ăn bổ sung trong chăn nuôi như sản xuất β -glucan.

4. Kết luận

Hầu hết các chủng vi sinh vật thử nghiệm đều không có khả năng sống trong môi trường pH1. Trong 11 chủng vi sinh vật đã phân lập và đánh giá tiềm năng probiotic ở mức độ *in vitro*, có 4 chủng (LA5, LA6, LA7 và LA11) có khả năng tồn tại trong điều kiện tương tự đường tiêu hóa của động vật. Kết quả định danh 4 chủng vi sinh vật này bằng kỹ thuật phân tử cho thấy có 2 chủng thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* (LA5, LA11) và 2 chủng thuộc loài *Kazachstania bovina* (LA6, LA7). Như vậy, có thể sử dụng hai chủng LA5 và LA11 thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* làm vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo trong quá trình tạo nguyên liệu cho sản xuất probiotics ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Quốc Việt, Bùi Thị Thu Huyền, Dương Văn Hợp và Vũ Thành Lâm. *Phân lập, tuyển chọn và đánh giá các đặc tính probiotic của một số chủng vi sinh vật hữu ích để sản xuất các chế phẩm probiotic dùng trong chăn nuôi*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi, 16, (2009), 35-45.
2. Asli M.M., Hosseini S.A., Lotfollahian H., and Shariatmadari F. *Effect of probiotics, yeast, vitamin E and vitamin C supplements on performance and immune response of laying hen during high environmental temperature*. International Journal of Poultry Science, 6(12), (2007), 895-900.
3. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., and Collins J.K. *Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract*. J. Appl. Microbiol, 84, (1998), 759-768.
4. Conway P.L., Gorbach S.L., and Goldin B.R. *Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells*. J. Dairy Sci., 70, (1987), 1-12.
5. Fuller R. *Probiotics in man and animals*. J. Appl. Bacteriol, 66, (1989), 365-378.
6. Ghasemi H.A., Tahmasbi A.M., Moghaddam Gh., Mehri M., Alijani S., Kashefi E., and Fasihi A. *The effect of phytase and Saccharomyces cerevisiae (Sc47) supplementation on performance, serum parameter, phosphorous and calcium retention of broiler chickens*. International Journal of Poultry Science, 5(2), (2006), 162-168.

7. Gilliland S.E., Staley T.E., Bush L.J. *Importance in bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct*. J. Dairy Sci, 67(12), (1984), 3045-3051.
8. Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger ., Huis In't Veld J.J.H. *Overview of gut flora and probiotics*. Int. J. Food Microbiol, 41(2), (1998), 85-101.
9. Kim P.I., Jung M.Y., Chang Y.H., Kim S., Kim S.J., Park Y.H. *Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract*. Appl Microbiol Biotechnol, 74, (2007), 1103-1111.
10. Klaenhammer T.R. and Kullen M.J. *Selection and design of probiotics*. Int. J. Food Microbiol, 50, (1999), 45-57.
11. Kumura H., Tanoue Y., Tsukahara M., Tanaka T., Shimazaki K. *Screening of dairy yeast strains for probiotic applications*. J. Dairy Sci., 87, (2004), 4050-4056.
12. Martins F.S., Miranda I.C., Rosa C.A., Nicoi J.R., and Neves M.J. *Effect of the trehalose levels on the screening of yeast as probiotic by in vivo and in vitro assays*. Brazilian Journal of Microbiology, 39, (2008), 50-55.
13. Salminen S.A., Ouwehand A., Benno Y., and Lee Y.K. *Probiotics: How should they be defined?* Trends Food Sci. Technol, 10, (1999), 107-110.
14. Zhou X., Pan Y., Wang Y., and Li W. *In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, Rhodospseudomonas palustris and Rhodobacter sphaeroides*. J. Zhejiang Univ Sci B, 8(9), (2007), 686-692.

STUDY ON TOLERANCE TO ANIMAL GASTROINTESTINAL TRACT CONDITIONS OF SOME MICROORGANISM STRAINS TO CREATE MATERIALS FOR PROBIOTIC PRODUCTION

*Ho Trung Thong, Ho Le Quynh Chau
College of Agriculture and Forestry, Hue University*

SUMMARY

This study was aimed at preliminarily evaluating the in vitro potential probiotic of 11 microorganism strains isolated from different sources. These strains were assayed for their capacity of resistance to the mimic animal gastrointestinal tract conditions. The viability of examined strains almost could not be found in pH1. With regard to 11 tested strains, only four isolates (LA5, LA6, LA7 and LA11) could survive after treated in pH2 gastric juice for 180 minutes. The four strains were continuously screened in solutions containing pepsine (3 g/L, pH2), pancreatine (1 g/L, pH8) or bile salts (0,3%). The results showed that all of the tested strains were highly adaptable under treatment conditions, and could survive in animal gastrointestinal tracts. To identify these strains, a fragment of 28S rRNA gene of the four

screened strains was sequenced. The sequencing results indicated that LA5 and LA11 strains belonged to Saccharomyces cerevisiae, and LA6 and LA7 belonged to Kazachstania bovina. In conclusion, LA5 and LA11 strains belonging to species Saccharomyces cerevisiae can be used for further studies aimed at creating materials for probiotic production in Vietnam.

Key words: *in vitro test, probiotic, microorganism.*