

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA NẤM MEN *Saccharomyces boulardii*

Trần Văn Tuấn¹, Vũ Xuân Tạo²

TÓM TẮT

Nấm men *Saccharomyces boulardii* được sử dụng rộng rãi trong sản xuất men tiêu hóa cho người và vật nuôi. *S. boulardii* được chứng minh có tác dụng chống lại các vi sinh vật gây bệnh đường ruột. Ngoài ra, loài nấm này đã bắt đầu được sử dụng làm vật chủ để biểu hiện các gen mã hóa kháng nguyên của vi sinh vật gây bệnh nhằm sản xuất vacxin tái tổ hợp toàn tế bào dùng cho đường uống. Trong nghiên cứu này, ba chủng nấm men *S. boulardii* NM, PE và BIO được đánh giá về một số đặc điểm sinh học và so sánh với chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* BY4743. Ba chủng *S. boulardii* NM, PE và BIO có đặc điểm tương tự với nấm men *S. cerevisiae* BY4743 về hình thái, khả năng chịu cồn và không có khả năng kết lắng, cũng như bám dính. Tuy nhiên, ba chủng nấm men *S. boulardii* có khả năng lên men sinh cồn với nồng độ khá cao, trung bình từ 5 - 8 % (w/v), thậm chí còn cao hơn so với chủng *S. cerevisiae* BY4743. Đặc biệt, khả năng đồng hóa galactose kém và khả năng sống sót tốt ở pH 2 của ba chủng *S. boulardii* là những đặc điểm quan trọng giúp phân biệt *S. boulardii* với *S. cerevisiae*.

Từ khóa: Đặc điểm sinh học, nấm men, probiotic, *Saccharomyces boulardii*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm men *S. cerevisiae* thường được sử dụng trong sản xuất thực phẩm lên men và các đồ uống có cồn (Walker and Stewart, 2016). Một loài nấm men có đặc điểm di truyền gần như giống hệt với *S. cerevisiae* thường được gọi là nấm men *S. boulardii* thì hầu như chưa được nghiên cứu ở nước ta. *S. boulardii* hiện đang được sử dụng rộng rãi trong sản xuất men tiêu hóa để phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh tiêu chảy ở người và vật nuôi.

S. boulardii được phân lập từ vỏ quả vải thiếu vào năm 1923 bởi nhà khoa học người Pháp Henri Boulard, đã được sử dụng như một loại thuốc điều trị bệnh tiêu chảy kể từ năm 1950. Khuẩn lạc nấm *S. boulardii* có hình tròn, có màu trắng đục, bề mặt nhẵn, tế bào có hình trứng hoặc hình ovan. *S. boulardii* phát triển tối ưu ở nhiệt độ 37°C nên đây là một điều kiện thuận lợi cho việc sử dụng loài nấm này làm probiotic (Edwards-Ingram *et al.*, 2007). Một đặc tính rất quan trọng của nấm men *S. boulardii* để ứng dụng cho sản xuất probiotic là loài nấm này có thể kháng được một số vi sinh vật gây bệnh hay xuất hiện ở đường ruột (Czerucka and Rampal, 2002). Cơ chế của hoạt tính probiotic của loại nấm men này là ức chế tác nhân gây bệnh trong ruột, bất hoạt độc tố vi sinh vật (Mansour-Ghanaei *et al.*, 2003), kích thích globulin miễn dịch A (Castagliuolo *et al.*, 1999) và tác dụng đến niêm mạc ruột (Qamar *et al.*, 2001). Việc chủ động tuyển chọn các chủng nấm men *S. boulardii* có các đặc điểm vượt trội sẽ phục vụ đắc lực cho các nghiên cứu ứng dụng probiotic. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên

cứu xác định một số đặc điểm sinh học của ba chủng nấm men *S. boulardii* NM, PE và BIO nhằm định hướng ứng dụng các chủng nấm này trong sản xuất chế phẩm probiotic.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Ba chủng nấm men *S. boulardii* NM, PE và BIO dùng trong nghiên cứu được phân lập tại Việt Nam và được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (ĐHQGHN).

Các chủng nấm men *S. cerevisiae* dùng làm đối chứng so sánh gồm: BY4743 được mua từ EUROSCARF (www.euroscarf.de) và BY4741, BY4741[FLO8] do Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN cung cấp. Chủng BY4741 không có khả năng kết lắng cũng như bám dính. Chủng BY4741[FLO8] là chủng được chuyển gen *FLO8* để kích hoạt khả năng kết lắng và bám dính.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định đặc điểm hình thái

Các chủng nấm men được cấy ria trên môi trường YPD (1% cao nấm men, 1% pepton, 2% dextrose, 2% agar, pH 6,5), sau đó được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ để quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc. Hình dạng tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

¹ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

2.2.2. Đánh giá khả năng sử dụng đường galactose và glucose

Mỗi chủng nấm men được cấy vào 1 ml dịch môi trường YPD, trộn đều bằng máy vortex và cấy trái 50 µl dịch trên đĩa môi trường thạch SC với nguồn cacbon duy nhất là galactose hoặc glucose. Đĩa môi trường đã cấy trái các chủng nấm men được ủ ở 30°C trong 48 giờ (Tran, 2011).

2.2.3. Đánh giá khả năng bám dính

Chủng nấm men NM, PE, BIO, BY4743 và 2 chủng đối chứng BY4741 và BY4741[FLO8] được cấy vạch trên đĩa môi trường YPD. Sau 24 giờ nuôi ở 30°C, tiến hành bổ sung 5 - 7 ml nước cất lên bề mặt đĩa và lắc nhẹ cho đến khi khuẩn lạc nấm ở chủng đối chứng âm BY4741 trôi hết thì đổ bỏ phần dịch lỏng. Khả năng bám dính bề mặt của các chủng nghiên cứu được so sánh với đối chứng dương là BY4741[FLO8] và đối chứng âm BY4741 (Tran, 2011).

2.2.4. Đánh giá khả năng kết lắng

Mỗi chủng nấm men được cấy vào ống fancel 10 ml có chứa 3 ml môi trường YPD dạng dịch. Các ống này được nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút, ở 30°C. Hai chủng BY4741[FLO8] và BY4741 được sử dụng làm đối chứng. Sau 18-20 giờ, các ống dịch nuôi sẽ được dựng đứng trong 1 - 2 phút. Các chủng có khả năng kết lắng sẽ nhanh chóng tạo lớp sinh khối lắng dưới đáy ống fancel (Tran, 2011).

2.2.5. Đánh giá khả năng chịu pH thấp

Cấy 2 khuẩn lạc mỗi chủng nấm men vào ống chứa 500 µl môi trường YPD lỏng pH 2. Các ống này được nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C, sau 2 giờ tiến hành cấy trái lên đĩa petri chứa môi trường YPD. Sau 2 ngày ủ ở 30°C, số khuẩn lạc xuất

hiện trên đĩa môi trường được thống kê. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập (Tran, 2011).

2.2.6. Đánh giá khả năng lên men và chịu cồn

Khả năng lên men của các chủng nấm men được xác định thông qua nồng độ cồn trong dịch nuôi cấy. Chủng nấm men NM, PE, BIO và BY4743 được nuôi trong bình tam giác chứa và 100 ml dịch môi trường Hansen (5% glucose; 1% pepton; 0,3% KH₂PO₄; 0,2% MgSO₄.7H₂O; 1,5% agar; pH 6). Các bình nuôi được bọc kín và nuôi ở 30°C trong 48 giờ. Các mẫu được xác định nồng độ cồn bằng cồn kế. Khả năng chịu cồn được xác định bằng cách nhỏ 10 µl dịch tế bào các chủng nấm men lên bề mặt môi trường YPD đã bổ sung cồn với các nồng độ khác nhau (5, 7, 10 và 12%). Các đĩa được ủ trong tủ ổn nhiệt 30°C trong 24 giờ để nấm men phát triển (Tran, 2011).

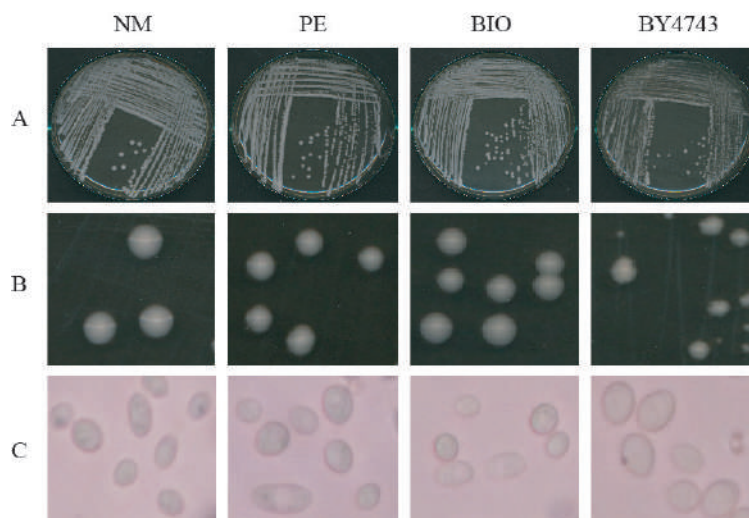
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6 năm 2019 đến tháng 3 năm 2020 tại Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái của các chủng nấm men *S. boulardii*

Các chủng nấm men được nuôi cấy trên môi trường YPD. Sau 3 ngày nuôi cấy, các chủng *S. boulardii* có các đặc điểm điển hình của khuẩn lạc nấm men như có màu trắng đục, nhẵn bóng, đường kính khoảng 2 - 3 mm, bề mặt hơi lồi, rìa tròn. Khi quan sát dưới kính hiển, các tế bào có dạng hình trứng hoặc hình bầu dục (Hình 1). Nếu chỉ dựa vào hình thái khuẩn lạc hoặc hình dạng tế bào thì khó có thể phân biệt được *S. boulardii* với *S. cerevisiae*.



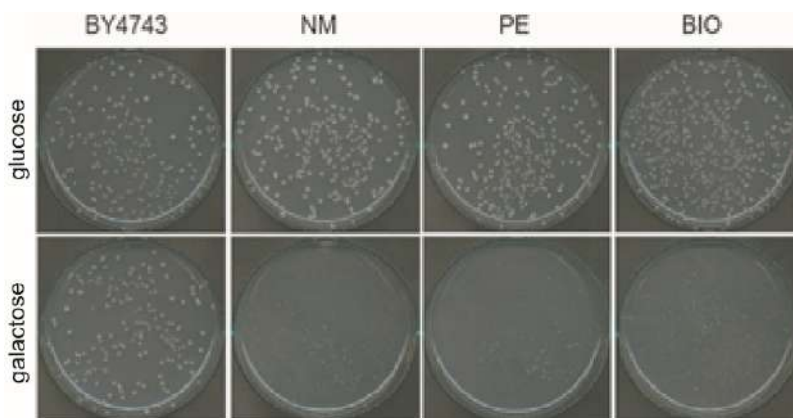
Hình 1. Hình thái các chủng nấm men

Ghi chú: (A, B) Hình thái khuẩn lạc trên đĩa thạch; (C) Hình dạng tế bào dưới kính hiển vi.

3.2. Khả năng sử dụng đường galactose và glucose của các chủng *S. boulardii*

Các chủng nấm men được cấy trải lên môi trường thạch SC (synthetic complete medium) với nguồn cacbon duy nhất là galactose hoặc glucose để đánh giá khả năng sử dụng hai nguồn cacbon này. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 3 chủng *S. boulardii* NM, PE, BIO sử dụng tốt glucose nhưng lại sử dụng rất kém đường galactose, ngược lại *S. cerevisiae* BY4743 có

khả năng sử dụng tốt cả 2 nguồn cacbon này (Hình 2). Do thông tin về di truyền của *S. boulardii* và *S. cerevisiae* gần như giống hệt nhau, nên việc giải trình tự gen để phân biệt giữa 2 loài này là không khả thi. Do đó, tìm kiếm các đặc điểm khác nhau giữa *S. boulardii* và *S. cerevisiae* luôn được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm (McFarland, 1996). Như vậy, đây có thể coi là một trong những đặc điểm quan trọng để phân biệt *S. boulardii* với *S. cerevisiae*.

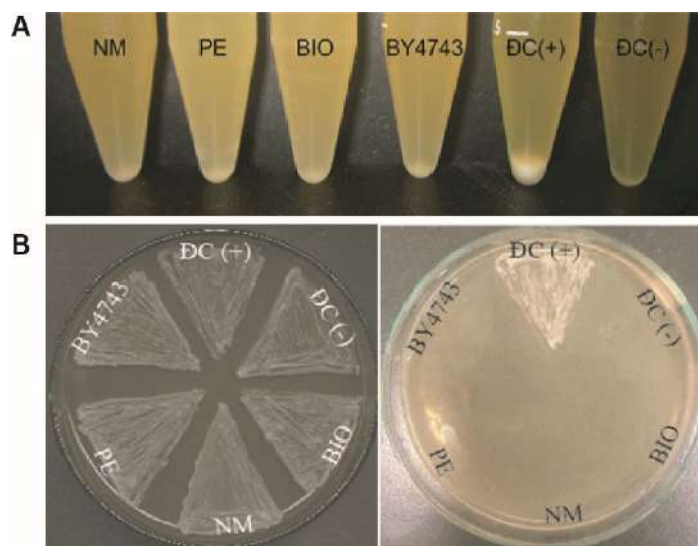


Hình 2. Khả năng sử dụng glucose và galactose của các chủng nấm men

3.3. Khả năng kết lắng và bám dính của các chủng *S. boulardii*

Khả năng bám dính là một trong những đặc tính quan trọng giúp vi sinh vật tương tác với bề mặt tế bào chủ (Brückner and Mösch, 2011). Kết quả nghiên cứu cho thấy cả 3 chủng *S. boulardii* NM, PE, BIO đều giống với chủng *S. cerevisiae* BY4743 là không có khả năng kết lắng và bám dính. Ở *S. cerevisiae*, khả năng bám dính và kết lắng được

quyết định bởi một nhóm gen thuộc họ *FLO* mã hóa các protein Flo. Sự biểu hiện của các protein Flo được kiểm soát bởi protein điều hòa Flo8 mã hóa bởi gen *FLO8*. Tuy nhiên, trên thực tế phần lớn các chủng *S. cerevisiae* không có khả năng bám dính và kết lắng do gen *FLO8* chịu trách nhiệm kiểm soát những đặc tính này bị đột biến dẫn đến bất hoạt (Fichtner *et al.*, 2007).



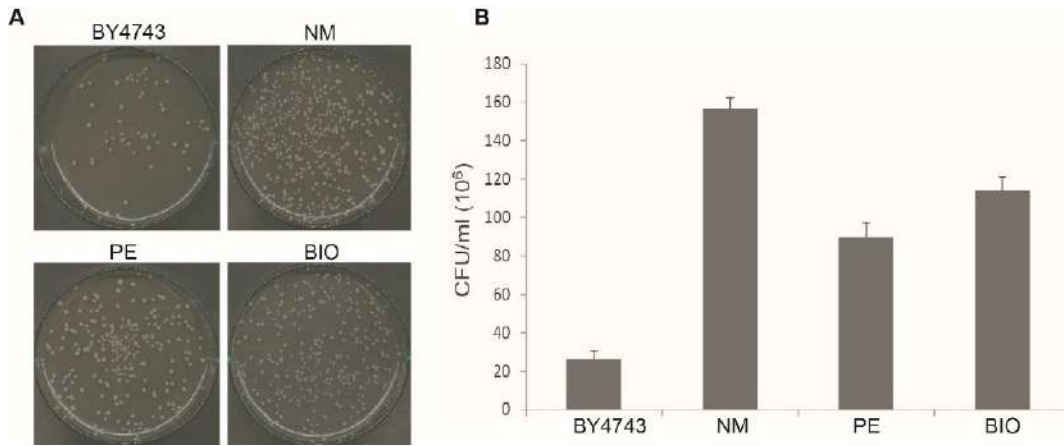
Hình 3. Khả năng kết lắng và bám dính của các chủng nấm men

Ghi chú: (A) Khả năng kết lắng; (B) Khả năng bám dính; BY4741[FLO8] là DC (+), BY4741 là DC (-).

3.4. Khả năng chịu pH thấp của các chủng *S. boulardii*

Một trong những đặc tính cần có ở một vi sinh vật probiotic 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 probiotic phải sống sót được ở môi trường có pH 2 (Edwards-Ingram *et al.*, 2007).

Cả ba chủng *S. boulardii* NM, PE, BIO đều có khả năng sống sót rất tốt ở điều kiện môi trường có pH 2, trong khi chủng *S. cerevisiae* BY4743 khả năng sống sót kém hơn nhiều (Hình 4). Đặc điểm này có thể giúp phân biệt giữa *S. boulardii* và *S. cerevisiae*.



Hình 4. Khả năng sống sót ở pH 2 của các chủng nấm men

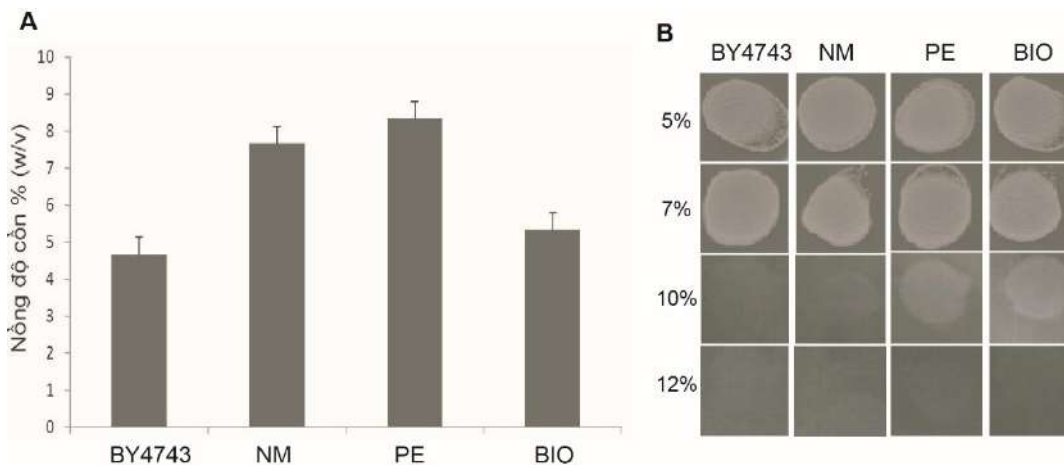
Ghi chú: (A) Khuẩn lạc của các chủng nấm men trên môi trường thạch YPD sau khi nuôi lắc trong YPD dịch thể (pH 2) trong 2 giờ; (B) Biểu đồ thống kê số lượng khuẩn lạc.

3.5. Khả năng lên men và chịu cồn của các chủng nấm men *S. boulardii*

Nhờ có khả năng lên men sinh cồn mà nhiều chủng nấm men được sử dụng trong sản xuất rượu, bia và các sản phẩm lên men khác (Legras *et al.*, 2007). Kết quả trong nghiên cứu này chỉ ra rằng các chủng nấm men *S. boulardii* có khả năng lên men sinh cồn từ 5 - 8 % (w/v), cao nhất là chủng PE cho nồng độ cồn khoảng 8,33 % (w/v). Như vậy, các chủng *S. boulardii* đều có khả năng lên men cao và nồng độ cồn sinh ra thậm chí còn cao hơn so với

chủng nấm men *S. cerevisiae* BY4743 (Hình 5A).

Mặc dù cồn là sản phẩm chính của quá trình lên men nhưng ở một nồng độ nhất định nó sẽ quay lại ức chế sự phát triển và khả năng lên men của nấm men. Vì vậy, việc xác định được khả năng chịu cồn của các chủng nấm men tuyển chọn là cần thiết. Trong nghiên cứu này, tất cả các chủng nấm men được kiểm tra đều có khả năng chịu được nồng độ cồn từ khoảng 5 - 7 % (w/v). Trong đó, chủng PE và BIO có khả năng chịu được nồng độ cồn lên đến 10 % (w/v) (Hình 5B).



Hình 5. Khả năng lên men và chịu cồn của các chủng nấm men

Ghi chú: (A) Khả năng lên men sinh cồn; (B) Khả năng chịu cồn.

IV. KẾT LUẬN

Ba chủng nấm men *S. boulardii* NM, PE và BIO có đặc điểm tương tự với nấm men *S. cerevisiae* BY4743 về hình thái, khả năng chịu cồn và không có khả năng kết lắng và bám dính. Tuy nhiên, ba chủng nấm *S. boulardii* có khả năng sinh lên men cồn với nồng độ khá cao, trung bình từ 5 - 8 % (w/v), thậm chí còn cao hơn so với *S. cerevisiae* BY4743. Đặc biệt, khả năng đồng hóa kém nguồn cacbon galactose và khả năng sống sót cao ở pH 2 của *S. boulardii* là những đặc điểm quan trọng giúp phân biệt *S. boulardii* với *S. cerevisiae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brückner S. and Mösch H. U.**, 2011. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (1): 25-58.
- Castagliuolo I., Riegler M. F., Valenick L., LaMont J. T. and Pothoulakis C.**, 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity*, 67 (1): 302-307.
- Czerucka D. and Rampal P.**, 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*, 4 (7): 733-739.
- Edwards-Ingram L., Gitsham P., Burton N., Warhurst G., Clarke I., Hoyle D., Oliver S. G. and Stateva L.**, 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiolog*, 73 (8): 2458-2467.
- Fichtner L., Schulze F. and Braus G.H.**, 2007. Differential Flo8p-dependent regulation of FLO1 and FLO11 for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. *Molecular Microbiology*, 66(5): 1276-1289.
- Legras J. L., Merdinoglu D., Cornuet J. M. and Karst F.**, 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16 (10): 2091-2102.
- Mansour-Ghanaei F., Dehbashi N., Yazdanparast K. and Shafaghi A.**, 2003. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. *World Journal of Gastroenterology*, 9 (8): 1832-1833.
- McFarland L. V.**, 1996. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clinical Infectious Diseases*, 22 (1): 200-201.
- Qamar A., Aboudola S., Warny M., Michetti P., Pothoulakis C., LaMont J. T. and Kelly C. P.**, 2001. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infection and Immunity*, 69 (4): 2762-2765.
- Tran V. T.**, 2011. *Adhesion of the rapeseed pathogen Verticillium longisporum to its host Brassica napus: Uncovering adhesion genes and the evolutionary origin of the fungus*. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Walker G. M. and Stewart G. G.**, 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2 (4): 30-41.

Determination of biological characteristics of the yeast *Saccharomyces boulardii*

Tran Van Tuan, Vu Xuan Tao

Abstract

The yeast *Saccharomyces boulardii* is widely used in the production of active probiotic products for humans and animals. *S. boulardii* has been shown to be able to suppress harmful intestinal microorganisms. Additionally, this edible yeast also has been employed as a host for heterologous expression of antigen-coding genes for pathogenic microorganisms to produce oral whole-cell recombinant vaccines. In this study, three strains of *S. boulardii* including NM, PE and BIO were evaluated for some biological characteristics in comparison to the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4743. All three *S. boulardii* strains have similar characteristics with *S. cerevisiae* BY4743 based on morphology and alcohol tolerance. Like *S. cerevisiae* BY4743, they have no flocculation and no adhesion. However, these three strains of *S. boulardii* have the good ability for fermentation with the alcohol concentrations of average ranging from 5 - 8% (w/v), and even higher than that of *S. cerevisiae* BY4743. Especially, the weak assimilation of galactose and the good survival at pH 2 are the key features for discrimination of the three *S. boulardii* strains from *S. cerevisiae*.

Keywords: Biological characteristics, yeast, probiotic, *Saccharomyces boulardii*

Ngày nhận bài: 13/3/2020

Ngày phản biện: 19/3/2020

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Giang

Ngày duyệt đăng: 23/3/2020