

NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI TRÊN GEL GRADIENT BIẾN TÍNH ĐỂ KIỂM ĐỊNH THÀNH PHẦN VI KHUẨN NHẪM PHÁT TRIỂN QUY TRÌNH MỚI TRONG ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CHẾ PHẨM MEN VI SINH

Trần Mỹ Hạnh, Cao Thị Dung, Trần Thị Thanh Huyền, Phạm Thế Hải[✉]

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

[✉]Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: phamthehai@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 19.12.2018

Ngày nhận đăng: 25.7.2019

TÓM TẮT

Chất lượng của men vi sinh được quyết định bởi thành phần vi sinh vật có mặt trong sản phẩm đó, vì vậy có thể được kiểm định thông qua phân tích đặc điểm này. Việc sử dụng kỹ thuật điện di trên gel gradient biến tính (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE) cho phép phát hiện mỗi vi sinh vật thông qua băng đặc trưng tương ứng trên bản điện di, có thể được coi là "mã vạch" của vi sinh vật đó. Nguyên tắc "mã vạch" như vậy cho thấy tiềm năng ứng dụng kỹ thuật DGGE để kiểm tra các chế phẩm men vi sinh có hay không có loại vi sinh vật như công bố, từ đó đánh giá chế phẩm có đạt tiêu chuẩn hay không. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm việc áp dụng kỹ thuật DGGE để kiểm tra chất lượng 10 chế phẩm men vi sinh phổ biến trên thị trường. Chúng tôi tập trung vào các chế phẩm chỉ chứa vi khuẩn, vốn chiếm đa số trên thị trường. Trước hết, DNA tổng số của vi khuẩn trong các chế phẩm được tách chiết để nhân gen đoạn 550 bp nằm trong trình tự 16S rDNA. Sau đó, các sản phẩm nhân gen được phân tích bằng DGGE với gradient biến tính từ 30% đến 60%. Kết quả cho thấy thành phần vi sinh vật của 7/10 sản phẩm giống với công bố trên nhãn cũng như giống với kết quả phân lập bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống. Như vậy, nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng của kỹ thuật DGGE trong đánh giá chất lượng men vi sinh.

Từ khóa: 16S rDNA, điện di trên gel gradient biến tính (DGGE), men vi sinh (probiotic), phân lập vi sinh vật, tách chiết DNA.

GIỚI THIỆU

Các chế phẩm vi sinh ngày càng được sử dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống, góp phần cải thiện chất lượng sống của con người (Levin *et al.*, 2011; Ravi *et al.*, 2014). Nếu như cách đây hơn 10 năm, ở Việt Nam mới chỉ xuất hiện chế phẩm vi sinh EM xuất xứ từ Nhật Bản thì hiện nay trên thị trường trong nước đã xuất hiện vô số các sản phẩm vi sinh khác nhau do các nhà khoa học và các cơ sở trong nước nghiên cứu, sản xuất. Trong số các chế phẩm vi sinh phổ biến, men vi sinh là sản phẩm được tiêu thụ rộng rãi nhất và cũng đa dạng nhất về mặt chủng loại (Ravi *et al.*, 2014). Nhiều nhà sản xuất đang chạy đua để tạo ra các sản phẩm men vi sinh dưới các dạng khác nhau, gồm dạng viên, dạng lỏng hay dạng bột bởi các loại men vi sinh dễ sản xuất và không phải tuân theo các quy chuẩn chất lượng quá nghiêm ngặt. Các sản phẩm này được cấp phép bởi Bộ Y tế như các sản phẩm hỗ trợ điều trị với công dụng công bố từ việc ngăn ngừa tiêu chảy,

ngộ độc thực phẩm cho tới kích thích hệ miễn dịch. Một số thông tin về sản phẩm men vi sinh bắt buộc phải công bố trên nhãn chỉ bao gồm tên loài của chủng men vi sinh và số lượng tế bào sống (CFU) trong một gram chế phẩm mà không cần tên chủng chính xác cũng như các đặc tính probiotics (Thông tư 43/2014/TT-BYT). Hơn nữa, trong năm 2011, trên các phương tiện thông tin đại chúng đã thông báo khoảng 50% sản phẩm men vi sinh trên thị trường Việt Nam không đủ về số lượng vi sinh vật còn sống, thậm chí không có vi sinh vật sống (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2014). Vì vậy, để giúp người tiêu dùng có thể chọn lựa được đúng những chế phẩm men vi sinh có chất lượng đảm bảo trên thị trường, việc xây dựng một quy trình đánh giá hiệu quả và chính xác thành phần vi sinh vật trong các chế phẩm là rất cần thiết.

Cho đến nay, việc xác định sự tồn tại của một loại vi sinh vật nào đó thường dựa vào phương pháp nuôi cấy truyền thống trên môi trường đặc trưng của loài

muốn xác định, sau đó dùng các phương pháp thích hợp để định danh như soi kính hiển vi, các test sinh hóa (API kit) hoặc phân tích trình tự 16S rDNA (Hanna *et al.*, 2004). Trong nhiều trường hợp việc xác nhận các vi sinh vật có tên trên nhãn sản phẩm bằng phương pháp nuôi cấy rất phức tạp, đặc biệt là với một số vi khuẩn như *Bifidobacterium* (Yaeshima *et al.*, 1996). Hơn nữa, việc định dạng vi sinh vật được chính xác chỉ dựa trên quan sát hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc, kiểu bắt màu thuốc nhuộm, các đặc tính sinh lý sinh hóa... sẽ tốn rất nhiều thời gian và không thuận tiện. Một kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại phổ biến để đánh giá thành phần của một tập hợp vi sinh vật hoặc một quần xã không qua nuôi cấy hiện nay là kỹ thuật PCR-DGGE (Muyzer *et al.*, 1999). Đối tượng phân tích của kỹ thuật này là DNA ribosome của vi sinh vật, dựa trên việc di chuyển của các phân đoạn 16S rDNA đã được khuếch đại trên gel polyacrylamide có chứa chất biến tính với nồng độ thay đổi theo một gradient (Valaskova *et al.*, 2009 and Bo Deng *et al.*, 2012). Trong DGGE, các phân đoạn DNA giống nhau về chiều dài nhưng khác nhau về trình tự các cặp base có thể được phân tách; phân đoạn DNA nào với trình tự nhiều GC hơn sẽ bị biến tính muộn hơn trên gel gradient chất biến tính và sẽ di chuyển được xa hơn trên gel điện di (Muyzer *et al.*, 1993). Vì vậy, về nguyên tắc, rDNA của mỗi loài vi sinh vật với trình tự đặc trưng sẽ có một vị trí băng đặc trưng trên gel DGGE. Kỹ thuật này cho phép xác định cả những vi sinh vật không thể phân lập và nuôi cấy được. Như vậy, việc áp dụng DGGE trong việc đánh giá thành phần của các chế phẩm men vi sinh sẽ cho ra những kết quả chính xác trong thời gian hợp lý, và vì vậy sẽ hứa hẹn hiệu quả cao hơn việc sử dụng các phương pháp truyền thống.

Chính từ nhu cầu thực tiễn về việc kiểm soát chất lượng các chế phẩm men vi sinh và tính hiệu quả của phương pháp điện di trên gel gradient biến tính, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích tìm hiểu khả năng ứng dụng phương pháp DGGE trong việc đánh giá các chế phẩm vi sinh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu men vi sinh (chứa vi khuẩn, 15 mẫu) được mua một cách ngẫu nhiên tại các hiệu thuốc và được kí hiệu trong quá trình thực hiện nghiên cứu. Các chủng chuẩn: *Bacillus clausii* B.cl (BC); *Bacillus subtilis* VTCC-A-275 (BS); *Bifidobacterium lactis* Bf (Bi); *Lactobacillus acidophilus* VTCC-A-871(LA);

Lactobacillus plantarum VTCC-A-1995(LP); *Streptococcus faecalis* T13.3 (ST) được mua tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (VTCC) để làm đầu chuẩn xác định thành phần loài trong DGGE.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu men vi sinh

DNA tổng số được chiết xuất trực tiếp từ các sản phẩm men vi sinh, sử dụng ANAPURE DNA MINI KIT của hãng ANABIO - Việt Nam theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm tách chiết DNA được kiểm tra trên máy điện di BioRad (Mỹ) với nồng độ gel agarose 0,7% trong dung dịch TAE 1x với hiệu điện thế 90V, thời gian 25 phút. Sau khi điện di, gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide (5 mg/ml) trong 20 phút, sau đó rửa nước và chụp ảnh dưới tia UV trên máy GelDoc (BioRad, Mỹ).

Khuếch đại phân đoạn 16S rDNA bằng phản ứng PCR

DNA thu được từ các mẫu men vi sinh sẽ được đưa vào chạy PCR trên máy PCR 9700 (Applied Biosystems, Mỹ) với mục đích khuếch đại 16S rDNA (1500 bp) bằng cặp mồi sau (Muyzer 1999):

fD1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3', mồi xuôi) và

rP1 (5'ACGGTTACCTTGTTACGACTT3', mồi ngược)

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên máy điện di BioRad (Mỹ) với nồng độ gel agarose 0,7% trong dung dịch TAE 1x với hiệu điện thế 90V thời gian 25 phút, sau đó nhuộm với dung dịch ethidium bromide trong 20 phút và được quan sát trên máy soi gel GelDoc (BioRad, Mỹ).

Sau khi nhân đoạn 16S rDNA của mẫu thành công, 16S rDNA tiếp tục được sử dụng làm khuôn nhằm khuếch đại vùng V3-V5 (550 bp) bằng cặp mồi pGM5F^{GC} (với một kẹp GC được thêm vào) (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3', mồi xuôi) và p907R (5' CCGTCAATTCCTTTRAGTTT 3', mồi ngược) (Lopez *et al.*, 2003) để phục vụ cho quá trình phân tích trên gel DGGE. Kẹp GC (CGC CCG CCG CGC GCG GGG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) được gắn vào đầu 5' của đoạn mồi GM5F^{GC} để tạo tính ổn định việc phân tách của các sản phẩm PCR trên gel điện di biến tính. Sản phẩm PCR sau đó được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,7% trong đệm TAE 1x ở 80V, 30 phút.

Điện di trên gel gradient biến tính DGGE

Sản phẩm 16S rDNA (550 bp), sau đó được phân tích bằng phương pháp điện di DGGE. Quá trình điện di được tiến hành trên gel polyacrylamide 40% với gradient biến tính urea/formamide từ 30% đến 60%. Quá trình điện di được thực hiện bằng bộ điện di DGGEK – 2401 (C.B.S Scientific - Mỹ), trong đệm TAE 1x, ở nhiệt độ 60°C, hiệu điện thế 100V, thời gian 16 giờ (Jun Wang et al., 2008). Sau khi điện di, bản gel được nhuộm trong dung dịch HydraGreen Safe DNA Stain 1x trong 30 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất trong 10 phút và quan sát bằng máy soi gel LMW-20 UVP (UK). Để có được các “mã vạch” đối chứng cho từng loại vi khuẩn trên gel DGGE, chúng tôi sử dụng 6 chủng chuẩn mua tại Viện bảo tàng vi sinh vật giống chuẩn Việt Nam. Sản phẩm 16S rDNA của các đơn chủng này được trộn lại cùng nhau với lượng tương đương để sử dụng như một dấu chuẩn trên gel điện di.

Phân lập và nuôi cấy vi khuẩn

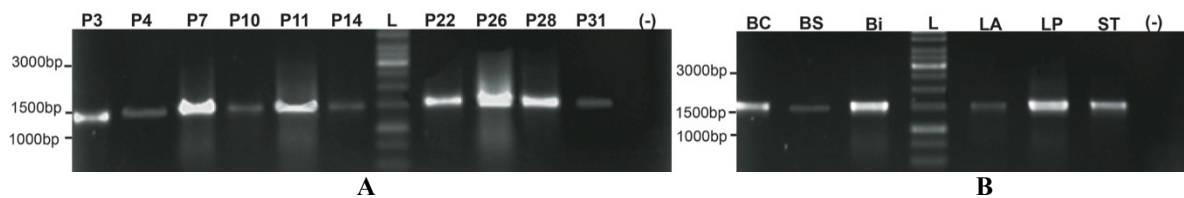
Các vi khuẩn trong các mẫu chế phẩm được phân lập và nuôi cấy theo quy trình cơ bản: Cân 0,1 g mẫu, dùng micropipette hút 900 µl nước muối sinh lý đã khử trùng, lắc đều bằng máy vortex để được nồng độ 10^{-1} . Hút 100 µl mẫu ở nồng độ 10^{-1} vào ống chứa 900 µl nước muối sinh lý để được nồng độ 10^{-2} , làm tương tự như thế đến các nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Các sản phẩm men vi sinh được cân và pha loãng bằng nước muối sinh lý vô trùng tới các nồng độ xác định để có từ 25 đến 250 khuẩn lạc mọc trên mỗi đĩa thạch khi

cấy trải 100 µl dịch tế bào trên môi trường nuôi cấy thích hợp với từng loại vi khuẩn (Nguyễn Lâm Dũng et al.). Chúng tôi sử dụng môi trường giàu dinh dưỡng LB phù hợp với hầu hết vi khuẩn nhằm thu được số chủng vi sinh vật nhiều nhất. Ngoài ra môi trường MRS được sử dụng để phân lập những mẫu có chứa *Lactobacillus*. Các đĩa được nuôi hiếu khí ở 37°C, 18-24 giờ. Việc xác nhận các chủng vi khuẩn phân lập được dựa vào thông tin trên nhãn sản phẩm gốc và việc quan sát hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc và kiểu bắt màu thuốc nhuộm Gram.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách DNA tổng số của các mẫu men vi sinh

Chúng tôi tiến hành tách chiết DNA genome của quần xã vi sinh vật trong 15 mẫu sản phẩm men vi sinh thu thập tại thị trường. Qua kiểm tra, việc tách chiết DNA genome chỉ thành công với 10/15 mẫu (liệt kê trong Bảng 1). Việc tách DNA không thành công với các mẫu còn lại có thể do các mẫu này chứa nhiều tạp chất, phụ gia như các vitamin, các chất tạo màu, tạo vị... gây khó khăn trong việc ly tâm, rửa mẫu hoặc mẫu bị vón cục, gây khó khăn trong quá trình phân tách bằng cột, hoặc thậm chí không chứa vi sinh vật như công bố. Kết quả nhân gen đoạn 16S rDNA với 10 mẫu tách chiết được đều cho băng có kích thước khoảng 1500 bp (Hình 1), chứng tỏ các đoạn gen quan tâm đã được khuếch đại thành công.



Hình 1. Điện di đồ phân tích sản phẩm khuếch đại 16S rDNA (kích thước 1500 bp) của: (A) các mẫu men vi sinh khảo sát (ký hiệu các mẫu được trình bày ở Bảng 1); (B) 06 chủng chuẩn: *Bacillus clausii* (BC), *Bacillus subtilis* (BS), *Bifidobacterium* (Bi), *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus plantarum* (LP), *Streptococcus faecalis* (ST), DNA chuẩn 1 Kb DNA Ladder (L), Đối chứng âm (-).

Kết quả phân tích quần xã vi sinh vật bằng phương pháp DGGE

Để chuẩn bị cho bước cuối cùng là điện di biến tính trên gel polyacrylamide, chúng tôi tiến hành khuếch đại vùng V3-V5 của đoạn 16S rDNA với kích thước 550 bp và thu được kết quả thể hiện trên Hình 2.

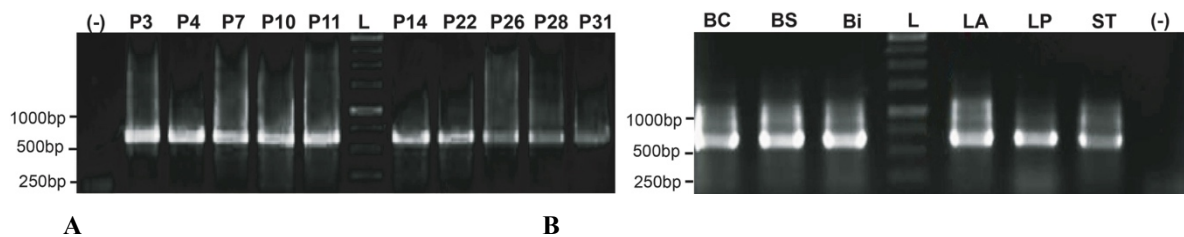
Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được 10 băng rất đậm khoảng 550 bp tương ứng với kích thước của đoạn V3-V5 16S rDNA (Lopez et al., 2003). Điều này cho thấy việc nhân gen vùng biến đổi V3-V5 16S rDNA của 10 mẫu men vi sinh và 6 chủng chuẩn đã thành công, và các môi sử dụng là đặc hiệu. Các băng này đều có cùng kích thước giống nhau, chỉ khác nhau về trình tự. Kết quả điện di DGGE (Hình 3) thể hiện thành phần trong quần xã vi khuẩn của các mẫu men

vi sinh. Trong kết quả này, mỗi băng đại diện cho một loài có mặt trong quần xã, do đó, số lượng băng xuất hiện của một mẫu tương ứng với số thành phần loài vi sinh vật trong mẫu đó và độ đậm nhạt của các băng phản ánh mật độ các loài. Mẫu P22 và P26 không lên băng có thể do DNA quá ít hoặc chất lượng kém (bị

phân hủy) nên các băng chưa phân tách trên gel điện di biến tính, vì vậy chưa thể đánh giá chính xác thành phần vi sinh vật có trong 2 mẫu này. Đảm bảo chất lượng và nồng độ DNA trong sản phẩm PCR và tối ưu hóa các điều kiện cho phương pháp DGGE có thể là các giải pháp cho các mẫu dạng này.

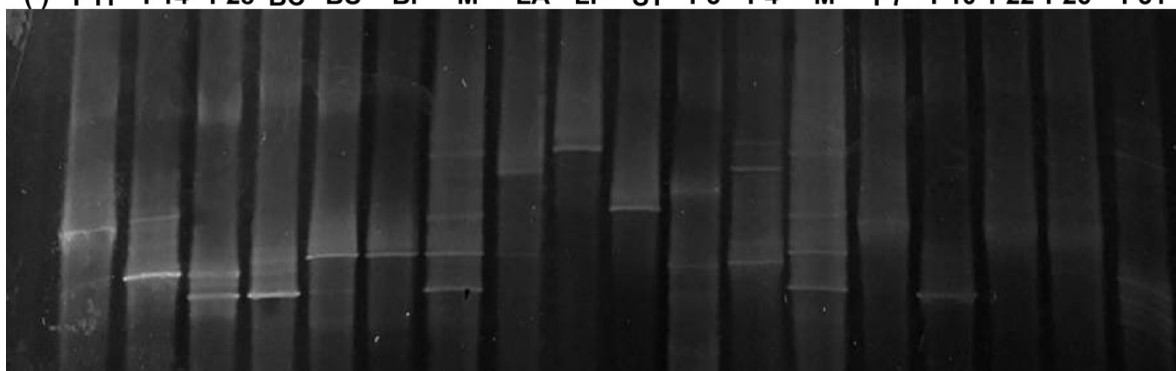
Bảng 1. Các sản phẩm men vi sinh sử dụng trong điện di biến tính DGGE và thành phần vi sinh vật công bố.

STT	Kí hiệu mẫu	Thành phần vi sinh vật trên nhãn mác
1	P3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>Streptococcus faecalis</i>
2	P4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
3	P7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
4	P10	<i>Bacillus Clausii</i>
5	P11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>
6	P14	<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>Lactobacillus kefir</i>
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>
7	P22	<i>Bifidobacterium</i>
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>
8	P26	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>Bacillus indicus</i>
9	P28	<i>Bacillus clause</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
10	P31	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Bacillus</i>



Hình 2. Điện di đồ phân tích sản phẩm PCR vùng V3-V5 của 16S rDNA (kích thước 550 bp) của (A) các mẫu men vi sinh khảo sát (kí hiệu các mẫu được trình bày ở Bảng 1); (B) 06 chủng chuẩn: *Bacillus clausii* (BC), *Bacillus subtilis* (BS), *Bifidobacterium* (Bi), *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus plantarum* (LP), *Streptococcus faecalis* (ST), 1 Kb DNA Ladder (L), Đối chứng âm (-).

(-) P11 P14 P28 BC BS Bi M LA LP ST P3 P4 M P7 P10 P22 P26 P31



Hình 3. Kết quả điện di DGGE phân tích thành phần vi sinh vật của các mẫu men vi sinh. Các băng xuất hiện trên từng giếng của bản điện di DGGE thể hiện (các) loài vi khuẩn có mặt trong sản phẩm probiotics tương ứng của giếng đó. P11, P14, P28, P3, P4, P7, P10, P22, P26, P31: Các mẫu men vi sinh tiến hành khảo sát; BC (*Bacillus clausii*), BS (*Bacillus subtilis*), Bi (*Bifidobacterium*), LA (*Lactobacillus acidophilus*), LP (*Lactobacillus plantarum*), ST (*Streptococcus faecalis*); Các đơn chủng chuẩn làm đối chứng; M: Marker gồm 6 băng tương ứng với 6 chủng chuẩn; (-): Đối chứng âm.

Phân tích kết quả xác định thành phần vi sinh vật bằng phương pháp DGGE và so sánh với kết quả phân tích bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống

Theo thống kê trong Bảng 2, kết quả đánh giá thành phần men vi sinh bằng phương pháp DGGE cho

thấy 3/10 (P10; P28; P31) sản phẩm đã tách được DNA có thành phần vi sinh vật giống hoàn toàn với công bố, 4/10 (P3; P4; P11; P14) chỉ thiếu 01 loài so với công bố, 1/10 (P7) sản phẩm không giống với công bố và 2/10 (P22; P26) sản phẩm chưa xác định được thành phần loài.

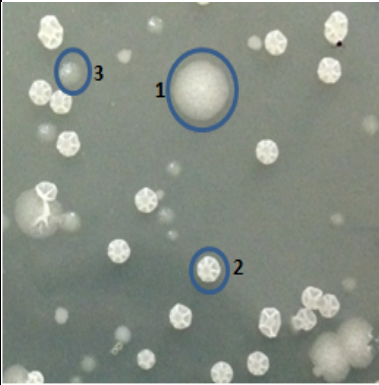
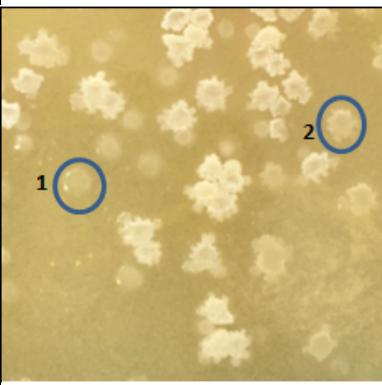
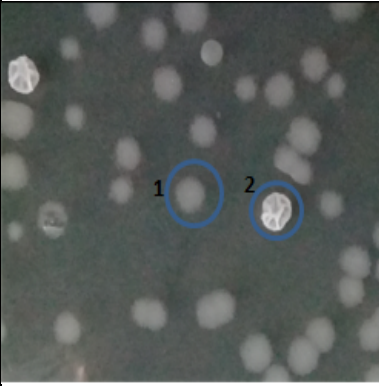
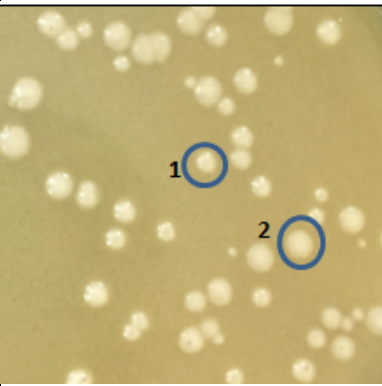
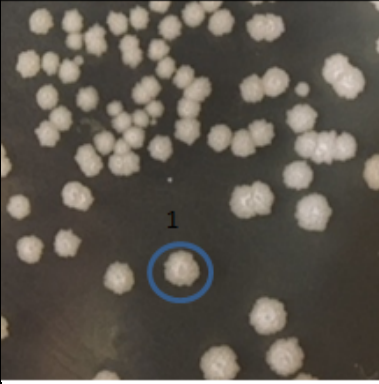
Bảng 2. Kết quả so sánh phân tích thành phần vi sinh vật bằng phương pháp phân lập truyền thống và phương pháp phân tử DGGE.

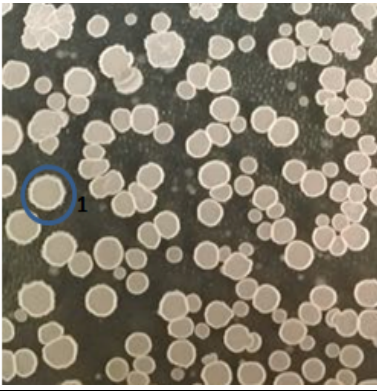
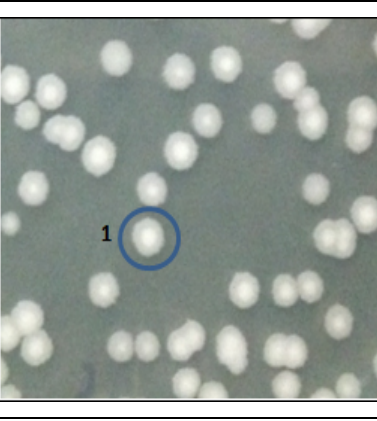
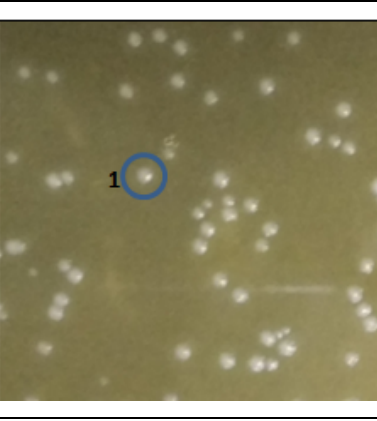
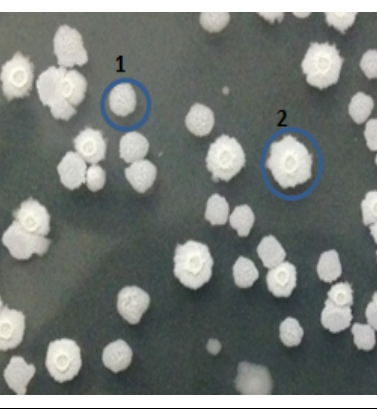
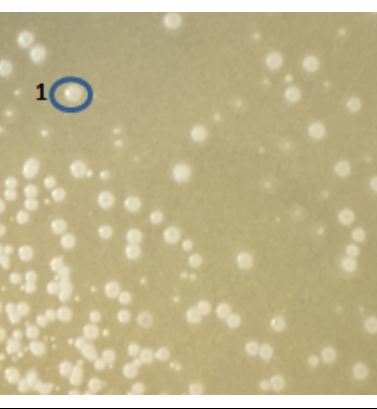
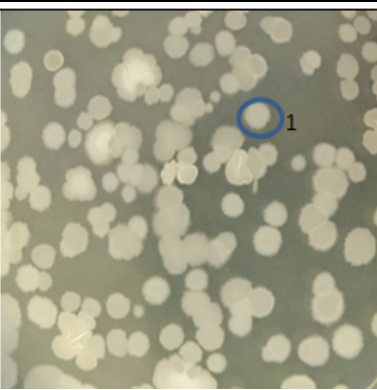

STT	Kí hiệu mẫu	Thành phần vi sinh vật công bố	Số loài vi sinh vật phân lập được	Thành phần vi sinh vật thể hiện trên gel DGGE
1	P3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	3 chủng	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
2	P4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 <i>Bifidobacterium Bb12</i> <i>Streptococcus thermophiles</i>	2 chủng	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium Bb12</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
3	P7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 chủng	<i>Streptococcus</i>
4	P10	<i>Bacillus clausii</i>	1 chủng	<i>Bacillus clausii</i>
5	P11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	1 chủng	<i>Bacillus subtilis</i>
6	P14	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactobacillus kefir</i>	2 chủng	<i>Streptococcus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
7	P22	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	1 chủng	Không xác định được
8	P26	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus clausii</i>	2 chủng	Không xác định được <i>Bacillus clausii</i>
9	P28	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus indicus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	1 chủng	<i>Bacillus subtilis</i>
10	P31	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 chủng	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bacillus subtilis</i>

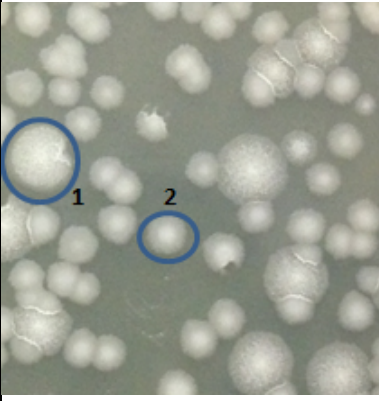
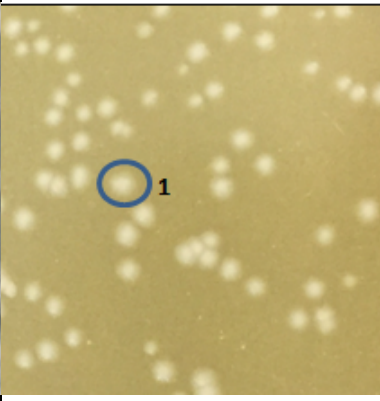
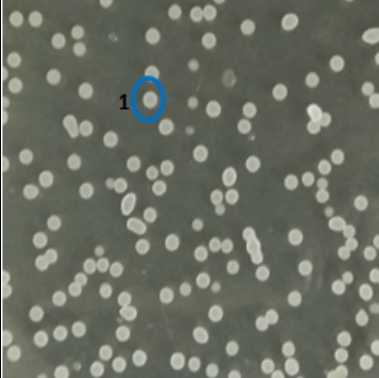
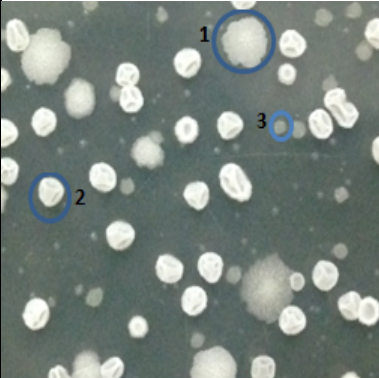
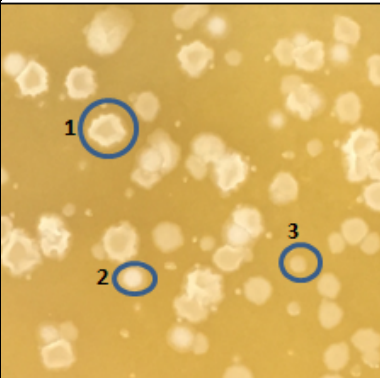
Để có thêm đánh giá về việc áp dụng kỹ thuật DGGE trong việc kiểm định chất lượng các sản phẩm men vi sinh, chúng tôi tiến hành thêm phương pháp phân lập, nuôi cấy vi sinh vật theo cách truyền thống trên môi trường LB 0,5% và môi trường MRS đối với 15 mẫu men vi sinh đã khảo sát để so sánh và đối chứng với kết quả của phương pháp DGGE (Bảng 3,

Hình 4). Xét về số lượng loài trong từng mẫu men vi sinh có được từ việc phân lập bằng phương pháp nuôi cấy, có 5/10 sản phẩm có đủ số lượng loài như công bố, mặc dù vậy việc phân biệt hay định danh chính xác loài vi khuẩn trong thành phần men vi sinh là không thể khẳng định bằng trực quan. Thêm nữa, một số sản phẩm có chứa vi khuẩn *Bifidobacterium* gặp khó khăn trong việc nuôi cấy.

Bảng 3. Kết quả phân lập dựa trên nuôi cấy của 10 sản phẩm men vi sinh đã được tách DNA để điện di DGGE.

STT	Kí hiệu mẫu	Thành phần vi sinh vật công bố	Các loại khuẩn lạc phân lập được trên môi trường LB	Các loại khuẩn lạc phân lập được trên môi trường MRS
1	P3	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Streptococcus faecalis</i> 		
2	P4	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 - <i>Bifidobacterium</i> Bb12 - <i>Streptococcus thermophiles</i> 		
3	P7	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> 		

4	P10	<i>Bacillus clausii</i>		
5	P11	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Bacillus subtilis</i> 		
6	P14	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Lactobacillus kefir</i> 		
7	P22	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Bifidobacterium</i> 		

8	P26	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus acidophilus</i> - <i>Bacillus subtilis</i> 		
9	P28	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus clausii</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus indicus</i> 		
10	P31	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 		

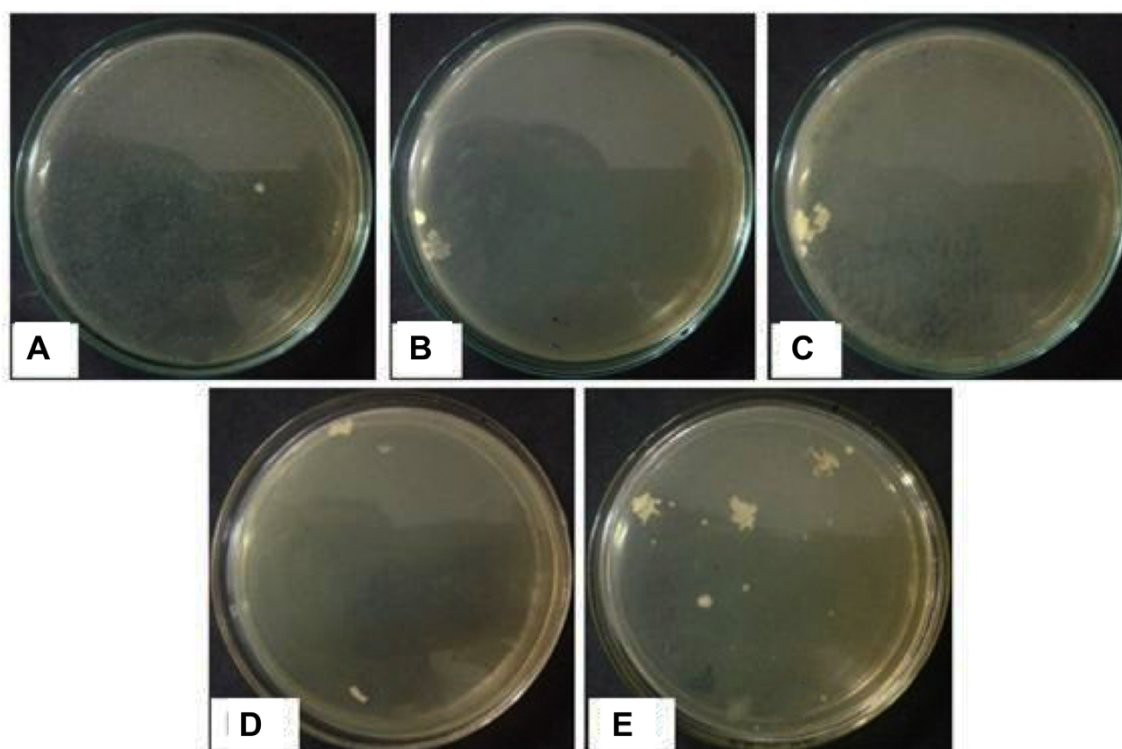
Các sản phẩm không tách được DNA (5/15 sản phẩm) được chọn để tiến hành nghiên cứu cũng được kiểm tra lại bằng phương pháp phân lập vi sinh vật. Kết quả (Hình 4) cho thấy các mẫu này cũng mọc rất kém hoặc không có khuẩn lạc, ngay cả ở nồng độ pha loãng 10^{-1} . Điều này cũng là cơ sở giải thích cho việc

không tách được DNA tổng số phục vụ phân tích DGGE.

Đối với những mẫu chứa các vi khuẩn đúng với nhãn sản phẩm, kết quả phân tích thành phần loài bằng DGGE cũng tương tự với kết quả thu được khi phân lập trên các môi trường thích hợp.

Như vậy, khi so sánh kết quả của hai phương pháp chúng tôi thấy mối tương quan chặt chẽ giữa kết quả phân tích DGGE với công bố trên nhãn cũng như với kết quả phân lập bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống. Tuy nhiên rõ ràng là kết quả từ phương pháp DGGE cung cấp nhiều thông tin (chính xác đến tên loài) và có độ tin cậy hơn hẳn so với phương pháp truyền thống. Hiện nay, các phương pháp nuôi cấy

truyền thống vẫn là cơ sở của các tiêu chuẩn Việt Nam về chế phẩm vi sinh (ví dụ TCVN 4884 : 2001 hướng dẫn chung về định lượng vi sinh vật và một số tiêu chuẩn khác phát hiện từng loại vi sinh vật đơn lẻ - thực tế là chưa có các tiêu chuẩn cụ thể cho men vi sinh); cho nên kết quả của nghiên cứu này có ý nghĩa tham khảo để hoàn thiện các phương pháp đánh giá chất lượng chế phẩm vi sinh.



Hình 4. Hình ảnh các đĩa phân lập của 05 mẫu men vi sinh không tách được DNA. A, B, C, D, E lần lượt là các mẫu P5, P6, P9, P16, P18 được pha loãng ở nồng độ 10^{-1} và nuôi cấy trên môi trường LB 0,5%

Mặc dù kết quả nghiên cứu này thể hiện tiềm năng ứng dụng của phương pháp DGGE, để khẳng định chắc chắn hơn kết quả so sánh hai phương pháp như nêu ở trên, có lẽ cần thực hiện thêm một số thí nghiệm bổ trợ. Ví dụ, cần tiến hành tách DNA của các đơn chủng phân lập được từ các mẫu men vi sinh, PCR nhân đoạn gen vùng V3-V5 16S rDNA và phân tích DGGE để so sánh cụ thể và đánh giá chính xác hơn về thành phần vi sinh vật, và cũng là cơ sở để khẳng định những kết luận đưa ra từ phương pháp DGGE.

Về mặt hạn chế, phương pháp DGGE chỉ cung cấp thông tin về định danh loài mà không giúp phân biệt tế bào vi khuẩn đó là sống hay chết trong thành phần của men vi sinh (Patrone *et al.*, 2016). Trong các nghiên cứu gần đây, đã có hàng loạt các kỹ thuật sinh học phân tử được áp dụng trong đánh giá chất lượng các chế phẩm vi sinh, phổ biến là Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP (Rasmussen *et al.*, 2012) hay Randomly Amplified Polymorphism DNA – RAPD (Dunbar *et al.*, 2000). Mỗi phương pháp phân loại phân tử nói trên có hiệu quả khác nhau

với từng mục đích và đối tượng nghiên cứu. Tuy nhiên, để phân biệt các loài khác nhau dựa trên một biomarker phổ biến có thể áp dụng cho nhiều loài, phương pháp thích hợp nhất là phương pháp DGGE phân tích trình tự gen 16S rRNA. Phương pháp này không quá phức tạp trong tính toán chọn lọc môi hay enzyme giới hạn, và việc phát triển ứng dụng của phương pháp này trong đánh giá chất lượng các sản phẩm probiotic tại Việt Nam cũng chưa được nghiên cứu sâu và đầy đủ. Vì vậy trên cơ sở điều kiện phòng thí nghiệm và những kết quả của nghiên cứu này có thể thấy tiềm năng của kỹ thuật DGGE trong đánh giá chất lượng men vi sinh.

Có thể thấy một hạn chế khác của phương pháp phân tích dựa trên DGGE là không đánh giá được số lượng từng loại vi sinh vật trong mỗi chế phẩm. Vì vậy, khi yêu cầu này được đặt ra, vẫn cần có sự hỗ trợ của các phương pháp khác (như các phương pháp truyền thống dựa trên nuôi cấy). Tuy nhiên, với tình hình hiện nay khi mà các chế phẩm vi sinh không đảm bảo chất lượng (nhiều trong số đó không đảm bảo thành phần vi sinh vật như kết quả của nghiên cứu này đã cho thấy) thì thế mạnh ứng dụng của phương pháp dựa trên DGGE là phát hiện nhanh những chế phẩm không đạt yêu cầu về thành phần loài.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả tổng hợp nêu trên, có thể nhận định sơ bộ rằng phần lớn các chế phẩm probiotic trên thị trường không đảm bảo chất lượng như công bố, đặc biệt là về thành phần loài. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện phân tích với 10 mẫu ngẫu nhiên và tỷ lệ các mẫu đạt yêu cầu (khẳng định bằng cả phương pháp DGGE và nuôi cấy truyền thống) chỉ là 30%. Trong các nghiên cứu xa hơn, việc phân tích với số lượng mẫu lớn hơn có thể thu được tỷ lệ phản ánh chính xác hơn thực trạng.

Với thực trạng như trên, có thể nói nhu cầu phân tích chính xác thành phần chế phẩm để giúp xác định các chế phẩm đảm bảo chất lượng là rất quan trọng. Phương pháp phân tích truyền thống, mặc dù là một phương pháp thường quy, thường đòi hỏi nhiều thời gian và không đảm bảo định danh chính xác hoàn toàn các vi sinh vật trong các chế phẩm. Vì vậy, kết quả của nghiên cứu này kiểm chứng khả năng đánh giá chất lượng chế phẩm probiotic của phương pháp DGGE và cho thấy phương pháp này tỏ ra hiệu quả và có tính chính xác cao. Nói cách khác, để xác định thành phần vi sinh vật trong các sản phẩm men vi sinh với quy trình chính xác và tiện lợi thì phương pháp

phân tích bằng kỹ thuật điện di gradient nồng độ chất biến tính (DGGE) là thích hợp và tiềm năng.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu xin gửi lời cảm ơn đến Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN đã tạo điều kiện và hỗ trợ kinh phí cho nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài này (MS: TN17.09). Để hoàn thành đề tài, nhóm nghiên cứu đã nhận được sự hỗ trợ, giúp đỡ từ các thầy cô, đồng nghiệp Khoa Sinh học và Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cho SS, Finocchiaro ET (2010) *Handbook of Prebiotic and Probiotic Ingredient: health benefits and food application*. CRC Press, London: 163-208.

Deng B, Shen CH, Shan XH, Ao ZH, Zhao JS, Shen XJ, Huang ZG (2012) PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time. *J Inst Brew* 118: 120–126

Dunbar J, Lawrence OT, Cheryl RK (2000) Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl Environ Microbiol* 66(7): 2943-2950.

Hanna S, Fordymacka A, Bardowski J, Gorecki RK, Mrukowicz JZ and Banaszkiewicz A (2004) Microbiological and genetic analysis of probiotic products licensed for medicinal purposes. *Med Sci Monit* 10: 346-350.

Hasler CM (2002) Functional foods: benefits, concerns and challenges – a position paper from the American Council on Science and Health.

Kołożyn- Krajewskaa D, Dolatowski ZJ (2012) Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochem* 47: 1761–1772.

Levin W (2011) Probiotics- The road map. *Int J Probiotics Prebiotics* 6: 133-140.

Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, Orr E, Phister T, Marshall M, VanderGheynst J, Mills DA (2003) Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69(11): 6801-6807.

Marimuthu A, Rizwana PR, Manas RS (2017) *Production of High- Quality Probiotics by Fermentation*. In Vijai KG, Helen T, Volha OS, Luiz AO, Maria GT. *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*. John Wiley & Son, NJ: 235-266

Tạp chí Công nghệ Sinh học 17(3): 577-588, 2019

Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2(3): 317-322.

Muyzer G, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59(3): 695-700.

Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển. *Khái quát về các phương pháp phân loại vi sinh vật truyền thống*. Giáo trình vi sinh vật học. VOER.

Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Thu Hương, Trịnh Thị Thùy Linh, Nhữ Thị Hà, Trịnh Thị Hào, Nguyễn Thành Linh, Đặng Xuân Nghiêm (2014) Khảo sát thành phần vi sinh và các đặc tính probiotic của các sản phẩm men tiêu hóa trên thị trường. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(1): 65-72.

Rasmussen HB (2012) *Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting*. In Sameh M. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech, Croatia: 315-334

Ravi NS, Pravin DS, Khedkar CD, Ajay S (2014) Selection criteria for probiotics: a review. *Int J Probiotics Prebiotics* 9(1):17-22

Saxelin M, Tynkkynen S, Salusjärvi T, Kajander K, Myllyluoma E, Mattila-Sandholm T, Korpela R (2010) Developing a multispecies probiotic combination. *Int J Probiotics Prebiotics* 5: 169-182.

Shah NP (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83(4): 894-907.

Urashima Y, Sonoda T, Fujita Y, Uragami A (2012) Application of PCR-Denaturing-Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) Method to Examine Microbial Community Structure in Asparagus Fields with Growth Inhibition due to Continuous Cropping. *Microbes Environ* 27(1): 43-48.

Valášková V, Baldrian P (2009) Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant Soil Environ* 55(10): 413-423

Wang J, Ma T, Zhao LX, Lv JH, Li GQ, Liang FL, Liu RL (2008) PCR-DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1981-1987

Yeung PS, Sanders ME, Kitts CL, Cano R, Tong PS (2002) Species-Specific Identification of Commercial Probiotic Strains. *J Dairy Sci* 85(5): 1039-1051.

Yaeshima T, Takahashi S, Ishibashi N, and Shimamura S (1996) Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of microplate hybridization method. *Int J Food Microbiol* 30: 303-313.

EVALUATING THE QUALITIES OF PROBIOTIC PRODUCTS BY A DGGE-BASED PROCEDURE

Tran My Hanh, Cao Thi Dung, Tran Thi Thanh Huyen, Pham The Hai

University of Science, Vietnam National Universit, Hanoi

SUMMARY

The quality of the probiotics is determined by the microbiological composition and can thus be verified by analyzing this characteristic. The use of the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) allows the detection of each microorganism through the corresponding band on the gel, which can be considered as the "bar code" of that microorganism. This "bar code" principle demonstrates the potential for the application of DGGE technology to test microbial probiotics with or without a bacterium as registered to assess whether they are qualified. As such, in this study, we experiment the application of DGGE method to test 10 commercial probiotic products, with a focus on products consisting of only bacteria which dominate the market. First, we performed DNA genome extraction and amplification of 550 bp DNA of the 16S rDNA by PCR. Then, the amplicon was analysed on polyacrylamide gels containing a 30% to 60% linear denaturing gradient of urea and formamide. Microbial composition of 7 of the 10 products showed a strong correlation between DGGE results with product

labeling as well as isolation of microorganism. This study thus demonstrates the potential application of DGGE technology in evaluating the qualities of probiotic products.

Keywords: *16S rDNA, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), probiotic, isolation of microorganisms, DNA extraction.*