

PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG PROBIOTICS CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM MEN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TỪ CHẤT CHỨA TRONG RUỘT GÀ

Phan Thị Hằng*, Nguyễn Văn Chèo, Dương Thanh Hải, Trần Quang Vui,
Lê Minh Đức, Nguyễn Xuân Hoà

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: phanthihang87@huaf.edu.vn

Nhận bài: 14/10/2022 Hoàn thành phản biện: 14/11/2022 Chấp nhận bài: 15/11/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) định hướng sản xuất probiotics dùng trong chăn nuôi. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 32 chủng nấm men từ 52 mẫu chất chứa trong ruột gà khỏe mạnh. Dựa vào đặc điểm hình thái, sinh hóa và định danh bằng phương pháp khuếch đại vùng gen ITS đã xác định được 3 chủng nấm men (Y35, Y63, Y100) thuộc loài *S. cerevisiae*. Ba chủng *S. cerevisiae* này đã được sàng lọc thêm các đặc tính khác để có thể sử dụng chúng như loại probiotics bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Các chủng nấm men đã được đánh giá các đặc tính: khả năng chịu được môi trường nhiệt độ cao (30°C, 37°C, 42°C và 50°C), pH thấp (2,0; 3,0 và 4,0) và có muối mật (0,1; 0,2 và 0,3%). Kết quả sàng lọc cho thấy trong 3 chủng nấm men *S. cerevisiae* (Y35, Y63, Y100) thì chủng nấm men Y35, Y100 cho sinh khối cao hơn, thích ứng được với môi trường có nhiệt độ cao (42°C), pH thấp (pH2) và có muối mật (0,3%). Vì vậy, có thể sử dụng 2 chủng *S. cerevisiae* Y35, Y100 để đánh giá thêm các tiêu chí khác cho mục đích sản xuất probiotics dùng trong chăn nuôi.

Từ khóa: Chủng nấm men, Probiotics, *S. cerevisiae*

ISOLATION, IDENTIFICATION AND ASSESSMENT OF PROBIOTICS POTENTIAL OF SOME *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS FROM THE DIGESTIVE TRACT OF CHICKENS

Phan Thi Hang*, Nguyen Van Chao, Duong Thanh Hai, Tran Quang Vui,
Le Minh Duc, Nguyen Xuan Hoa

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

The study was carried out to isolate, identify *Saccharomyces cerevisiae* from the digestive tract of chicken and evaluate the appropriateness for use as a probiotic. A total of 32 yeast strains were isolated from the 52 digestive tracts of chicken samples. The yeast strains were isolated using yeast peptone dextrose agar medium and identified through morphological, physiological, and biochemical tests as well as sequence homology analyses of the ITS region. Three strains Y35, Y63, and Y100 were obtained and have been identified as *Saccharomyces cerevisiae* species. The strains were further screened so that they could be used as probiotic strains added to animal feed. The strains have been evaluated for some properties: resistance to high temperature (30°C, 37°C, 42°C, 50°C), to low pH (2.0; 3.0 and 4.0) and bile salts (0.1%, 0.2%, and 0.3%). The results showed that among the three strains (Y35, Y63, Y100), the Y35, and Y100 strains had higher biomass, tolerance to high temperature (42°C), low pH (2), and bile salts (0.3%). So, the strains Y35 and Y100 can be used for further studies to evaluate other criteria for probiotics production as animal feed additives.

Keywords: Yeast, Probiotics, *Saccharomyces cerevisiae*

1. MỞ ĐẦU

Hệ vi sinh vật đường ruột đóng một vai trò quan trọng đối với sức khỏe vật chủ và bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố bao gồm cả thuốc kháng sinh. Kháng sinh làm thay đổi, giảm tính đa dạng, chức năng của hệ vi sinh vật đường ruột đã tác động tiêu cực đến sức khỏe vật chủ (Patangia và cs., 2022). Hơn nữa, kháng sinh đã và đang bị sử dụng quá mức ở nhiều quốc gia. Đây là nguyên nhân làm gia tăng tình trạng kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn và tồn dư trong các sản phẩm có nguồn gốc động vật. Một số chiến lược dựa trên việc bổ sung các sản phẩm “tự nhiên” hơn như các chế phẩm sinh học nhằm thay thế kháng sinh để cải thiện sức khỏe và năng suất cho vật nuôi (Francisco và cs., 2009). Probiotics được định nghĩa là “vi sinh vật sống, khi được sử dụng với số lượng thích hợp, mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ” (FAO/WHO, 2006). Probiotics làm tăng quá trình hấp thu chất dinh dưỡng; ức chế vi sinh vật gây bệnh (Verschuere và cs., 2000); tăng cường hệ thống miễn dịch (Ali, 2000); cân bằng khu hệ vi sinh vật trong đường tiêu hoá; probiotics không mang mầm bệnh và chất độc hại (Fuller, 1992).

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) là một trong những loại nấm men có nhiều protein có giá trị sinh vật học, giàu vitamin nhóm B, nhiều khoáng chất quan trọng, làm tăng khả năng tích lũy photpho (Brake, 1991), giảm các trường hợp nhiễm bệnh (Line và cs., 1997), tăng khả năng sinh trưởng và hiệu quả sử dụng thức ăn (Chen và cs., 2009). *S. cerevisiae* được coi là một trong những vi sinh vật sống mà khi sử dụng qua đường tiêu hóa nó có tác động tích cực đến sức khỏe vật chủ thông qua các hiệu ứng dinh dưỡng trực tiếp của nó (Patterson và cs., 2003). Chủng nấm men *S. cerevisiae* dùng làm probiotics để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi phải chịu được các bất lợi trong đường tiêu hóa như chịu nhiệt, chịu pH thấp, muối mật cao... (Van và cs.,

2005); phát triển và cạnh tranh vị trí bám và chất dinh dưỡng với các vi khuẩn có hại trong đường tiêu hóa (Hatoum và cs., 2012). *S. cerevisiae* là loại nấm men sử dụng trong chăn nuôi rất phổ biến trên thị trường (Didari và cs., 2014). Tuy nhiên, Hume và cs. (2012) cho rằng ảnh hưởng của các chủng nấm men khác nhau đối với động vật là khác nhau đáng kể và chủng nấm men phân lập từ hệ tiêu hóa động vật là thích nghi với môi trường đường tiêu hóa và mang nhiều đặc tính có thể được sử dụng sản xuất probiotics. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là phân lập và định danh một số chủng nấm men *S. cerevisiae* từ chất chứa trong ruột gà và đánh giá sự phù hợp để sản xuất chế phẩm probiotics sử dụng trong chăn nuôi.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Các mẫu chất chứa được lấy từ đường tiêu hóa (ruột) gà trưởng thành khoẻ mạnh không được sử dụng men tiêu hóa từ trại gà tại thành phố Huế.

- Môi trường: yeast peptone dextrose (YPD), Christensen, muối mật và một số hoá chất được mua từ hãng HiMedia (Ấn Độ), chloramphenicol mua từ công ty Nam Khoa (Việt Nam).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập nấm men

Phương pháp phân lập nấm men được thực hiện theo mô tả của Hu và cs. (2018), theo đó: các chất chứa từ đường tiêu hóa (ruột) của gà được cho vào túi đựng mẫu đã tiệt trùng, bảo quản lạnh đưa về phòng thí nghiệm, mẫu được pha loãng 10 lần trong nước muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl) (tỷ lệ 1:9) và để ở nhiệt độ phòng (25°C) khoảng 90 phút. Lấy 1 mL các dung dịch pha loãng cấy trải (làm hai lần) trên môi trường thạch đĩa yeast peptone dextrose (YPD) có bổ sung kháng sinh chloramphenicol (200 mg/L) sau đó ủ ở

30°C. Sau khi ủ 48 giờ chọn các khuẩn lạc riêng lẻ, có màu trắng, rìa tròn đều, trơn nhẵn, dạng mô nổi cây thuần lại trên môi trường thạch đĩa YPD và bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

2.2.2. Phương pháp xác định đặc điểm hình thái, sinh hoá và định danh nấm men

- Các đặc điểm về hình thái và sinh hoá cơ bản của nấm men như hình dạng và kích thước tế bào nấm men, khả năng lên men đường, hoạt tính phân giải urea được thực hiện theo Kurtzman và cs. (2011) và phân loại sơ bộ theo Kurtzman và cs. (1998). Trên môi trường thạch đĩa YPD chọn những khuẩn lạc nấm men có màu trắng, rìa tròn đều, trơn nhẵn, dạng mô nổi làm tiêu bản nhuộm quan sát dưới kính hiển vi (sử dụng vật kính x100) thấy có hình oval, hình cầu, hình elip và nảy chồi; khả năng lên men đường được thử nghiệm trên các loại đường glucose, saccharose, maltose, galactose, lactose (2%) trong ống nghiệm 15 mL có chuông Durham. Sự thay đổi màu của môi trường Christensen khi thử nghiệm nấm men phân lập sau thời gian ủ 7 ngày thể hiện hoạt tính phân giải urea của các chủng nấm men.

- Xác định trình tự gen để định danh nấm men: Các chủng nấm men đã được phân loại sơ bộ ở trên sẽ được tiến hành định danh bằng phương pháp sử dụng cặp môi ITS1 và ITS4 để khuếch đại khu vực ITS trong các mẫu DNA của nấm (Han và cs., 2007), giải trình tự bằng phương pháp Sanger và BLAST đối chiếu trên NCBI do công ty TNHH T&N BIOSOLUTION thực hiện.

2.2.3. Phương pháp đánh giá đặc tính probiotic của các chủng nấm men

Các chủng *S. cerevisiae* được sử dụng để đánh giá đặc tính probiotic ở điều kiện phòng thí nghiệm theo các phương pháp của Hu và cs. (2018) và Hossain và cs. (2020). Dịch nấm men lỏng được chuẩn bị có giá trị OD₆₀₀ là 1,0 tương đương khoảng

10⁷(CFU/mL). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, bao gồm:

- Đánh giá khả năng chịu nhiệt:

Dịch nấm men được cấy trong môi trường YPD lỏng vô trùng với tỷ lệ 1% (v/v) sau đó được ủ ở các mức nhiệt độ khác nhau 30°C, 37°C, 42°C và 50°C. Sau 24 giờ xác định số lượng tế bào sống bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua khuẩn lạc mọc trên thạch đĩa YPD.

- **Đánh giá khả năng sinh trưởng trong môi trường có pH thấp:** 1% dịch nấm men cũng được nuôi ở 30 °C trong môi trường lỏng YPD vô trùng có pH khác nhau (2 ; 3 ; 4 và 5,5) được điều chỉnh bằng acid HCl 1M. Sau 24 giờ xác định số lượng tế bào sống bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua khuẩn lạc mọc trên thạch đĩa YPD.

- **Đánh giá khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ muối mật khác nhau:** 1% dịch nấm men được nuôi ở 30°C trong môi trường YPD lỏng vô trùng có các nồng độ muối mật khác nhau (0,1%, 0,2%, 0,3%). Sau 24 giờ xác định số lượng tế bào sống bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua khuẩn lạc mọc trên thạch đĩa YPD.

2.2.4. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Số liệu thu được được tổng hợp, xử lý và phân tích sơ bộ ban đầu bằng MS. Excel 2018, sau đó được phân tích sâu bằng phần mềm IBM SPSS 20. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp thống kê mô tả thông qua giá trị trung bình. Ngoài ra, nghiên cứu này còn sử dụng kiểm định ANOVA để kiểm định sự khác biệt giá trị trung bình giữa 3 chủng nghiên cứu. Trong đó, các giá trị trung bình trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái của nấm men phân lập

Tổng số 32 chủng nấm men đã được phân lập từ 52 mẫu chất chứa ruột gà. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của 32 chủng nấm men này được mô tả ở Bảng 1, Hình 1 và Hình 2. Nhìn chung, hình dạng khuẩn lạc có các đặc điểm là tròn đều,

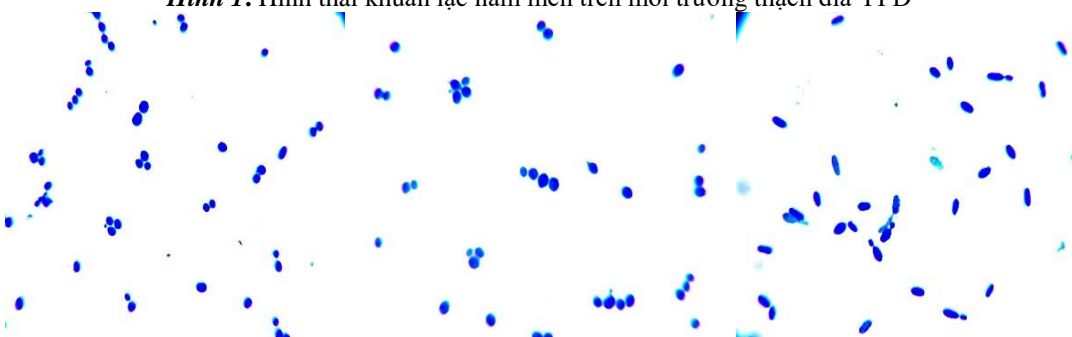
dạng mô nổi, bề mặt khô hoặc ướt, rìa nguyên, màu sắc là trắng ngà, trắng sữa với đường kính khuẩn lạc dao động từ 0,5 mm đến 4 mm. Hình dạng tế bào của các chủng nấm men phân lập bao gồm hình cầu, hình oval, hình elip và đều nảy chồi. Hình dạng các chủng nấm men phân lập được cũng khá đa dạng như trong nghiên cứu phân lập nấm men của Trần Quốc Việt và cs. 2009.

Bảng 1. Hình dạng, kích thước của các chủng nấm men được phân lập từ chất chứa ruột gà

Ký hiệu	Đặc điểm khuẩn lạc	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Hình dạng tế bào
Y5	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng ướt	3 - 3,5	Hình oval, nảy chồi
Y8	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1,5 - 2	Hình oval, nảy chồi
Y9	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình oval, nảy chồi
Y12	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng ướt	3 - 4	Hình oval, nảy chồi
Y13	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng khô, có vòng tròn đồng tâm	2 - 2,5	Hình elip, nảy chồi
Y15	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình oval, nảy chồi
Y17	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1,5 - 2	Hình cầu, nảy chồi
Y16	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng khô, có vòng tròn đồng tâm	2,5 - 3	Hình elip, nảy chồi
Y21	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1,5 - 2	Hình cầu, nảy chồi
Y23	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng ướt	3 - 4	Hình oval, nảy chồi
Y30	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng khô, có vòng tròn đồng tâm	2 - 2,5	Hình elip, nảy chồi
Y35	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình oval, nảy chồi
Y39	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1,5 - 2	Hình oval, nảy chồi
Y42	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình cầu, nảy chồi
Y44	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1,5 - 2	Hình oval, nảy chồi
Y48	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	2 - 2,5	Hình oval, nảy chồi
Y50	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng ướt	2 - 2,5	Hình oval, nảy chồi
Y63	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình cầu, nảy chồi
Y66	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	0,3 - 0,5	Hình oval, nảy chồi
Y68	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng ướt	1 - 1,5	Hình oval, nảy chồi
Y72	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng ướt, có vòng tròn đồng tâm	3,5 - 4	Hình oval, nảy chồi
Y73	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng ướt	1,5 - 2	Hình oval, nảy chồi
Y80	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	0,5 - 1	Hình cầu, nảy chồi
Y90	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng ướt	3 - 4	Hình oval, nảy chồi
Y91	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng khô, có vòng tròn đồng tâm	2 - 2,5	Hình oval, nảy chồi
Y100	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	2 - 2,5	Hình oval, nảy chồi
Y107	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình cầu, nảy chồi
Y108	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng ướt	1,5 - 2	Hình oval, nảy chồi
Y109	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình oval, nảy chồi
Y110	Tròn, mô nổi, màu trắng ngà, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình cầu, nảy chồi
Y112	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1 - 1,5	Hình cầu, nảy chồi
Y113	Tròn, mô nổi, màu trắng sữa, bề mặt láng khô	1,5 - 2	Hình cầu, nảy chồi



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc nấm men trên môi trường thạch đĩa YPD



Hình 2. Hình dạng tế bào nấm men quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính x100

a. Tế bào nấm men hình oval

b. Tế bào nấm men hình cầu

c. Tế bào nấm men hình elip

3.2. Đặc điểm sinh hoá của các chủng nấm men được phân lập từ chất chứa ruột gà

Khả năng lên men các loại đường là một trong những chỉ tiêu quan trọng để phân loại nấm men. Khả năng lên men đường của 32 chủng nấm men phân lập được thử nghiệm trên các loại đường glucose, saccharose, maltose, galactose, lactose được thể hiện ở Bảng 2, Hình 3a và Hình 3b. Trong số 32 chủng nấm men phân lập được thì có 30 chủng lên men đường glucose, chỉ có 2 chủng (Y5, Y12) không lên men bất kỳ loại đường nào đã thử nghiệm, một số chủng lên men đường saccharose (19/32 chủng), maltose (15/32 chủng), galactose (16/32 chủng), ít nhất là lactose (2/32 chủng). Sự thay đổi màu của

môi trường Christensen khi thử nghiệm nấm men phân lập sau thời gian ủ 7 ngày thể hiện hoạt tính phân giải urea của các dòng nấm men được thể hiện qua Hình 3c, Hình 3d. Kết quả có 4 chủng (Y17, Y72, Y90, Y109) có khả năng thủy phân ure làm cho môi trường Christensen chuyển màu đỏ. Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào ở Bảng 1, đặc điểm sinh hoá ở Bảng 2 của 32 chủng nấm men phân lập được và dựa vào khóa phân loại sơ bộ đến giống của Kurtzman và cs. (2011), 3 chủng (Y35, Y63, Y100) có thể được phân loại là chi *Saccharomyces*, 3 chủng này có đặc điểm đều lên men đường (glucose, saccharose, maltose, galactose), không lên men đường lactose và không thủy phân ure.

Bảng 2. Đặc điểm sinh hoá của các chủng nấm men được phân lập từ chất chứa ruột gà

Ký hiệu	Khả năng lên men đường					Phân giải Urea
	Glucose	Saccharose	Maltose	Galactose	Lactose	
Y5	-	-	-	-	-	-
Y8	+	+	-	+	-	-
Y9	+	+	+	-	-	-
Y12	-	-	-	-	-	-
Y13	+	-	-	-	-	-
Y15	+	-	-	-	-	-
Y16	+	-	-	-	-	-
Y17	+	+	+	+	-	+
Y21	+	+	-	+	+	-
Y23	+	-	-	-	-	-
Y30	+	-	-	-	-	-
Y35	+	+	+	+	-	-
Y39	+	+	-	+	-	-
Y42	+	+	+	-	-	-
Y44	+	-	-	-	-	-
Y48	+	+	-	+	-	-
Y50	+	+	-	+	-	-
Y63	+	+	+	+	-	-
Y66	+	+	-	+	-	-
Y68	+	-	-	-	-	-
Y72	+	-	+	-	-	+
Y73	+	-	+	+	-	-
Y80	+	+	-	-	+	-
Y90	+	+	+	+	-	+
Y91	+	-	+	-	-	-
Y100	+	+	+	+	-	-
Y107	+	-	+	-	-	-
Y108	+	-	-	-	-	-
Y109	+	+	+	+	-	+
Y110	+	+	+	-	-	-
Y112	+	-	-	+	-	-
Y113	+	+	-	+	-	-
	31	18	14	16	2	4

(+): Lên men; (-): Không lên men



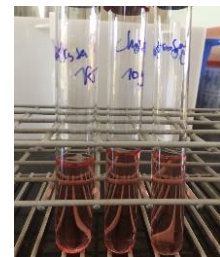
a. Lên men đường âm tính



b. Lên men đường dương tính



c. Phân giải ure âm tính



d. Phân giải ure dương tính

Hình 3. Khả năng lên men đường và hoạt tính phân giải ure

3.3. Định danh nấm men bằng phương pháp giải trình tự gen

Ba chủng nấm men Y35, Y63, Y100 được định danh bằng phương pháp khuếch đại vùng gen ITS, giải trình tự bằng

```
GAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAA
GAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGC
TAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTT
GTTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCT
TTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACAC
AAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGTG
GAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTT
TGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGA
GTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTT
CTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGC
GGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGT
CTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTC
```

Chủng Y63: Trình tự (5'-3')_736bp

```
GGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGA
CAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGC
TTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTAT
AGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCA
ACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACA
ATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGTGAAAT
TTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGC
GTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAAC
TTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGAATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTG
CGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTA
ATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGG
CGAACAATGTTCTTAAAGTTTACCT
```

Chủng Y100: Trình tự (5'-3')_748bp

```
TTTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGG
GCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGT
CTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTG
CTTTTGTTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCA
TATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAA
ACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTA
ACTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCC
TGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTT
GGAGTTAACTTGAAATTGCTGGGCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAG
GTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAA
```

phương pháp Sanger và BLAST đối chiếu trên NCBI. Kết quả của 3 chủng nấm men như sau:

Chủng Y35: Trình tự (5'-3')_741bp

CTGCGGCTAATCTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGA
GCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCA

Trình tự đoạn gen nucleotide được phân tích gồm 741 bp (Y35), 736 bp (Y63), 748 bp (Y100) và các đoạn gen này được so sánh với các gen của nấm men trong ngân hàng gen trên NCBI với phần mềm BLAST. Kết quả nhận được cho thấy đoạn gen ITS của chủng Y35 có độ tương đồng 100% so với trình tự gen của chủng *S.*

cerevisiae MF662357.1 (Hình 4). Y63 có độ tương đồng 99% so với trình tự gen của chủng *S. cerevisiae* MH979683.1 (Hình 5). Y100 có độ tương đồng 99% so với chủng *S. cerevisiae* MN158119.1 (Hình 6). Như vậy kết quả định danh đã khẳng định 3 chủng Y35, Y63, Y100 là loài *S. cerevisiae*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Saccharomyces cerevisiae strain HRUM07121 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribos...	Saccharomyces...	1369	1369	100%	0.0	100.00%	755	MF662357.1
Saccharomyces cerevisiae strain HRUM06870 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribos...	Saccharomyces...	1369	1369	100%	0.0	100.00%	757	MF662354.1
Naganishia randhawaiae strain HRUM06885 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal...	Naganishia ran...	1369	1369	100%	0.0	100.00%	752	MF662353.1
Saccharomyces cerevisiae strain HRUM06887 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribos...	Saccharomyces...	1369	1369	100%	0.0	100.00%	754	MF662352.1
Saccharomyces cerevisiae culture CBS:2888 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Saccharomyces...	1369	1534	100%	0.0	100.00%	1661	KY109257.1

Hình 4. So sánh trình tự gen ITS của Y35 và của chủng *S. cerevisiae* MF662357.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Saccharomyces cerevisiae isolate Ye32 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RN...	Saccharomyces...	1352	1352	100%	0.0	99.86%	757	MH979683.1
Saccharomyces cerevisiae strain YBA 08 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tra...	Saccharomyces...	1352	1352	100%	0.0	99.86%	840	MN158119.1
Saccharomyces cerevisiae isolate QG-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal R...	Saccharomyces...	1352	1352	100%	0.0	99.86%	785	MK788210.1
Saccharomyces cerevisiae strain UCDFST:11-194 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S rib...	Saccharomyces...	1352	1352	100%	0.0	99.86%	841	MH595427.1
Saccharomyces cerevisiae isolate SSFE-2.10.51 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribo...	Saccharomyces...	1352	1352	100%	0.0	99.86%	790	MK123424.1

Hình 5. So sánh trình tự gen ITS của Y63 và của chủng *S. cerevisiae* MH979683.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Saccharomyces cerevisiae strain YBA 08 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tran...	Saccharomyces...	1375	1375	99%	0.0	99.87%
Saccharomyces cerevisiae isolate QG-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RN...	Saccharomyces...	1375	1375	99%	0.0	99.87%
Saccharomyces cerevisiae strain UCDFST:11-194 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribo...	Saccharomyces...	1375	1375	99%	0.0	99.87%
Saccharomyces cerevisiae strain FC3468 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tra...	Saccharomyces...	1375	1375	99%	0.0	99.87%
Saccharomyces cerevisiae JFM 40210 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and...	Saccharomyces...	1375	1375	99%	0.0	99.87%

Hình 6. So sánh trình tự gen ITS của Y100 và của chủng *S. cerevisiae* MN158119.1

3.4. Đặc tính probiotics của các chủng nấm men *S. cerevisiae* phân lập được

3.4.1. Khả năng chịu nhiệt

Khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men được trình bày trong Bảng 3. Kết quả cho thấy các chủng nấm men phát triển tốt ở nhiệt độ 30°C, 37°C, 42°C. Khi nuôi cấy ở nhiệt độ cao hơn thì sinh khối giảm rõ rệt (chủng Y35 sinh khối từ $10,98 \times 10^7$ CFU/mL ở 30°C giảm xuống còn $5,23 \times 10^5$ CFU/mL ở 50°C, chủng Y100 sinh khối từ $8,46 \times 10^7$ CFU/mL ở 30°C giảm xuống còn $2,43 \times 10^5$ CFU/mL ở 50°C, chủng Y63 sinh

khối từ $6,13 \times 10^7$ CFU/mL ở 30°C giảm xuống còn $1,15 \times 10^5$ CFU/mL ở 50°C. Tuy nhiên, giữa 3 chủng nấm men thì chủng Y35 cho sinh khối cao nhất ở các nhiệt độ thử nghiệm so với hai chủng còn lại ($p < 0,05$). Đối với các vi sinh vật là probiotics, khả năng sống trong phạm vi nhiệt độ rộng có ý nghĩa không nhiều khi chúng hiện diện trong đường tiêu hoá vật nuôi, nhưng chúng lại rất quan trọng khi chúng tồn tại trong điều kiện bảo quản và trong trường hợp chế biến thức ăn (Trần Quốc Việt và cs., 2009).

Bảng 3. Số lượng tế bào *S. cerevisiae* được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, 37°C, 42°C, 50°C (CFU/mL)

Chủng	Nhiệt độ			
	30°C	37°C	42°C	50°C
Y35	$10,98^a \times 10^7$	$9,30^a \times 10^7$	$7,10^a \times 10^7$	$5,23^a \times 10^5$
Y63	$6,13^b \times 10^7$	$3,59^b \times 10^7$	$2,76^b \times 10^7$	$1,15^b \times 10^5$
Y100	$8,46^a \times 10^7$	$6,05^c \times 10^7$	$4,38^b \times 10^7$	$2,43^b \times 10^5$
SEM	$0,63 \times 10^7$	$0,33 \times 10^7$	$0,67 \times 10^7$	$0,74 \times 10^5$
p	0,001	0,000	0,002	0,002

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có chữ cái (^{a, b, c}) khác nhau thì có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3.4.2. Khả năng chịu pH thấp

Một trong những đặc tính cần có ở một vi sinh vật probiotics là khả năng chịu được pH thấp trong dạ dày. Để có thể tồn tại và phát triển được trong cơ thể vật chủ thì chủng probiotics phải sống sót được ở môi trường có pH2 (Edwards-Ingram và cs., 2007). Zhou và cs. (2007) cũng 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 probiotics. Kết quả Bảng 4 cho thấy cả 3 chủng Y35, Y63, Y100 đều cho sinh khối cao nhất ở pH5,5 và có khả năng sống sót tốt ở môi trường có pH2 (vẫn duy trì trên 10^6 CFU/mL). Tuy nhiên, chủng Y35, Y100 có khả năng sống cao hơn chủng Y63 ở các mức pH ($p < 0,05$).

Bảng 4. Số lượng tế bào *S. cerevisiae* được nuôi cấy ở pH (2 ; 3 ; 4 ; 5,5) (CFU/mL)

Chủng	pH			
	2	3	4	5,5
Y35	$10,1^a \times 10^6$	$4,7^a \times 10^7$	$7,12^a \times 10^7$	$9,38^a \times 10^7$
Y63	$4,65^b \times 10^6$	$2,14^b \times 10^7$	$2,37^b \times 10^7$	$5,45^b \times 10^7$
Y100	$10,89^a \times 10^6$	$1,41^c \times 10^7$	$5,33^c \times 10^7$	$8,90^a \times 10^7$
SEM	$1,14 \times 10^6$	$0,29 \times 10^7$	$0,67 \times 10^7$	$0,59 \times 10^7$
p	0,003	0,000	0,001	0,001

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có chữ cái (^{a, b, c}) khác nhau thì có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3.4.3. Khả năng chịu muối mật

Sự hiện diện của muối mật trong đường ruột của động vật là một yếu tố quan trọng mà một chủng vi sinh vật được sử dụng làm probiotics phải thích nghi để tồn

tại được trong đường tiêu hoá (Shi và cs., 2020). Nồng độ muối mật trong đường tiêu hóa gà từ 0,008 đến 0,175% (Lin và cs., 2003). Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã thử nghiệm nồng độ muối mật đối với chủng

probiotics tiềm năng phải chống chịu là 0,3% muối mật (Reuben và cs., 2019). Tương tự kết quả chịu pH thấp, cả 3 chủng nấm men trong nghiên cứu này đều có khả năng chịu muối mật (Bảng 5). Ở nồng độ 0,3% muối mật chủng Y63 phát triển thấp nhất. Chủng Y35, Y100 vẫn cho thấy sự phát triển cho sinh khối cao trong môi trường có muối mật so với chủng Y63 ($p < 0,05$). Theo Ortiz và cs. (1997), *S. cerevisiae* có các protein màng liên kết ATP toàn phần, chịu trách nhiệm chuyển vị trí của muối mật và có thể vận chuyển hiệu quả các acid mật. Một cơ chế khác là nấm men

có khả năng chống lại nồng độ muối mật cao là dựa trên sự tích tụ của polyol và glycerol, như cơ chế điều chỉnh áp suất thẩm thấu trong tế bào (Moser và cs., 2001). Như vậy, các loài nấm men dung nạp được muối mật góp phần vào chức năng của vi sinh vật trong đường tiêu hóa (Duncan và cs., 2013). Tương tự kết quả nghiên cứu của chúng tôi, các nghiên cứu của Hu và cs. (2018), Johanna và cs. (2017), 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 5. Số lượng tế bào *S. cerevisiae* được nuôi cấy ở nồng độ muối mật 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3% (CFU/mL)

Chủng	Nồng độ muối mật (%)			
	0,0	0,1	0,2	0,3
Y35	$9,80^a \times 10^7$	$9,32^a \times 10^7$	$8,62^a \times 10^7$	$7,7^a \times 10^7$
Y63	$6,36^b \times 10^7$	$6,10^b \times 10^7$	$5,07^b \times 10^7$	$3,37^b \times 10^7$
Y100	$8,02^c \times 10^7$	$7,67^c \times 10^7$	$6,42^b \times 10^7$	$5,17^c \times 10^7$
SEM	$0,65 \times 10^7$	$0,51 \times 10^7$	$0,68 \times 10^7$	$0,46 \times 10^7$
p	0,006	0,002	0,002	0,000

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có chữ cái (^{a, b, c}) khác nhau thì có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

4. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu này đã phân lập được 32 chủng nấm men từ chất chứa trong ruột gà, trong đó 3 chủng (Y100, Y63, Y35) là loài *S. cerevisiae*. Ba chủng nấm men này đã được sàng lọc về khả năng chịu nhiệt độ cao, pH thấp, muối mật ở điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả thu được cho thấy chủng Y35, Y100 cho sinh khối cao hơn ở các điều kiện thử nghiệm và có thể là probiotics tiềm năng. Vì vậy, có thể sử dụng 2 chủng *S. cerevisiae* Y35, Y100 để đánh giá thêm các tiêu chí khác cho mục đích sản xuất probiotics dùng trong chăn nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được tài trợ bởi quỹ nghiên cứu khoa học hàng năm của Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế cho các đề tài có mã số (DHL2022-CNTY-05, DHL2022-CNTY-

07, DHL2022-CNTY-SV-05) và sự hỗ trợ về kỹ thuật của Công ty Cổ phần Sinh học R.E.P.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu Tiếng Việt

Trần Quốc Việt, Bùi Thị Thu Huyền, Dương Văn Hợp và Vũ Thành Lâm. (2009). Phân lập, tuyển chọn và đánh giá các đặc tính probiotics của một số chủng vi sinh vật hữu ích để sản xuất các chế phẩm probiotics dùng trong chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, 16, 521-537.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Ali, A. (2000). *Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture*. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Umea, Sweden.

Brake, J. (1991). Lack of effect of all live yeast culture on broiler, breeders and progeny performance. *Poultry Science*, 70(4), 1037-1039. DOI:10.3382/ps.0701037.

Chen, K. L., Kho, W.L., You, S., Yeh, R. H., Tang, S.W., & Hsieh, C.W. (2009). Effects of *Bacillus subtilis* var. *natto* and

- Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. *Poultry Science*, 88(2), 309-315. DOI:10.3382/ps.2008-00224.
- Didari, T., Solki, S., Mozaffari, S., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2014). A systematic review of the safety of probiotics. *Drug Safety*, 13(2), 227-239. doi:10.1517/14740338.2014.872627.
- Duncan, S., K. Scott, A. Ramsay, H. Harmsen, W. Gjalte and S. Colin. (2013). Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1136-1142. doi:10.1128/AEM.69.2.1136-1142.2003.
- Edwards-Ingram, J.L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, J.D., Oliver, S. G., & Stateva L. (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotics strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2458-2467. doi:10.1128/AEM.02201-06.
- FAO/WHO. (2006). Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. FAO Food Nutrition Pap. 85. Rome: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Francisco, G., Aamir, G. K., James, G., & Rami, E. (2009). World gastroenterology organisation practice guideline: Probiotics and prebiotics. *Arab Journal of Gastroenterology*, 10(1), 33-42. DOI:10.1016/j.ajg.2009.03.001.
- Fuller, R. (1992). Probiotics: History and Development of Probiotics. Chapman & Hall, New York. doi:10.1007/978-94-011-2364-8-1.
- Garcia-Hernandez, Y., Rodriguez, Z., Brandao, L. R., Rosa, Nicol, C. A., Elias, J. R., Iglesias, A., Perez-Sanchez, T., Salabarría, R. B., & Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research Veterinary Science*, 93(2), 798-802. DOI:10.1016/j.rvsc.2011.09.005.
- Han, J. G., & Shin, H.D. (2007). New Record of *Xylaria persicaria* on Liquidambar Fruits in Korea. *Mycobiology*, 35(4), 171-173. doi:10.4489/MYCO.2007.35.4.171.
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotics properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Front in Microbiology*, 3(421). doi:10.3389/fmicb.2012.00421 .
- Hume, M. E., Hernandez, C. A., Barbosa, N. A., Sakomura, N. K., Dowd, S. E., & Oviedo-Rondon, E. O. (2012). Molecular identification and characterization of Ileal and Cecal fungus communities in broilers given probiotics, specific essential oil blends, and under mixed eimeria infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(9), 853- 860. doi:10.1089/fpd.2011.1093.
- Johanna, M. A., Cecilia, L., Rodrigo, S., Angélica, M. T., & Ana, C. T. (2017). Characterization of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae* for obtaining a biopreparation with probiotics profile. *Bioagro*, 29(3), 197-206.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5th ed., Vol. 1, pp. 87-110). San Diego: Elsevier B.V. DOI:10.1016/b978-0-444-52149-1.00007-0.
- Kurtzman, C. P., & Fell, J.W. (1998). *The Yeast: A Taxonomic study* (4th ed). Elsevier Science, 1076 pages.
- Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O., & Zhang, Q. (2003). Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 71(8), 4250-4259. doi:10.1128/iai.71.8.4250-4259.2003.
- Line, J. E., Bailey, J. S., Cox, N. A., & Stern, N. J. (1997). Yeast treatment to reduce Salmonella and *Campylobacter* population associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poultry Science*, 76(9), 1227-1231. doi:10.1093/ps/76.9.1227.
- Moser, S. A., & Savage, D. C. (2001). Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3476-3480. doi:10.1128/aem.67.8.3476-3480.2001.
- Ortiz, D., Pierre, M. S., Abdulmessih, A., & Arias, I. (1997). A yeast ATP-binding cassette type protein mediating ATP-

- dependent bile acid transport. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15358-15365. DOI:10.1074/jbc.272.24.15358.
- Patangia, D. V., Anthony R. C., Dempsey E., Paul R. R., & Stanton C. (2022). Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen*, 11(1). e1260. DOI: 10.1002/mbo3.1260.
- Patterson, J. A., & Bulkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotic in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631. doi:10.1093/ps/82.4.627.
- Reuben, R.C., Roy, P.C., Sarkar, S.L., Alam, R. U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiology*, 19(1), 253–272. DOI:10.1186/s12866-019-1626-0.
- Shi, Y., Zhai, M., Li, J., & Li, B. (2020). Evaluation of safety and probiotic properties of a strain of *Enterococcus faecium* isolated from chicken bile. *Journal of food science and technology*, 57(2), 578–587. DOI:10.1007/s13197-019-04089-7.
- Van der Aa Kuhle, A., Skovgaard, K., & Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1), 29–39. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039
- Verschuere, L., Rombout, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology*, 64(4), 655–671. DOI:10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000.
- Zhou, X., Pan Y., Wang Y., & Li W. (2007). In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(9), 686-692. DOI: 10.1631/jzus.2007.B0686.