

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH, HÓA SINH VÀ GIẢI TRÌNH TỰ VÙNG GEN 16S-rDNA ĐỂ ĐỊNH DANH VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG SINH PROTEASE TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN MẮM MỰC

Tóm tắt: Mắm mực là sản phẩm lên men truyền thống của người miền Trung Việt Nam. Chất lượng của sản phẩm chịu ảnh hưởng của khá nhiều yếu tố: nguyên liệu, thời gian lên men, nồng độ muối, hệ vi sinh vật thực hiện quá trình lên men... Trong đó, yếu tố quyết định đến chất lượng sản phẩm là hệ vi khuẩn lactic có khả năng sinh protease. Kết quả bước đầu đã phân lập được 5 dòng vi khuẩn lactic có khả năng sinh protease từ mắm mực. Kết hợp quan sát đặc điểm hình thái với phương pháp hóa sinh, khảo sát hoạt tính enzyme catalase, khả năng biến dưỡng citrate và hoạt tính đông tụ sữa đã định danh sơ bộ 5 dòng này thuộc vào 2 chi *Lactobacillus* và *Bacillus*. Tiếp tục dùng kỹ thuật giải trình tự vùng gen 16S rDNA đã định danh được 5 loài vi khuẩn này là *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium*; *Lactobacillus acidophilus*, *L. Plantarum*.

Từ khóa: mắm muối, 16S rDNA, lên men lactic, vi khuẩn Lactic, protease

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mắm mực là một dạng sản phẩm lên men truyền thống. Nó được làm từ loại mực ống nhỏ (mực sữa) còn tươi, trộn với muối theo tỉ lệ 3 mực: 1 muối, để lên men tự nhiên, sau khoảng 2-3 tháng là ăn được. Trong quá trình chế biến mắm, dưới sự tác động của nồng độ muối cao cũng như sự hiện diện của các nhóm vi sinh vật khác nhau đã tạo nên nét đặc trưng về mùi vị và cấu trúc của sản phẩm. Một trong những yếu tố quyết định đến chất lượng sản phẩm là hệ vi sinh vật lên men lactic (LAB) có khả năng sinh protease.

Vì vậy, việc phân lập và định danh các giống LAB sinh protease có trong sản phẩm này là rất cần thiết phục vụ cho công tác nghiên cứu và giảng dạy. Đồng thời, trên cơ sở đó có thể góp phần hoàn thiện sản phẩm và cung cấp giống khởi

động cho quá trình sản xuất tạo sản phẩm có chất lượng ổn định.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu mắm muối

Nguyên liệu mực sữa mua tại chợ Phước Nguyên, thành phố Bà Rịa, tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu. Mực tươi, lớp vỏ ngoài màu trắng, không dập, túi mực còn nguyên, không sứt đầu, khối lượng trung bình 4-6 con/100g.

Mực mua về được rửa qua nước sạch, để ráo và trộn với muối hạt theo tỉ lệ 3 mực: 1 muối rồi cho vào hũ nhựa sạch, đậy kín, để lên men tự nhiên. Sau 3 tháng, sản phẩm mắm muối được đem ra làm mẫu nghiên cứu.

2.2. Hóa chất dùng trong nghiên cứu

Muối hạt của Công ty CP muối và thương mại Bà Rịa - Vũng Tàu,

|| ThS. Phạm Thị Kim Ngọc⁽¹⁾

|| TS. Nguyễn Thị Minh Nguyệt⁽²⁾

⁽¹⁾ Khoa Hóa học và CNTP, trường Đại học BR-VT

⁽²⁾ Viện CNTP&SH, trường Đại học Công nghiệp TP.HCM

môi trường MRS và SCA của Ấn Độ, casein của Công ty Himedia, các hóa chất dùng cho phản ứng PCR của công ty Fermentas (Mỹ), bộ kit genomic DNA Isolation tách chiết DNA của GeNet Bio, các cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR là primer Lac 1 và Lac 2, các hóa chất chạy điện di của công ty Sigma, thang DNA 100 bp plus và 1kb plus của ABM - Canada.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân lập

Từ mẫu mắm muối đã lên men, tiến hành phân lập LAB trên môi trường thạch MRS ở 37°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc (KL) sau khi phân lập rỗng được nhận diện để xác định giống trên cơ sở:

- Xác định hình thái của dòng vi khuẩn phân lập: dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc điểm hình thái tế bào, nhuộm gram.

- Xác định khả năng sinh protease ngoại bào bằng cách cấy chấm điểm vi khuẩn lên môi trường thạch MRS có bổ sung 1% casein.

Khảo sát một số phản ứng sinh hóa đặc trưng: khả năng sinh

enzyme catalase, khả năng biến dưỡng citrate và hoạt tính làm đông tụ sữa.

2.3.2. Xác định tên loài của dòng vi khuẩn phân lập được bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Trích ly DNA bằng kit genomic DNA Isolation của hãng GeNet Bio. Các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau khi thu nhận được tiến hành điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kích thước khi so sánh với thang chuẩn 1kb plus.

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 25 µl bao gồm: 0,5 µl DNA khuôn, 12,5 µl PCR master mix, 0,5 µl mỗi Lac1, 0,5 µl mỗi Lac2, 9,5 µl nước. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR Mastercycler – Eppendorf theo chu kỳ 96°C/3 phút, 30 chu kỳ (94°C/1 phút, 40°C/1 phút, 72°C/2 phút), 72°C/10 phút, giữ 4°C. Sản phẩm PCR mong đợi là các đoạn DNA có kích thước khoảng 340 bp. Phát hiện sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel Agarose 1,2%.

Vùng gen sau khi khuếch đại được tiến hành gởi mẫu giải trình tự tại Công ty Nam Khoa Biotek. Trình tự vi khuẩn sẽ được sử dụng phần mềm Blast nucleotide trên ngân hàng gen NCBI để chọn kết quả cho độ tương đồng cao nhất.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm tế bào

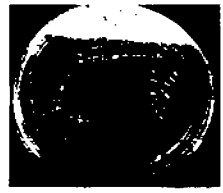


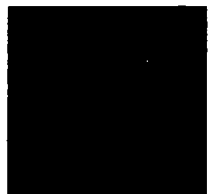


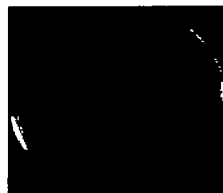


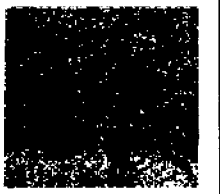
Từ các mẫu mực muối khảo sát, chúng tôi đã phân lập thu nhận được 9 khuẩn lạc khác nhau. Thử nghiệm khả năng sinh protease ngoại bào bằng cách cấy chấm điểm vi khuẩn lên môi trường thạch MRS có bổ sung casein. Kết quả cho thấy có 5 khuẩn lạc có khả năng sinh protease (kí hiệu I - V) còn lại đều âm tính. (Hình 1)

Tiến hành nhuộm Gram quan sát vi thể các khuẩn lạc có khả năng sinh protease phân lập được, kết



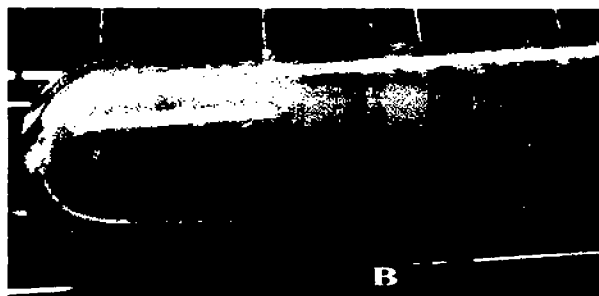
Hình 1: Kết quả thử nghiệm khả năng sinh protease

Bảng 1. Đặc điểm của 5 dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease phân lập được

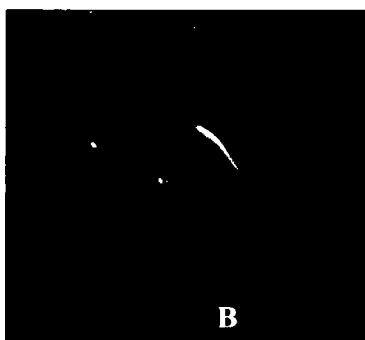
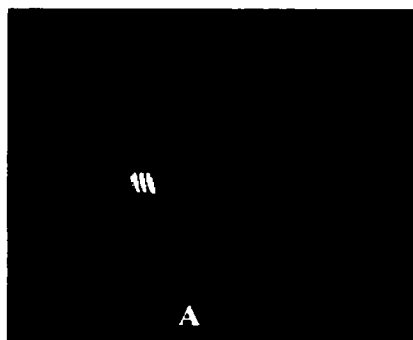
Khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái	Hình dạng khuẩn lạc	Tiêu bản nhuộm Gram
I	- KL tròn, nhỏ li ti, màu trắng sữa, khô. - Tế bào que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ hay xếp thành mảng, G+		
II	- KL bầu dục, trắng, nhầy. - Tế bào que dài, kích thước lớn, đứng riêng lẻ hay xếp thành chuỗi dài, G+		
III	- KL trắng, tròn, đẹp, nhầy và ướt. - Tế bào que dài, hai đầu bầu, đứng riêng lẻ, có bào tử, G+		
IV	- KL tròn, nhỏ, màu ngà. - Tế bào hình que dài, dạng sợi, G+		
V	- KI trắng, tròn, rìa răng cưa không đều. - Tế bào que ngắn, hai đầu bầu, đứng riêng lẻ, có bào tử, G+		

Bảng 2: Kết quả các thử nghiệm sinh hóa

Thử nghiệm	Khuẩn lạc				
	I	II	III	IV	V
Đông tụ sữa	+	-	-	+	-
Khả năng biến dưỡng citrate	-	+	+	-	+
Khả năng sinh catalase	-	+	+	-	+



Hình 2: Kết quả phản ứng đông tụ sữa: (+) hình A, (-) hình B



Hình 3: Kết quả phản ứng catalase: (+) hình A, (-) hình B

qua trong bảng 1.

Kết quả 5 KL phân lập được có một số đặc điểm chung, chia vào 2 nhóm: nhóm các tế bào (TB) hình que, G⁺, không sinh bào tử và nhóm TB hình que, G⁺, sinh bào tử. Dự đoán các KL này thuộc vào 2 chi *Lactobacillus* và *Bacillus*. (Bảng 1)

3.2. Kết quả các thử nghiệm sinh hóa

Từ kết quả quan sát đặc điểm hình thái của KL và TB, chúng tôi tiến hành các phản ứng sinh hóa đặc trưng cho 2 nhóm dự đoán. Kết quả thể hiện trong bảng 2. (Bảng 2)

Khảo sát hoạt tính làm đông tụ sữa cho thấy khuẩn lạc I và IV thuộc cùng 1 giống *Lactobacillus* vì sự có mặt của vi khuẩn này trong sữa sẽ biến đường lactose thành acid lactic làm giảm pH. Khi pH = 4,7 tương đương điểm đẳng điện của casein sẽ xảy ra quá trình kết tụ để tạo gel. (Hình 2)

Biến dưỡng citrate là thử nghiệm cho khả năng sử dụng nguồn citrate là nguồn carbon duy nhất. Đây là phản ứng điển hình của giống *Bacillus*. Thử nghiệm cho kết quả dương tính ở các KL: II, III và V. Điều này có thể kết luận các KL cho thử nghiệm (+) thuộc giống *Bacillus*.

Thử nghiệm khả năng sinh enzyme catalase nhằm ghi nhận đặc điểm hiếu khí hay kỵ khí của các nhóm vi khuẩn. Kết quả cho (-) ở các KL I và IV, còn lại đều dương tính. (Hình 3)

Kết quả khảo sát cho phép chúng tôi kết luận như sau: Các KL I và IV thuộc giống *Lactobacillus*, các KL còn lại thuộc giống *Bacillus*.

3.3. Kết quả nhận diện tên loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Tiến hành giải trình tự vùng gen 16S rDNA của 5 loài vi khuẩn phân lập được, kết quả ghi nhận trong bảng 3. (Bảng 3,4)

Bảng 3. Kết quả giải trình tự gen 16S rDNA của 9 loài vi khuẩn phân lập được

KL	Trình tự gen 16S rDNA
I	ATTTATCAATTAATAAAGAGACACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTA AAGAAGAACATATCTGAG AGTAACTGTTCCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATAGCTAGGTGGCAACGTTTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCC AGGCGGTTTTTTAAGTGCATGTGAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAA CTTGAGTGCAG
II	TTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGA GAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTA CCTAACAGAAAGCCAC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTT TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCG TGGAGGG TCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGG AATCCATGTGT
III	GGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAC GGTACCTA ACCAGAAA GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT TGTCCGGAATTATTGGGGTAAAGGGCTGCAGGC GGTTTCTTAAGCTCGATGTGAAAGCCCC GGCTCAA CCGGGGA GGGTCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG TGGAATTCCATGTGTA
IV	GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTA ACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAAAATAAGTCTA ATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGA GAGTGGAACTCCATTGT
V	CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCA CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA A AGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGAT GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA GGGTCAT TG G AAAC TGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATG TGTAGCGGTGGAATAAA

Bảng 4. So sánh kết quả giải trình tự trên ngân hàng gen

KL	Mã gen	Các dòng so sánh	Mức độ tương đồng (%)	Loài được xác định
I	NR075041.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 16S rRNA gen	92	<i>L.plantarum</i>
II	NR074290.1	<i>Bacillus megaterium</i> QMB1551 16S rRNA gen	100	<i>B.megaterium</i>
III	NR075005.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 16S rRNA gen	100	<i>B.amyloliquefaciens</i>
IV	NR075049.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 30SC 16S rRNA gen	100	<i>L.acidophilus</i>
V	NR118591.1	<i>Bacillus subtilis</i> , st.16 gen for 16S rRNA, par.se	98	<i>B. subtilis</i>

IV. KẾT LUẬN

Đã có 5 loài vi khuẩn Lactic có khả năng sinh protease được phân lập và định danh từ sản phẩm mắm mực là *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium*; *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* với mức độ tương đồng về trình tự gen r16S RNA khá cao (trên 91%).

P.T.K.N, N.T.M.N

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Salminen S, Wright AV and Ouwehand A (2004), "Lactic acid bacteria Microbiological and Functional Aspect. 3rd ed"
- [2] Tanasupawat S, Okada S and Komagata K (1998), "Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand", J Gen Appl Microbiol (44), pp 193-200.
- [3] Abbott (2007), "16S rDNA gene sequencing for bacteria Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls", Clinical Microbiolog, 45 (9), pp 2761-2764.