

## ĐỊNH TÊN LOÀI VI KHUẨN LACTIC SINH AXIT BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GENE *pheS*

### Identification of Lactic Acid Bacteria Species Producing Acid by *pheS* Gene Sequencing Analysis

Nguyễn Thị Lâm Đoàn<sup>1</sup>, Ngô Xuân Mạnh<sup>1</sup>, Lê Thanh Bình<sup>2</sup>, Vandamme Peter<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Phòng thí nghiệm Vi sinh vật, Trường Đại học Ghent, Bỉ

Địa chỉ email tác giả liên lạc: [nlddoan@yahoo.com](mailto:nlddoan@yahoo.com)

Ngày gửi đăng: 05.05.2011; Ngày chấp nhận: 20.06.2011

#### TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic đã có nhiều ứng dụng trong công nghiệp chế biến và bảo quản thực phẩm. Vai trò chính của vi khuẩn lactic trong quá trình lên men là tạo ra axit để hình thành cấu trúc và hương vị cho sản phẩm và ở pH thấp có thể ức chế sự phát triển của một số loài vi sinh vật gây bệnh. Bài báo này đã xác định tên khoa học đến loài của chủng vi khuẩn lactic (DH5.8) có khả năng sinh axit cao được phân lập từ nem chua Thanh Hóa bằng phương pháp phân tích trình tự gen *pheS*. Trình tự gen *pheS* của chủng này được so sánh với các loài trong ngân hàng gen BCCM/LMG của Trường Đại học Ghent (Ghent, Bỉ) và Ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL). Tên loài của chủng DH5.8 đã được xác định là *Lactobacillus acidipiscis*. Những thông tin trong nghiên cứu này có thể sử dụng trong công tác tạo giống khởi động cho thực phẩm lên men.

Từ khóa: Định tên loài, gen *pheS*, nem chua, vi khuẩn lactic.

#### SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) are utilized in the production and preservation of various fermented foods. They produce organic acids that make flavor and antimicrobial activity of products. The objective of this study was to identify species of DH5.8 strain that could produced high acid, isolated from Thanh Hoa Nem chua by *pheS* gene sequencing analysis. Sequencing of this strain was compared to the known sequence database in EMBL and BCCM/LMG collection of Gent University, Belgium. The result showed that DH5.8 belongs to *Lactobacillus acidipiscis*. The information of this study may be useful for making starter culture for fermented food.

Key words: Identification, lactic acid bacteria, nem chua, *pheS* gene sequence.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic được sử dụng không chỉ để chế biến ra nhiều loại thực phẩm lên men truyền thống mà còn đóng vai trò chủ đạo trong quá trình sản xuất nhiều loại thực phẩm ở quy mô công nghiệp như sữa chua,

xúc xích (Drosinos và cs., 2005). Sự giảm pH trong quá trình lên men ảnh hưởng đến tính chất cảm quan của sản phẩm: tạo hương thơm, đặc tính axit và đặc biệt cấu trúc của sản phẩm. Ngoài ra, sự giảm giá trị pH dẫn đến sự ức chế sinh trưởng của một số loài vi

sinh vật gây bệnh (Leroy và cs., 2006; Rantsiou và Cocolin, 2008) và làm giảm khả năng hòa tan của protein, thúc đẩy khả năng tạo gel (Rantsiou và Cocolin, 2008). Vì vậy ngày càng có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn lactic, đặc biệt là khả năng sinh acid của chúng (Nguyen và cs., 2010). Trước đây, việc phân loại vi sinh vật thường theo các phương pháp truyền thống dựa vào các đặc tính hình thái, sinh lý và hóa sinh (Nguyen và cs., 2010). Các đặc trưng này đôi khi cũng bộc lộ những hạn chế dẫn đến nhiều trường hợp phải xác định lại tên phân loại của một số vi sinh vật. Từ những hạn chế trên cùng với những tiến bộ trong sinh học phân tử đã mở ra khả năng ứng dụng hữu hiệu các phương pháp sinh học phân tử vào trong phân loại học và nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Nếu như các phương pháp truyền thống chỉ có thể định tên những đối tượng vi sinh vật nuôi cấy được thì phương pháp sinh học phân tử có thể áp dụng đối với cả những vi sinh vật nuôi cấy được và những vi sinh vật không nuôi cấy được hoặc khó nuôi cấy trên môi trường nhân tạo (Leisner và cs., 1999; Rantsiou và cs., 2005; Van Hoorde và cs., 2008). Đặc biệt, đối với vi khuẩn lactic là một nhóm có rất nhiều chi (genus) và thậm chí trong một chi cũng có sự đa dạng rất lớn về loài nên thường gặp khó khăn khi sử dụng phương pháp truyền thống để xác định chúng ngay cả ở mức chi (Schleifer và cs., 1995). Vì vậy, việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phân tích dữ liệu trình tự gen *pheS* để xác định chủng vi khuẩn lactic DH5.8 sinh acid cao từ nem chua là một việc cần thiết. Trong thời gian gần đây, một đoạn gen *pheS* ngắn rất được quan tâm để xác định mối quan hệ phát sinh loài (Naser và cs., 2007). Gen *pheS* mã hoá cho protein phenylalanyl – tRNA synthase. Đây là protein đóng vai trò như enzyme có tác dụng xúc tác cho việc chuyển phenylalanine đến tRNA để tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein (Naser và cs., 2005). Nhiều nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng đoạn gen

ngắn mã hóa cho một protein nào đó như một dụng cụ hữu hiệu để xác định các loài tốt hơn là sử dụng gen ribosomal vì chúng cho tỷ lệ khác nhau lớn và giúp phân biệt rõ các loài gần nhau trong nhóm vi khuẩn lactic (De Bruyne và cs., 2008; Scheirlinck và cs., 2007). Sản phẩm PCR là một đoạn gen dài 450 base pair (Naser và cs., 2005), là công cụ rất có giá trị trong phân tích nguồn gốc phát sinh loài của các chủng. Nghiên cứu này đã sử dụng gen *pheS* để định tên loài của vi khuẩn sinh acid cao được phân lập từ nem chua Thanh Hóa.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn lactic sinh acid cao được phân lập từ mẫu nem chua Thanh Hóa, được kí hiệu là DH5.8 và trong ngân hàng giống vi sinh vật của Trường Đại học Ghent (Bỉ) chủng này được mã hóa là R-42587. Chúng thuộc gram (+), tế bào hình cầu, không có hoạt tính catalase, có hoạt tính sinh tổng hợp acid cao (có hoạt tính vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$  sau 48 giờ nuôi cấy là 5 mm).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tách chiết DNA

Chủng DH5.8 được nuôi cấy trong môi trường MRS agar (Oxoid) ở 30°C trong 24 giờ. DNA genomic của chủng được tách chiết theo phương pháp của Gevers và cs. (2001). Sau khi nuôi cấy được 24 giờ, sinh khối tế bào được chuyển vào ống eppendorf và được rửa với 800  $\mu\text{l}$  TES. Ly tâm 10 phút tốc độ 5000 vòng trong 1 phút ở 4°C. Loại bỏ phần dung dịch, thu sinh khối tế bào và bảo quản trong tủ lạnh - 20°C (tối thiểu 1 giờ - tối đa 1 tuần). Tiếp theo, tiến hành tách chiết DNA theo các bước sau:

- Rửa tế bào (làm tan băng, với 400  $\mu\text{l}$  TES, sau đó ly tâm 5 phút tốc độ 1000 vòng trong 1 phút ở 4°C và loại bỏ phần dung dịch).

- Phá vỡ tế bào (cho 300  $\mu$ l STET vào eppendorf có chứa sinh khối tế bào, thêm 75  $\mu$ l lysozyme – mutanolysine, để ở nhiệt độ 37°C trong 60 phút, sau đó cho 40  $\mu$ l SDS 20% ấm ở 37°C và thêm 10 mg cát trắng, rồi lắc mạnh 60 giây và giữ ở 37°C trong 10 phút, tiếp tục giữ ở 65°C trong 10 phút).

- Tinh sạch DNA: thêm 100  $\mu$ l dung dịch đệm TE và cho 515  $\mu$ l hỗn hợp dung dịch phenol: chloroform: isoamylalcohol theo tỷ lệ 24:24:1, sau đó ly tâm 5 phút tốc độ 13.000 vòng trong 1 phút ở 4°C, chuyển phần dịch nổi sang ống eppendorf mới.

- Kết tủa DNA: cho 70  $\mu$ l NaCl 5M và 1 ml isopropanol lạnh, đảo ngược eppendorf 1-2 lần để tủa DNA, ly tâm 30 phút tốc độ 13.000 vòng trong 1 phút ở 4°C rồi đổ bỏ dịch nổi một cách nhẹ nhàng

- Rửa và làm khô DNA: cho 500  $\mu$ l ethanol 70% lạnh và ly tâm 5 phút với tốc độ 13.000 vòng trong 1 phút ở 4°C, đổ bỏ dịch nổi một cách nhẹ nhàng, rồi làm khô trên giấy thấm, để khô tự nhiên trong không khí khoảng 20 phút, sau đó thêm 100  $\mu$ l - 150  $\mu$ l dung dịch TE, tiếp đến bảo quản DNA ở -20°C. Ngày tiếp theo cho thêm 1,5  $\mu$ l RNAase 10 mg/ml và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

- Chất lượng và độ tinh sạch DNA được kiểm tra bằng cách đo quang phổ ở bước sóng 234, 260 và 280 nm (SpectraMax Plus384, Molecular Devices, California, USA) và điện di trên gel 1% w/v agarose trong 45 phút ở điện thế 75V của 5  $\mu$ l DNA trộn với 2  $\mu$ l loading dye (4 g sucrose và 2,5 mg bromophenol blue hòa tan trong 6 mL đệm TE). Marker được sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing của Bỉ.

### 2.2.2. Phản ứng PCR

Mỗi PheS-21-F (5'-C A Y C C N G C H C G Y G A Y A T G C -3') và PheS - 22 - R (5'-C CWARVCCRAARGCAAARCC -3') được dùng để nhân lên đoạn gen *pheS* (De Bruyne và cs., 2008; Naser và cs., 2005). Phản ứng được tiến hành với DNA pha loãng (OD = 1). Thể tích PCR của 50  $\mu$ l gồm 5  $\mu$ l của 10x PCR

buffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>), 5  $\mu$ l deoxynucleoside triphosphates (2 mM của mỗi loại dNTP), 0,5  $\mu$ l của mỗi mỗi (50  $\mu$ M), 1  $\mu$ l Taq polymerase (1U l<sup>-1</sup>), 37  $\mu$ l nước cất và 1  $\mu$ l dung dịch DNA. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy GeneAmp PCR 9600 thermocycler (Applied Biosystem). Chu trình nhiệt bao gồm (1) 5 phút ở 95°C, (2) 3 chu trình 1 phút ở 95°C + 2 phút 15 giây ở 46°C + 1 phút 15 giây ở 72°C, 30 chu trình 35 giây ở 95°C + 1 phút 15 giây ở 46°C + 1 phút 15 giây ở 72°C, (4) cuối cùng 7 phút 72°C (De Bruyne và cs., 2008; Naser và cs., 2005). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách lấy 5  $\mu$ l sản phẩm PCR với 2  $\mu$ l của loading dye, điện di trên gel agarose 1% ở 75V trong 45 phút. Marker được sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing của Bỉ. Sau khi kiểm tra, nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* thì chúng sẽ được tinh sạch bằng hệ thống màng lọc Nucleofast 96 PCR (Macherey - Nagel).

Để giải trình tự gen *pheS* thì sản phẩm PCR vừa tinh sạch ở trên sẽ được chạy PCR lần thứ hai. Thể tích PCR là 10  $\mu$ l gồm 3  $\mu$ l sản phẩm PCR đã được tinh sạch, 1.857  $\mu$ l nước cất, 1.857  $\mu$ l 5 x dung dịch đệm sequencing, mỗi 3  $\mu$ l (4  $\mu$ M) mỗi xuôi và mỗi ngược tách biệt, Bigdye 0.286  $\mu$ l. Chương trình nhiệt gồm 30 chu trình 15 giây ở 96°C + 1 giây ở 35°C + 4 phút ở 60°C. Sau đó 10  $\mu$ l sản phẩm PCR cho mỗi xuôi và 10  $\mu$ l sản phẩm PCR cho mỗi ngược được chuyển vào 2 giếng của đĩa 96 giếng và thêm 45  $\mu$ l dung dịch SAM, 10  $\mu$ l XTerm. Giải trình tự được thực hiện nhờ máy ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem).

### 2.2.3. Phân tích trình tự gen *pheS* và xác định loài

Số liệu trình tự thô được chuyển đến AutoAssemble software 1.40 (applied Biosystem) hoặc GeneBuilder (Applied Maths), trình tự liên tục của gen *PheS* được xác định. Trình tự liên tục này sẽ được nhập vào chương trình Bionumeric 5.1 (Applied

Maths), giá trị tương đồng của các loài và cây phân loại được tạo ra dựa vào phương pháp neighbourjoining và maximum-parsimony (Saitou và cs., 1987). Trình tự của chủng này được so sánh với các loài trong Ngân hàng gen BCCM/LMG của Trường Đại học Gent (Gent, Bỉ) hoặc được so sánh với Ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL). Sử dụng chương trình FASTA để xác định loài có mối liên quan gần nhất đã biết của trình tự trong phần gen *pheS*.

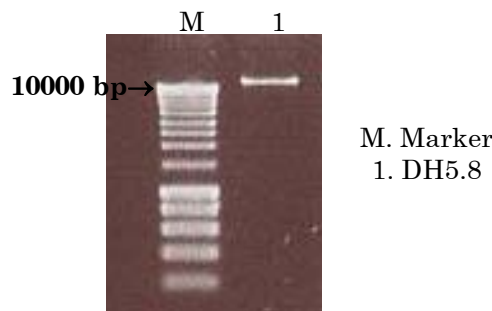
### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

DNA genomic của chủng DH5.8 sau khi tách chiết được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose. Kết quả chỉ ra trong hình 1 cho thấy, sau khi chạy điện di mẫu DNA genomic của chủng DH5.8 chỉ thu một vạch đậm có kích thước lớn hơn 10.000 bp. Điều này chứng tỏ việc tách chiết DNA của chủng DH5.8 đã thành công, không có hiện tượng

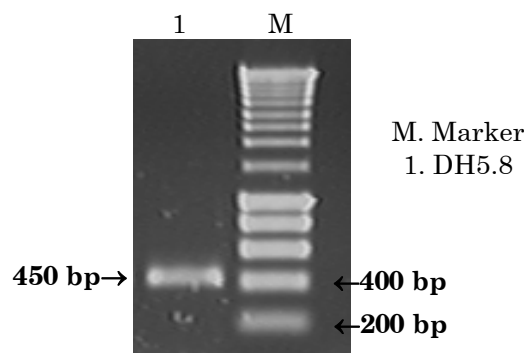
đứt gãy DNA và không nhiễm tạp RNA.

Đoạn gen *pheS* được nhân lên với cặp mồi 21F và 22R. Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được một băng khoảng 450 bp (Hình 2) tương ứng với kích thước của đoạn gen *PheS* (Naser và cs., 2005). Như vậy, khuếch đại đoạn gen *PheS* của chủng DH5.8 đã cho kết quả tốt. Sau khi kiểm tra nếu sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen *pheS* sẽ được tinh sạch, chạy PCR với mồi xuôi, mồi ngược tách biệt và sử dụng chương trình nhiệt như đã miêu tả trong phần 2.2.

Trình tự nucleotid của chủng này được so sánh với các loài trong Ngân hàng gen BCCM/LMG của Trường Đại học Gent (Gent, Bỉ) hoặc đoạn DNA này được so sánh với Ngân hàng trình tự nucleotit quốc tế (EMBL) và thực hiện nhờ sử dụng chương trình FASTA để xác định loài có mối liên quan gần nhất đã biết của trình tự trong phần gen *pheS*. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 3.



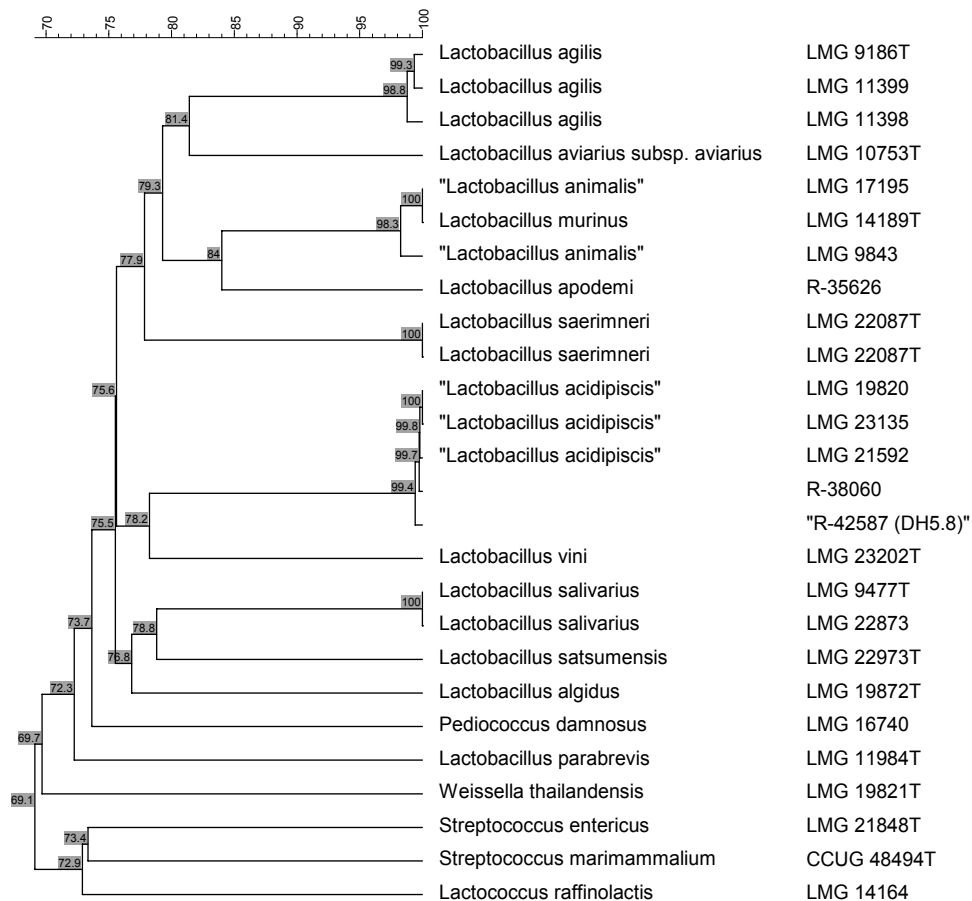
Hình 1. Chất lượng và độ tinh sạch DNA của chủng DH5.8



Hình 2. Sản phẩm PCR đoạn gen *pheS* của DH5.8

**Bảng 1. Xác định tên khoa học đến loài của chủng DH5.8 (so sánh với ngân hàng trật tự nucleotide (EMBL))**

Chủng	Loài có mối quan hệ gần nhất	% ID	Accession no.
DH5.8	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	99,3	EM_PRO:AM168426
	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	99,3	EM_PRO:AM087762
	<i>Lactobacillus animalis</i>	77,6	EM_PRO:AM284181



**Hình 3. Cây phát sinh chủng loài của DH5.8 được so sánh với các loài trong ngân hàng gen *pheS* BCCM/LMG của Trường Đại học Ghent (Ghent, Bỉ), thước đo thể hiện 10 nucleotit khác nhau trên 100 nucleotide so sánh**

Như vậy, khi so sánh trình tự gen *pheS* của chủng DH5.8 với Ngân hàng trình tự nucleotide quốc tế (EMBL) nhờ sử dụng chương trình FASTA, nghiên cứu nhận thấy, chủng này có mối liên quan gần nhất với loài

*Lactobacillus acidipiscis*. Mức độ tương đồng của chủng DH5.8 với loài *Lactobacillus acidipiscis* lên đến 99,3% với hai mã số trong ngân hàng gen (EM PRO: AM168426 và EM PRO: AM087762). Trong khi đó, chủng

DH5.8 chỉ có mức tương đồng là 77,6% với loài *Lactobacillus animalis* có mã số trong ngân hàng gen (EM PRO:AM284181). Từ những kết quả trên có thể kết luận rằng chủng DH5.8 thuộc loài *Lactobacillus acidipiscis*.

Kết quả này cũng tương đồng với kết quả khi so sánh trình tự nucleotide chủng này với ngân hàng gen *pheS* của các loài vi khuẩn trong ngân hàng gen của BCCM/LMG của Trường Đại học Gent (Gent, Bỉ). Khi đưa đến Ngân hàng gen BCCM/LMG của Trường Đại học Gent (Bỉ) thì chủng DH5.8 được nhận ký hiệu R- 42587 (DH5.8). Ở ngân hàng gen này, chủng DH5.8 có trình tự gen tương đồng với loài *Lactobacillus acidipiscis* đến 99,4% với mã số LMG 19820, LMG 23135, LMG 21592 và chỉ giống loài *Lactobacillus animalis* với mức tương đồng là 75,6 % với mã số LMG 9843 (Hình 3).

#### 4. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật phân tích trình tự gen *pheS*, đã định tên đến loài chủng vi khuẩn DH5.8 có hoạt tính sinh axit cao. Chủng thuộc loài *Lactobacillus acidipiscis*. Kết quả này đã khẳng định, việc sử dụng đoạn gen ngắn mã hóa cho một protein nào đó như gen *pheS* mã hoá cho protein phenylalanyl – tRNA synthase là một công cụ hữu hiệu để xác định tên các loài và cho phép phân biệt cao giữa các loài gần nhau trong nhóm vi khuẩn lactic.

#### Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin được cảm ơn sự hợp tác của Phòng thí nghiệm Vi sinh vật, Trường Đại học Ghent, Bỉ đã tạo điều kiện để thực hiện nội dung nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

De Bruyne K., C.M.A.P Franz., M. Vancanneyt., U. Schillinger., F. Mozzi., G.F. de Valdez., L. De Vuyst and P.

Vandamme (2008). *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2909-2916.

Drosinos E.H., M. Mataragas., N. Xiraphi., G. Moschonas., F. Gaitis and J. Metaxopoulos (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science* 69:307-317.

Gevers D., G. Huys and J. Swings (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205:31-36.

Leisner J.J., B. Pot., H. Christensen., G. Rusul., J. E. Olsen., B. W. Wee., K. Muhamad and H. M. Ghazali (1999). Identification of Lactic Acid Bacteria from Chili Bo, a Malaysian Food Ingredient. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:599-605.

Leroy F., J. Verluyten and L. De Vuyst (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106:270-285.

Naser S.M., F. L. Thompson., B. Hoste., D. Gevers., P. Dawyndt., M. Vancanneyt and J. Swings (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151:2141-2150.

Naser S.M., P. Dawyndt., B. Hoste., D. Gevers., K. Vandemeulebroecke., I. Cleenwerck., M. Vancanneyt and J. Swings (2007). Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2777-2789.

Nguyen H., F. Elegado., N. Librojo-Basilio., R. Mabesa and E. Dizon (2010). Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nem

- chua, a traditional fermented meat from Vietnam. *Beneficial Microbes* 1:67-74.
- Rantsiou K and Cocolin L (2008). Fermented Meat Products, in: L. Cocolin and D. Ercolini (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*, Springer New York. pp. 91-118.
- Rantsiou K., R. Urso., L. Iacumin., C. Cantoni., P. Cattaneo., G. Comi and L. Cocolin (2005). Culture-Dependent and -Independent Methods To Investigate the Microbial Ecology of Italian Fermented Sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1977-1986.
- Saitou N, and Nei M (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Scheirlinck I., Van der Meulen R., Van Schoor A., Cleenwerck I., Huys G., Vandamme P., De Vuyst L and Vancanneyt M. (2007). *Lactobacillus namurensis* sp. nov., isolated from a traditional Belgian sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:223-227.
- Schleifer K.-H., Ehrmann M., Beimfohr C., Brockmann E., Ludwig W and Amann R (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5:1081-1094.
- Van Hoorde K., T. Verstraete., P. Vandamme and G. Huys (2008). Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology* 25:929-935.