

Khảo sát khả năng ức chế nấm men của acid sorbic và cycloheximide ứng dụng vào quy trình định lượng *Lactobacillus* spp. trong chế phẩm sinh học probiotic

Trương Huỳnh Anh Vũ^{1*}, Nguyễn Hoàng Khuê Tú³, Lương Sơn Tùng¹,
Huỳnh Yên Hà¹, Chu Vân Hải²

¹Phòng Vi sinh, Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh

²Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh

³Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

(Ngày đến tòa soạn: 17/08/2022; Ngày chấp nhận đăng: 09/09/2022)

Tóm tắt

Khả năng ức chế nấm men của acid sorbic và cycloheximide được chúng tôi tiến hành khảo sát trên 09 chủng nấm men “hoang dại” phân lập từ nhiều nguồn khác nhau. Acid sorbic được bổ sung vào môi trường thạch MRS với hai nồng độ 0,01 g/L (TCVN 5522 : 1991) và 1,4 g/L (TCVN 7906 : 2008). Kết quả cho thấy ở cả hai nồng độ khảo sát, hiệu quả ức chế các chủng nấm men của acid sorbic còn rất hạn chế. Ngược lại, kết quả khảo sát của môi trường thạch MRS bổ sung cycloheximide với dãy nồng độ 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 và 0,10 g/L có khả năng ức chế hoàn toàn các chủng nấm men. Hiệu năng của môi trường thạch MRS có bổ sung 0,05 g/L cycloheximide được thử nghiệm với hai thông số độ phát triển ($0,7 \leq P_R \leq 1,4$) và hệ số chọn lọc ($S_F \geq 2$) đạt yêu cầu theo ISO 11133. Kết quả cho thấy khả năng ức chế nấm men của cycloheximide cao hơn so với acid sorbic và đề xuất sử dụng môi trường thạch MRS với hàm lượng 0,05 g/L, pH 6,2 (sau khi hấp khử trùng) để thiết lập quy trình phân tích định lượng *Lactobacillus* spp. bằng kỹ thuật đổ đĩa với nhiệt độ ủ $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 72 ± 3 giờ. Bên cạnh đó, dữ liệu nghiên cứu còn góp phần cải tiến quy trình định lượng *Lactobacillus* spp. nhằm đảm bảo chất lượng kết quả kiểm nghiệm của các trung tâm, đơn vị hoạt động trong lĩnh vực thử nghiệm. Đồng thời nâng cao năng lực, hiệu quả quản lý của cơ quan nhà nước về chất lượng sản phẩm hàng hóa ở Việt Nam nói chung và thành phố Hồ Chí Minh nói riêng.

Từ khóa: Cycloheximide, *Lactobacillus* spp., nấm men, probiotic, *Saccharomyces* spp.

* Điện thoại: 0909182442 Email: yutha@case.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lactobacillus spp. là một trong những vi khuẩn probiotic được sử dụng phổ biến, đem lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người. Sử dụng probiotic *Lactobacillus* làm cân bằng hệ vi sinh vật đường tiêu hóa trong cơ thể vật chủ, điều chỉnh phản ứng miễn dịch và chống lại hoạt động của các vi sinh vật gây bệnh [1]. *Lactobacillus* còn được dùng làm giống khởi động trong công nghiệp để kiểm soát quá trình sản xuất yogurt, rau củ muối, bia, rượu táo, kim chi, kefir và các thực phẩm khác cũng như thức ăn chăn nuôi. Các chủng *Lactobacillus* spp. có khả năng ức chế và tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh do sự cạnh tranh chất dinh dưỡng, khả năng sản sinh acid làm giảm pH môi trường, tạo biofilm và các chất kháng khuẩn trong đó có H₂O₂ [2]. Ngày nay, các sản phẩm probiotic thường được sản xuất dưới dạng hỗn hợp, bao gồm hay phối trộn nhiều chủng vi sinh vật. Trong đó, phần lớn *Lactobacillus* spp. thường được sản xuất kết hợp với các chủng nấm men, đặc biệt là *Saccharomyces* spp. hay *Saccharomyces cerevisiae*. Ngoài ra, vi khuẩn lactic và nấm men có thuộc tính cộng sinh, vi khuẩn lactic tạo môi trường acid thuận lợi cho sự sinh sôi của nấm men, trong khi nấm men cung cấp các vitamin và các yếu tố cần cho sự phát triển của vi khuẩn lactic như là các acid amin [3]. Chính vì việc phối trộn nhiều lợi khuẩn trong cùng một sản phẩm đã gây ra nhiều khó khăn trong việc nhận định khuẩn lạc đặc trưng, dẫn đến quá trình kiểm nghiệm không đảm bảo thu nhận được một kết quả định lượng chính xác, đặc biệt tính chọn lọc của môi trường nuôi cấy sử dụng để phân lập *Lactobacillus* spp. với hiệu quả thấp hoặc không ức chế hoàn toàn các vi sinh vật nền hoặc không phải mục tiêu khác.

Hiện nay, phương pháp định lượng *Lactobacillus* spp. tại các phòng kiểm nghiệm ở Việt Nam phần lớn được thực hiện theo TCVN 5522:1991 [4]. Môi trường phân lập được sử dụng theo tiêu chuẩn này là thạch MRS bổ sung acid sorbic với nồng độ 0,01 g/L. Trong quá trình thực hiện thử nghiệm chỉ tiêu này tại Phòng Vi sinh-Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh, nhóm tác giả thấy rằng môi trường thạch phân lập *Lactobacillus* spp. đang được sử dụng không có khả năng ức chế hoàn toàn nấm men. Chính vì vậy, khi tỷ lệ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. trong mẫu nhỏ hơn so với số lượng nấm men nội sinh thì việc định lượng *Lactobacillus* spp. gặp rất nhiều khó khăn trong việc nhận diện khuẩn lạc điển hình, tốn rất nhiều thời gian, chi phí nguyên vật liệu và công lao động. Việc khảo sát, đánh giá và lựa chọn nồng độ của cycloheximide và acid sorbic để ức chế nấm men giúp tăng cường nhận diện chính xác *Lactobacillus* là yêu cầu cấp thiết đối với các cơ quan quản lý nhà nước, đặc biệt là các trung tâm, đơn vị kiểm nghiệm. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần cung cấp tư liệu cải tiến quy trình định lượng *Lactobacillus* spp. nhằm đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm, làm bằng chứng khoa học cho các quyết định cấp nhà nước về quản lý, kiểm soát chất lượng chế phẩm sinh học probiotic đang được lưu thông bày bán tại thị trường Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

09 chủng nấm men và 13 chủng *Lactobacillus* spp. phân lập từ nhiều nguồn khác nhau.

Chủng vi sinh vật đối chứng: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7963, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus paracasei* ATCC 253, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778. Tất cả các chủng được lưu giữ trong các ống Cryobank ở nhiệt độ -70°C tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP. HCM.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và định danh *Lactobacillus* spp.

Phương pháp phân lập *Lactobacillus* spp. được thực hiện theo TCVN 5522:1991 [4], bao gồm các bước: (i) Chuẩn bị mẫu thử và dịch huyền phù: đồng nhất khoảng 10 g mẫu thử với 90 mL Maximum Recovery Diluent-MRD (Merck/146809); (ii) Phân lập: cấy 01 mL dung dịch huyền phù vào môi trường thạch MRS (Oxoid/CM0361) ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 72 ± 3 giờ; (iii) Nhận diện khuẩn lạc đặc trưng: các khuẩn lạc nghi ngờ *Lactobacillus* spp. thường không màu, đường kính từ 1 đến 3 mm, có hình dạng thấu kính hoặc hình sao, chọn ít nhất 05 khuẩn lạc điển hình để thực hiện các thử nghiệm sinh hóa như nhuộm Gram và phản ứng catalase; (iv) Khẳng định: các khuẩn lạc cho kết quả là trực khuẩn Gram dương, tạo thành chuỗi xích ngắn hoặc dài và phản ứng catalase âm tính được khẳng định là vi khuẩn thuộc nhóm *Lactobacillus* spp.

2.2.2. Phương pháp phân lập và định danh nấm men

Phương pháp phân lập *Saccharomyces* spp. được thực hiện gồm các bước: (i) Chuẩn bị mẫu thử và dịch huyền phù: đồng nhất khoảng 10 g mẫu thử với 90 mL Maximum Recovery Diluent-MRD (Merck/146809); (ii) Phân lập: cấy 01 mL dung dịch huyền phù vào môi trường thạch Yeast extract Glucose Chloramphenicol-YGC (Merck/116000) ủ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 3 - 5 ngày; (iii) Nhận diện khuẩn lạc đặc trưng: chọn các khuẩn lạc nghi ngờ nấm men, cấy vào các ống có chứa môi trường Malt extract (Merck/70146). Ủ ở $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 72 ± 3 giờ; (iv) Khẳng định: *Saccharomyces* spp. không tạo váng sớm trên môi trường Malt extract. Tiếp tục quan sát dưới kính hiển vi *Saccharomyces* spp. sinh sản bằng lối nảy chồi theo nhiều hướng, hình tròn, hình trứng hoặc dạng kéo dài [5].

Saccharomyces cerevisiae được phân lập theo NF EN 15789:2009 [6], bao gồm các bước: (i) Chuẩn bị mẫu thử và dịch huyền phù: đồng nhất khoảng 10 g mẫu thử với 90 mL Maximum Recovery Diluent-MRD (Merck/146809); (ii) Phân lập: cấy 01 mL dung dịch huyền phù vào môi trường thạch Yeast extract Glucose Chloramphenicol-YGC (Merck/116000) ủ ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 2 - 5 ngày; (iii) Nhận diện khuẩn lạc đặc trưng: các khuẩn lạc đặc trưng *Saccharomyces cerevisiae* thường có màu kem, đục, khoảng 1 - 6 mm. (iv) Khẳng định: tiến hành xác nhận sinh hóa các khuẩn lạc điển hình bằng kit API 20 C AUX (Biomerieux/07628).

2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế nấm men của acid sorbic và cycloheximide

Chuẩn bị các đĩa thạch MRS (Oxoid/CM0361) có bổ sung acid sorbic (Sigma-Aldrich/S1626) với nồng độ 0,01 g/L theo TCVN 5522:1991 (MRS-AS01) [4] và 1,4 g/L theo TCVN 7906:2008 (MRS-AS14) [7]. Tương tự, đối với các đĩa thạch MRS có bổ sung cycloheximide (Sigma-Aldrich/C4859) với nồng độ 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 và 0,10 g/L (MRS-CY02-10).

Chuẩn bị các dung dịch chủng nấm men có nồng độ khoảng 10^7 (CFU/mL), pha loãng thập phân thành dãy các nồng độ liên tiếp từ $10^{-1} \div 10^{-5}$. Tiến hành, cấy các nồng độ pha loãng của từng dịch chủng nấm men vào môi trường MRS-AS01; MRS-AS14 và MRS-CY02-10. Đồng thời tiến hành cấy song song với môi trường thạch Yeast extract Glucose Chloramphenicol-YGC (Merck/116000) để kiểm chứng. Ủ các đĩa thạch MRS-AS01; MRS-AS14 và MRS-CY02-10 ở $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 72 ± 3 giờ và các đĩa thạch YGC ở $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 72 ± 3 giờ. Sau thời gian ủ, quan sát và đánh giá khả năng ức chế của acid sorbic và cycloheximide đối với các chủng nấm men phân lập.

2.2.4. Khảo sát hiệu năng môi trường nuôi cấy được đề xuất

Từ kết quả khảo sát khả năng ức chế acid sorbic và cycloheximide đối với các chủng nấm men đã thu thập, nhóm tác giả tiến hành đề xuất môi trường nuôi cấy phù hợp. Sau đó, tiến hành thử nghiệm hiệu năng của môi trường nuôi cấy được đề xuất thông qua hệ số phát triển ($0,7 \leq P_R \leq 1,4$) và độ chọn lọc ($S_F \geq 2$) theo ISO 11133:2014 [8], cụ thể được tiến hành như sau: Chuẩn bị các dung dịch chủng ở khoảng $10^4 \div 10^6$ (CFU/mL). Trãi 0,1 mL dung dịch chủng đã chuẩn bị đồng thời lên môi trường cần kiểm tra là môi trường được đề xuất và môi trường tham chiếu (MRS). Các đĩa này được ủ ở $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 72 ± 3 giờ. Sau khi ủ, đếm tổng số khuẩn lạc *Lactobacillus* spp. mọc trên các đĩa.

Đối với độ phát triển của môi trường đề xuất được tính theo công thức sau:

$$P_R = \frac{N_s}{N_0}$$

Trong đó:

N_s : tổng số khuẩn lạc đếm được trên môi trường đề xuất (MRS-CY05)

N_0 : tổng số khuẩn lạc đếm được trên môi trường tham chiếu (MRS)

Đối với hệ số chọn lọc của môi trường đề xuất được tính theo công thức sau:

$$S_F = D_0 - D_s$$

Trong đó:

D_0 : độ pha loãng cao nhất có vi sinh vật phát triển trên môi trường tham chiếu không chọn lọc

D_s : độ pha loãng cao nhất có vi sinh vật phát triển trên môi trường đề xuất

S_F , D_0 và D_s được biểu thị bằng đơn vị \log_{10}

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các chủng nấm men và *Lactobacillus* spp.

Nhằm mục đích thu nhận các chủng *Lactobacillus* spp. có nguồn gốc đa dạng và các chủng nấm men thường phát triển trên môi trường thạch MRS gây khó khăn cho quá trình định lượng *Lactobacillus* spp., thực hiện theo Mục 2.2.1 và 2.2.2 chúng tôi đã phân lập và định danh được 09 chủng nấm men và 13 chủng *Lactobacillus* spp. Kết quả được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. Chủng *Lactobacillus* spp. và nấm men được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau

STT	Vi sinh vật	Nguồn gốc	Ghi chú
1	<i>Lactobacillus</i> spp. 01	Sữa lên men	
2	<i>Lactobacillus</i> spp. 02	Dưa chua	
3	<i>Lactobacillus</i> spp. 03	Chế phẩm probiotic	
4	<i>Lactobacillus</i> spp. 04	Sữa chua	
5	<i>Lactobacillus</i> spp. 05	Dịch tôm tươi	
6	<i>Lactobacillus</i> spp. 06	Xá xiu	
7	<i>Lactobacillus</i> spp. 07	Nước ép ca cao tươi	
8	<i>Lactobacillus</i> spp. 08	Men tươi	
9	<i>Lactobacillus</i> spp. 09	Men khô	
10	<i>Lactobacillus</i> spp. 10	Men vi sinh thành phẩm	
11	<i>Lactobacillus</i> spp. 11	Chao pha sẵn	
12	<i>Lactobacillus</i> spp. 12	Thức ăn chăn nuôi	
13	<i>Lactobacillus</i> spp. 13	Sữa lên men	
14	Nấm men 01	Thức ăn chăn nuôi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 01
15	Nấm men 02	Chế phẩm probiotic	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 02
16	Nấm men 03	Dịch ép trái cây lên men	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 03
17	Nấm men 04	Men khô	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 04
18	Nấm men 05	Men tươi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 05
19	Nấm men 06	Thức ăn thủy sản bổ sung	<i>Saccharomyces</i> spp. 01
20	Nấm men 07	Phụ gia thực phẩm	<i>Saccharomyces</i> spp. 02
21	Nấm men 08	Men vi sinh thành phẩm	
22	Nấm men 09	Chế phẩm sinh học	

3.2 Kết quả khảo sát khả năng ức chế nấm men của acid sorbic

Acid sorbic là một loại acid hữu cơ thường được sử dụng trong các môi trường nuôi cấy vi sinh nhằm ức chế sự phát triển của các loại nấm men, nấm mốc. Với mục đích đánh giá khả năng ức chế của acid sorbic đối với 13 chủng nấm men thu nhận được từ nhiều nguồn khác nhau, chúng tôi tiến hành khảo sát với môi trường thạch MRS bổ sung acid sorbic với hai nồng độ 0,01 g/L và 1,4 g/L (MRS-AS01; MRS-AS14) với các bước tiến hành như Mục 2.2.3 và ghi nhận kết quả tại Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khả năng ức chế nấm men của acid sorbic

STT	Tên chủng vi sinh vật	Kết quả (CFU/mL)		
		MRS-AS01	MRS-AS14	YGC
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7963	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 01	$1,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 02	$4,8 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 03	$3,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 04	$4,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 05	$5,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$
7	<i>Saccharomyces</i> spp. 01	$4,5 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$
8	<i>Saccharomyces</i> spp. 02	$1,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
9	Nấm men 08	< 01	< 01	$2,8 \times 10^6$
10	Nấm men 09	< 01	< 01	$7,4 \times 10^7$

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, acid sorbic mặc dù có khả năng ức chế một số loại nấm men nhưng không có khả năng ức chế *Saccharomyces* spp. và *Saccharomyces cerevisiae* là các chủng nấm men thường được phối trộn trong chế phẩm sinh học, dược, thủy sản, men vi sinh, thức ăn chăn nuôi bổ sung vi sinh vật có lợi, ... trên thị trường hiện nay. Điều này cũng đã được Thomas và cộng sự thực nghiệm và chứng minh rằng nồng độ acid sorbic 0,1% không có tác dụng ức chế nấm men và nấm mốc khi nuôi cấy bằng môi trường canh thang Basal khi pH môi trường là 7,0 và chỉ có thể ức chế nấm men ở pH dưới 4, 5 [9].

3.3 Kết quả khảo sát khả năng ức chế nấm men của cycloheximide

Cycloheximide là chất thường được sử dụng để ức chế quá trình sinh tổng hợp protein của nấm men và các loài vi khuẩn khác. Nhằm đánh giá khả năng ức chế của cycloheximide đối với các chủng nấm men phân lập được từ nhiều nguồn khác nhau, chúng tôi tiến hành khảo sát với môi trường thạch MRS bổ sung cycloheximide với nồng độ 0,02 g/L (MRS-CY02); 0,04 g/L (MRS-CY04); 0,06 g/L (MRS-CY06); 0,08 g/L (MRS-CY08) và 0,10 g/L (MRS-CY10) đối với các bước thực hiện theo mục 2.2.3 và ghi nhận kết quả ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát nồng độ ức chế nấm men của cycloheximide

STT	Tên chủng vi sinh vật	Kết quả (CFU/mL)					YGC
		MRS-CY02	MRS-CY04	MRS-CY06	MRS-CY08	MRS-CY10	
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7936	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$1,1 \times 10^6$
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 01	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$1,6 \times 10^7$
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 02	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$5,2 \times 10^6$
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 03	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$3,5 \times 10^6$
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 04	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$4,2 \times 10^6$
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 05	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$6,1 \times 10^8$
7	<i>Saccharomyces</i> spp. 01	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$5,9 \times 10^7$
8	<i>Saccharomyces</i> spp. 02	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$1,2 \times 10^7$
9	Nấm men 08	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$2,8 \times 10^8$
10	Nấm men 09	< 01	< 01	< 01	< 01	< 01	$7,4 \times 10^8$

Chú thích: < 01: Không có khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch

Kết quả Bảng 3 cho thấy, tất cả 05 nồng độ của cycloheximide bổ sung vào môi trường thạch MRS đều có khả năng ức chế toàn bộ các chủng nấm men. Như vậy, chứng tỏ cycloheximide có khả năng ức chế nấm men tốt hơn so với acid sorbic và là chất bổ sung tiềm năng vào môi trường thạch MRS nhằm tăng tính chọn lọc trong việc định lượng *Lactobacillus* spp. Cycloheximide được chúng tôi sử dụng để nghiên cứu có nồng độ cao hơn so với một số công trình của các tác giả khác. Lospez và Mayo đã sử dụng cycloheximide với nồng độ 50 µg/mL bổ sung vào môi trường LS từ các mẫu pho mát [10] và Corbo cùng cộng sự cũng đã sử dụng môi trường thạch MRS bổ sung cycloheximide với nồng độ 170 mg/L từ các mẫu pho mát để phân lập *Lactobacillus* spp. [11].

Từ kết quả khảo sát cũng như đánh giá khả năng ức chế của acid sorbic và cycloheximide với các chủng nấm men thường mọc trên môi trường thạch MRS trong quá trình định lượng *Lactobacillus* spp. theo TCVN 5522:1991, nhóm nghiên cứu đề xuất sử dụng môi trường thạch MRS bổ sung cycloheximide với nồng độ 0,05 g/L để thiết lập qui trình định lượng *Lactobacillus* spp. Sở dĩ chúng tôi chọn nồng độ này nhằm đảm bảo khả năng ức chế nấm men, mặt khác vẫn tiết kiệm được chi phí môi trường hóa chất. Thành phần môi trường thạch MRS cải tiến được đề xuất cụ thể như sau: Peptone: 10,0 g; Cao thịt: 8,0 g; Cao men: 4,0 g; Glucoza: 20,0 g; Sorbitan mono-oleate: 1,0 mL; K₂HPO₄: 2,0 g; CH₃COONa.3H₂O: 5,0 g; C₆H₁₇N₃O₇: 2,0 g; MgSO₄.7H₂O: 0,2 g; MnSO₄.4H₂O: 0,05 g; Thạch: 10,0 g; Nước: 1000 mL; Cycloheximide (bổ sung sau khi hấp tiệt trùng): 0,05 g (pH: 6,2 ± 0,2 ở 25°C).

3.4. Kết quả thử nghiệm hiệu năng môi trường thạch MRS được đề xuất

Nhằm mục đích đánh giá hiệu năng của môi trường thạch MRS đề xuất bổ sung 0,05 g/L cycloheximide (MRS-CY05) thì hệ số phát triển (P_R) và độ chọn lọc (S_F) được lựa chọn

để thử nghiệm, chúng tôi tiến hành khảo sát hệ số phát triển của môi trường thạch MRS-CY05 với các chủng *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus paracasei* ATCC 253 và 13 chủng *Lactobacillus* spp. Độ chọn lọc được khảo sát với các chủng *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7936 và 09 chủng nấm men. Các bước thực hiện và tính toán kết quả như Mục 2.2.4. Kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 4 và 5.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm hệ số phát triển (P_R) của môi trường đề xuất (MRS-CY05)

STT	Chủng vi sinh vật	Số khuẩn lạc		Hệ số phát triển (P_R)	Tiêu chí chấp nhận	Đánh giá
		MRS-CY05	MRS			
1	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	126	147	0,86		Đạt
2	<i>L. paracasei</i> ATCC 253	190	194	0,98		Đạt
3	<i>Lactobacillus</i> spp. 01	115	116	0,99		Đạt
4	<i>Lactobacillus</i> spp. 02	92	80	1,15		Đạt
5	<i>Lactobacillus</i> spp. 03	100	95	1,05		Đạt
6	<i>Lactobacillus</i> spp. 04	107	110	0,97		Đạt
7	<i>Lactobacillus</i> spp. 05	80	100	0,80	0,7 ≤ P_R ≤ 1,4	Đạt
8	<i>Lactobacillus</i> spp. 06	78	88	0,89		Đạt
9	<i>Lactobacillus</i> spp. 07	113	102	1,11		Đạt
10	<i>Lactobacillus</i> spp. 08	68	76	0,89		Đạt
11	<i>Lactobacillus</i> spp. 09	136	150	0,91		Đạt
12	<i>Lactobacillus</i> spp. 10	95	89	1,07		Đạt
13	<i>Lactobacillus</i> spp. 11	88	80	1,10		Đạt
14	<i>Lactobacillus</i> spp. 12	125	115	1,09		Đạt
15	<i>Lactobacillus</i> spp. 13	100	120	0,83		Đạt

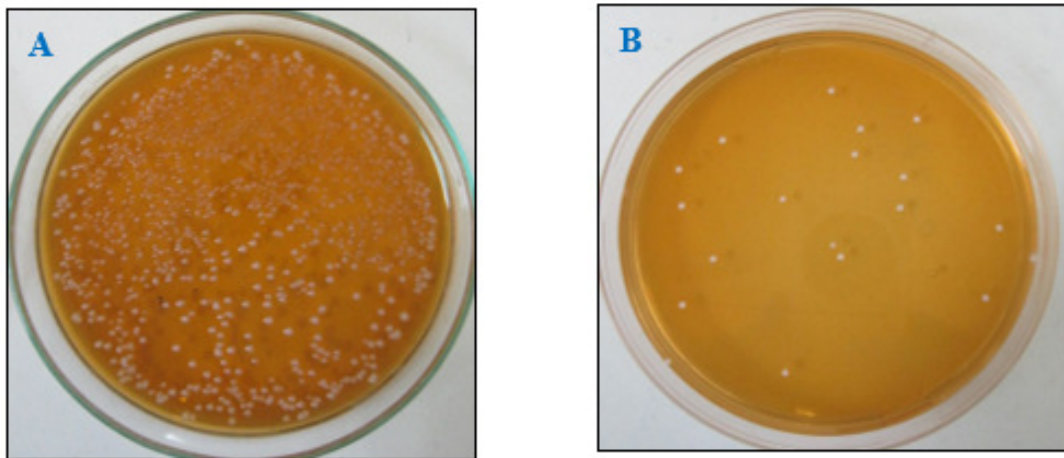
Bảng 5. Kết quả thử nghiệm độ chọn lọc (S_F) của môi trường đề xuất (MRS-CY05)

STT	Chủng vi sinh vật	Số khuẩn lạc phát triển (CFU)	Độ chọn lọc (S_F)	Tiêu chí chấp nhận	Đánh giá
-----	-------------------	-------------------------------	-----------------------	--------------------	----------

		<i>MRS-CY05</i>	<i>MRS</i>		
1	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
2	<i>Bacillus cereus ATCC 11778</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
3	<i>Saccharomyces cerevisiae ATCC 7936</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
4	<i>Saccharomyces cerevisiae 01</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-3} $\log_{10}3,0$	2,0	Đạt
5	<i>Saccharomyces cerevisiae 02</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
6	<i>Saccharomyces cerevisiae 03</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-5} $\log_{10}5,0$	4,0	Đạt
7	<i>Saccharomyces cerevisiae 04</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
8	<i>Saccharomyces cerevisiae 05</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
9	<i>Saccharomyces spp. 01</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
10	<i>Saccharomyces spp. 02</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-5} $\log_{10}5,0$	4,0	Đạt
11	<i>Nấm men 08</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}4,0$	3,0	Đạt
12	<i>Nấm men 09</i>	10^{-1} $\log_{10}1,0$	10^{-4} $\log_{10}1,0$	3,0	Đạt

$S_F \geq 2$

Từ kết quả thu được theo Bảng 4 và 5, cho thấy môi trường thạch MRS-CY05 được đề xuất có hệ số phát triển và độ chọn lọc đạt yêu cầu so với tiêu chí chấp nhận. Điều này chỉ ra rằng ngoài khả năng chọn lọc đối với các chủng nấm men thì hệ số phát triển của môi trường thạch MRS-CY05 vẫn không bị ảnh hưởng, như vậy môi trường thạch MRS-CY05 được đề xuất từ kết quả nghiên cứu đạt chất lượng và đảm bảo hiệu năng để ứng dụng vào quy trình định lượng *Lactobacillus* spp.



Hình 1. Kết quả định lượng *Lactobacillus* spp. với môi trường thạch MRS đề xuất và tham chiếu
Chú thích: A: MRS tham chiếu: nấm men phát triển lan át sự phát triển của *Lactobacillus* spp. B: MRS đề xuất: Cycloheximide đã ức chế sự phát triển của nấm men, tạo điều kiện cho *Lactobacillus* spp. phát triển

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy một số loài nấm men đã đề kháng với acid sorbic, thậm chí với nồng độ rất cao (1,4 g/L) nhưng lại bị ức chế bởi cycloheximide chỉ với nồng độ thấp (0,05 g/L). Môi trường MRS dùng định lượng *Lactobacillus* spp. khi bổ sung cycloheximide thay cho acid sorbic có khả năng ức chế nấm men rất cao mà vẫn đảm bảo cho các loài *Lactobacillus* spp. phát triển tốt. Những kết quả này là cơ sở để kiến nghị thay đổi chất bổ sung là cycloheximide (0,05 g/L) vào môi trường MRS khi định lượng *Lactobacillus* spp. trong những nền mẫu có pha trộn nhiều loài probiotic khác. Kiến nghị đối với các phòng thí nghiệm khi áp dụng môi trường thạch MRS cải tiến, cần xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp đối với từng loại nền mẫu cụ thể trước khi tiến hành phân tích thử nghiệm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ về kinh phí từ nhiệm vụ khoa học công nghệ tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP.HCM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. Markowiak and K. Ślizewska, "Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health," *Nutrients*, vol 9, no. 9, pp. 1021, 2017.
- [2]. M. Bermudez-Brito, J. Plaza-Díaz, S. Muñoz-Quezada, C. Gómez-Llorrente, A. Gil, "Probiotic mechanisms of action," *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol 61, no. 2, pp. 160-174, 2012.
- [3]. C. Muyanja, J. Narvhus, J. Treimo, T. Langsrud, "Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage," *International Journal of Food Microbiology*, vol 80, pp. 201-210, 2003.

- [4]. TCVN 5522:1991, “Lactobacillus Food products – Method for enumeration of Lactobacillus bacteria”.
- [5]. Nguyen Lan Dung et, al., “Some research methods of microbiology”, Hanoi: *Science and Technics Publishing House*, vol. 2, 1976.
- [6]. NF EN 15789:2009, Animal feeding stuffs - Isolation and enumeration of yeast probiotic strains.
- [7]. ISO 15214:1998, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony count technique at 30°C.
- [8]. ISO 11133:2014, Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media
- [9]. A. Bell, L. Etchells, and F. Borg, “Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeasts, and filamentous fungi,” *Journal of Bacteriology*, vol. 77, no. 5, pp. 573-580, 1958.
- [10]. S. López and B. Mayo, “Identification and characterization of homofermentative mesophilic Lactobacillus strains isolated from artisan starter-free cheeses,” *Applied Microbiology*, vol. 25, pp. 233-238, 1997.
- [11]. M. Corbo, M. Albenzio, M. De Angelis, A. Sevi, and M. Gobbetti, “Microbiological and biochemical properties of canestrato pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria,” *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp.551-561, 2001.

Research for the yeast inhibiting ability of sorbic acid and cycloheximide applied to the quantitative analysis of *Lactobacillus* spp.

Truong Huynh Anh Vu¹, Nguyen Hoang Khue Tu³,

Luong Son Tung¹, Huynh Yen Ha¹, Chu Van Hai²

¹Microbiology laboratory, Center of Analytical Services and Experimentation HCMC (CASE), Ho Chi Minh, Vietnam

²Department of Science and Technology HCMC, Ho Chi Minh, Vietnam

³School of Biotechnology, HCMC International University, Vietnam National University, Ho Chi Minh, Vietnam

Abstract

The ability of sorbic acid and cycloheximide to inhibit yeast was investigated on nine yeast strains isolated from different sources. Sorbic acid was added to MRS agar at two concentrations 0.01 g/L (TCVN 5522:1991) and 1.4 g/L (TCVN 7906:2008). The results showed, at both concentrations; the inhibitory effect of sorbic acid on yeast strains was weak. In contrast, the survey results of MRS agar supplemented with cycloheximide with concentration ranges of 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; and 0.10 g/L were inhibited yeast strains. The performance testing of MRS agar supplemented with 0.05 g/L of cycloheximide tested with productivity ratio ($0.7 \leq P_R \leq 1.4$) and selectivity factor ($S_F \geq 2$) according to ISO 11133. Therefore, we determined ability to inhibit yeast from cycloheximide was higher than sorbic acid and suggested using MRS agar-supplemented cycloheximide with 0.05 g/L, pH 6.2 (after autoclaving) to establish the quantitative analysis of *Lactobacillus* spp. by the pouring plate technique, incubated at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 72 ± 3 hours. In addition, the research results contribute to improving the quantitative analysis of *Lactobacillus* spp. in order to ensuring the validity of results and providing scientific evidence for decisions on management of effective probiotic quality in Ho Chi Minh City, Vietnam.

Keywords: Cycloheximide, *Lactobacillus* spp., probiotic, *Saccharomyces* spp., yeast.