

NGHIÊN CỨU QUẦN XÃ VI KHUẨN TRONG NEM CHUA BẰNG PHƯƠNG PHÁP KHÔNG PHỤ THUỘC VÀO NUÔI CẤY

Nguyễn Thị Lâm Đoàn^{1,*}, Van Hoorde Koenraad³, Cnockaert Margo³,
Lê Thanh Bình², Vandamme Peter³

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội

²Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

³Trường Đại Học Ghent, Bỉ, K.L. Ledeganckstraat 35, B- 9000, Gent, Belgium

*Email: nlddoan@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 21/9/2014; Chấp nhận đăng: 10/2/2015

TÓM TẮT

Phương pháp PCR điện di gel dài nồng độ biến tính (PCR –DGGE) đang được ứng dụng trong thời gian gần đây ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới để nghiên cứu hệ vi sinh vật trong thực phẩm. Trong công trình này PCR – DGGE được dùng để đánh giá sự đa dạng vi khuẩn trong nem chua và đặc biệt quan tâm tới chủng vi khuẩn hay gặp nhằm góp phần nghiên cứu chọn, tạo chủng khởi động cho sản xuất nem chua có chất lượng tốt và an toàn. DNA tổng số được tách chiết trực tiếp từ 10 mẫu nem chua, tiếp đó PCR của vùng biến đổi V3 16S rDNA được sử dụng cho phân tích DGGE. Kết quả phân tích cho thấy, trên điện di đồ DGGE nem chua Hà Nội và Thanh Hóa xuất hiện 53 băng khác nhau liên quan đến các loài vi sinh vật trong nem chua. Sau đó, 53 băng này được cắt, tinh sạch, xác định trình tự và so sánh với trình tự đã biết trong ngân hàng gen EMBL. Kết quả đã chỉ ra hầu hết vi khuẩn trong nem chua Hà Nội và Thanh Hóa là vi khuẩn lactic trong đó có các chi là *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* chỉ có hai chi *Macroccoccus*, *Psychrobacter* không thuộc vi khuẩn lactic. Kết quả cũng chỉ ra rằng trong các chi vi khuẩn lactic thì *Lactobacillus* có số lượng lớn nhất, chúng có vai trò đặc biệt quan trọng trong tạo hương, bacteriocin để đảm bảo chất lượng cũng như trong việc bảo quản nem chua.

Từ khóa: PCR điện di gel dài nồng độ biến tính, 16S rDNA, V3.

1. MỞ ĐẦU

Một trong những phương pháp phân tích vi sinh vật không phụ thuộc vào nuôi cấy là phương pháp điện di gel dài nồng độ biến tính (PCR – DGGE) sản phẩm PCR vùng biến đổi (V) của 16S rDNA từ DNA tổng số. Phương pháp này đang được ứng dụng trong thời gian gần đây ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới để nghiên cứu thành phần loài và xác định tính chất của hệ vi sinh vật trong thực phẩm [1, 2, 3, 4, 5]. Trong nghiên cứu vi sinh vật việc xác định loài là bước quan trọng để có thể biết được các đặc tính cũng như các ứng dụng của chúng. Nhiều năm qua bằng phương pháp phân loại truyền thống, các loài vi sinh vật được phân loại dựa trên các

đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa. Tuy nhiên, các phương pháp này có hạn chế vì hầu hết các loài vi sinh vật không dễ dàng được phân lập và nuôi cấy. Theo ước tính chỉ có khoảng hơn 1% các vi sinh vật có thể nuôi cấy được [6]. Trong những năm gần đây, nhờ sự phát triển của các phương pháp mới, tiên tiến việc xác định các loài vi sinh vật trở lên hiệu quả và nhanh chóng. Một trong các phương pháp đó là PCR- DGGE đã được sử dụng để quan sát động thái của vi khuẩn trong quá trình lên men bánh mì ở Mexicô [7, 1], lên men xúc xích Ý [8, 9], phomat [10, 11, 12, 13]. Hơn thế nữa, DGGE cho phép phân tích đồng thời nhiều mẫu và so sánh quần thể vi sinh vật dựa vào sự khác nhau về địa lí [14]. Nem chua là sản phẩm thịt lên men cổ truyền của Việt Nam được chế biến chủ yếu từ thịt lợn nạc cùng với một số gia vị và phụ gia. Bản chất của quá trình lên men là sự chuyển hóa đường thành axit lactic nhờ hoạt động của nhóm vi khuẩn tự nhiên. Nem chua cung cấp cho cơ thể một lượng lớn vi khuẩn lactic có lợi giúp ổn định hệ vi sinh vật đường ruột và kích thích tiêu hóa. Nem chua có mặt ở hầu khắp các tỉnh thành trong cả nước, tùy theo vùng miền có thể khác nhau đôi chút về công thức, loại gia vị, nhưng nhìn chung vẫn được chế biến theo một quy trình khá thống nhất. Mục đích của nghiên cứu này là sử dụng phương pháp PCR- DGGE để phân tích vùng biến đổi V3 16S rDNA cho việc đánh giá sự đa dạng vi khuẩn trong nem chua và đặc biệt quan tâm tới chủng vi khuẩn hay gặp nhằm góp phần nghiên cứu chọn, tạo chủng khởi động cho sản xuất nem chua có chất lượng tốt và an toàn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

10 mẫu nem chua được thu thập tại các hộ gia đình ở hai thành phố Hà Nội và Thanh Hóa. Các mẫu nem chua đã lên men hai ngày, bắt đầu được bán trên thị trường. Các mẫu ký hiệu DP4, DP5, DP6, DP7 là nem chua được thu thập tại các hộ gia đình ở làng Phùng – Hà Nội, DV4, DV5, DV6 là mẫu được thu thập tại các hộ gia đình ở làng Vẽ- Hà Nội, và DH5, DH6, DH7 mẫu được thu thập tại Thanh Hóa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị mẫu thực phẩm

Để tách chiết DNA tổng số, mỗi mẫu nem chua cân 25 gram cho vào túi vô trùng, thêm 225 ml dung dịch MRD (Maximum recovery diluent, CM0733) đồng hóa bằng máy Stomacher lab-blender trong 2 phút. Sau khi đồng hóa, từ mỗi mẫu lấy 50 ml ly tâm ở tốc độ 13000 v/p tại 4 °C trong 10 phút, loại bỏ dịch nổi, toàn bộ tế bào thu được rửa với dung dịch đệm 1× TE (10 mM Tris base, 1 mM EDTA) và bảo quản ở - 20 °C.

2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA tổng số được thực hiện như mô tả của Pitcher và cs [15], tế bào hòa tan trong 150 µl dung dịch lysozyme [5 mg lysozyme (28262, SERVA, Heidelberg, Germany) trong 130 µl 1× TE và 20 µl dung dịch mutanolysin (5000 U/ml) (Sigma Aldrich)] ở 37 °C trong 1 giờ. Để tăng cường phân giải tế bào, 500 µl dung dịch GES (Guanidium – thiocyanate – EDTA – sarkosyl) được bổ sung vào, hỗn hợp này được để trong đá 10 phút, thỉnh thoảng lắc đều. Sau đó thêm 250 µl NH₄Ac (7,5 M), lắc đều và tiếp tục để trong đá 10 phút để tăng cường kết tủa protein, bổ sung 500 µl chloroform/iso – amylic alcohol (24/1), lắc nhẹ và ly tâm ở tốc độ 13000 v/p trong 20 phút. Kết quả tạo thành 3 lớp: lớp trên cùng là axit nucleic lớp thứ hai là protein và

lớp thứ 3 là chloroform. Lấy 700 μl của lớp trên cùng chuyển sang ống Eppendorf mới, thêm 378 μl isopropanol lạnh, axit nucleic sẽ kết tủa. Axit nucleic được tách bằng ly tâm tốc độ 13000 v/p trong 10 phút và rửa 2 lần với 150 μl dung dịch ethanol lạnh 70 % để loại bỏ isopropanol và tiếp tục ly tâm với tốc độ 13000 v/p trong 1 phút loại bỏ ethanol. Axit nucleic được làm khô và sau đó hòa tan trong 100 μl dung dịch đệm TE để 24 giờ ở 4 °C, thêm 5 μL RNase (250 mg/ml) (34390, SERVA) giữ ở 37 °C trong 1 giờ để loại bỏ RNA. Kiểm tra chất lượng và độ tinh sạch của DNA tổng số bằng cách lấy 5 μL DNA tổng số trộn với 2 μL loading dye (4 g sucrose và 2,5 mg bromophenol blue hòa tan trong 6 mL đệm TE) chạy điện di trên 1 % w/v agarose trong 45 phút ở điện thế 75 V.

2.2.3. Phương pháp khuếch đại PCR cho DGGE

Mồi xuôi 357f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') và mồi ngược 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Sigma Aldrich) được dùng để nhân một đoạn khoảng 194 bp vùng biến đổi V3 của 16S rDNA [16]. Kẹp GC (GC clamp) (5' -GCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG -3') [17] được bổ sung vào mồi 357f để tránh các mạch kép DNA xoắn hoàn toàn thành mạch đơn trong DGGE [18]. Các phản ứng được tiến hành với DNA không pha loãng [17] và chương trình chạy touchdown PCR [19] được sử dụng máy MyCycler™ thermocycler (Bio-Rad, California, USA). 50 μL PCR gồm 6 μL của 10x PCR buffer (15mM MgCl_2), 2,5 μl bovine serum albumin, 2,5 μL deoxynucleoside triphosphates (2mM của mỗi loại dNTP), 2 μL của mỗi mồi (5 μM), 0,25 μL Taq polymerase (5U/ μl), 33,75 μL nước cất thanh trùng và 1 μl của dung dịch ADN.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách lấy 5 μl sản phẩm với 2 μl của loading dye, điện di trên gel agarose 1 % ở 75 V trong 45 phút, marker sử dụng là SmartLadder, Eurogentec, Searing, của Bỉ.

2.2.4. Phương pháp phân tích DGGE

Sản phẩm PCR được phân tích trên gel DGGE dựa trên mô tả của Muyzer và các cộng sự [20] theo đó gel polyacrylamide có kích thước (160 x 160 x 1mm) bao gồm 8 % (v/v) polyacrylamide (National Diagnostics, Atlanta,) trong dung dịch đệm 1xTAE (Bio-Rad), và sử dụng nồng độ biến tính là từ 35 % - 60 %. Điện di thực hiện trong 16 giờ ở 60 °C, dòng điện 70 V, dung dịch đệm 1x TAE. Gel nhuộm bằng thuốc nhuộm SYBR gold trong 30 phút và mẫu được chụp bằng máy Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Eke, Belgium).

Marker được thiết kế bao gồm sản phẩm nhân lên của vùng biến đổi V3 16S rDNA từ 9 chủng được lấy từ phòng thí nghiệm BCCM/LMG Bacteria Collection, Ghent University, Belgium. Trong mỗi gel thì marker này được lặp lại từ 2 đến 3 lần để các băng thu được có thể được chuẩn hóa nhờ sử dụng chương trình Bionumeric version 5.1 (Applied Maths).

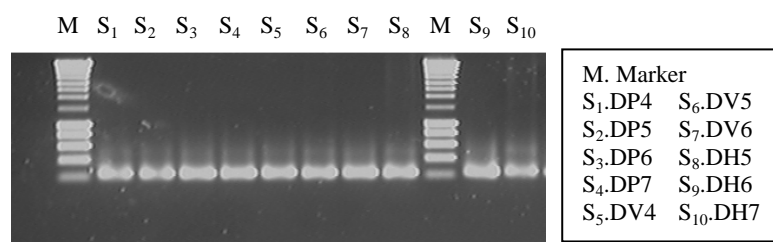
2.2.5. Phương pháp xác định trình tự V3 16S rDNA

Các băng đại diện được lấy khỏi gel acrylamide bằng cách dùng đầu tít cắm vào gel và lấy một ít băng đó cho vào ống Eppendorf có 40 μl 1x TE buffer để hòa tan DNA qua đêm ở 4 °C. DNA tách chiết từ các băng sẽ được nhân lên như miêu tả ở phần 2.2.3, nhưng chỉ khác là mồi 357f (không có kẹp GC) được sử dụng và xác định trình tự [21]. Trình tự ADN này sẽ được so sánh với ngân hàng trình tự nucleotide quốc tế (EMBL) nhờ sử dụng chương trình Blast để xác định loài có mối liên quan gần nhất.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA của 10 mẫu

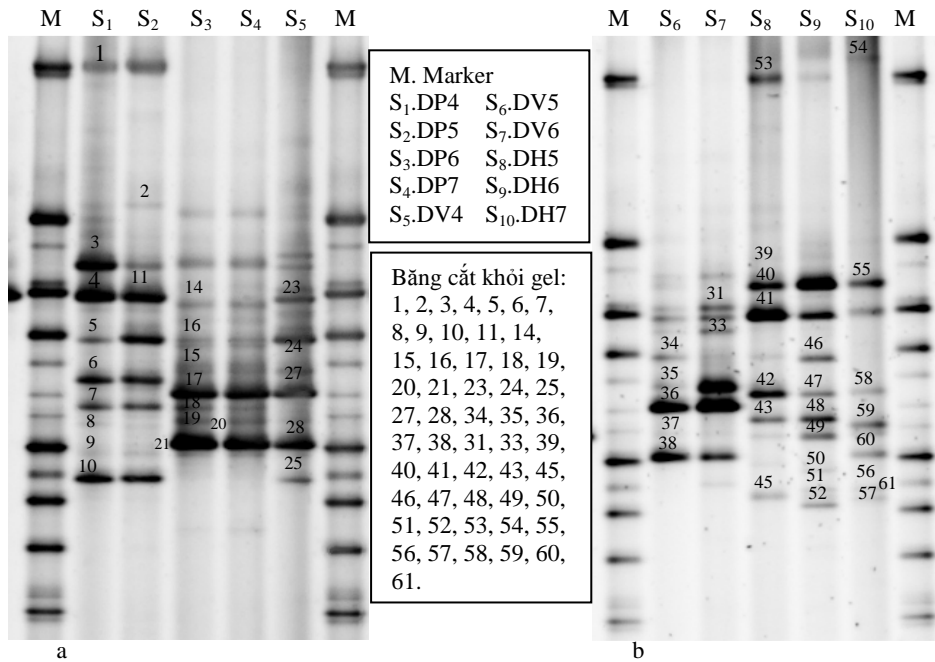
Sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA của DNA tổng số tách chiết từ 10 mẫu nem chua được chạy điện di trên gel agarose 1 % và kết quả thể hiện ở Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu 10 băng rất đậm khoảng 200 bp tương ứng với kích thước của đoạn V3 16S rDNA [16]. Các băng này đều có cùng kích thước giống nhau nhưng chỉ khác nhau về trình tự. Kết quả ở Hình 1 cho thấy tách chiết DNA tổng số và nhân lên vùng biến đổi vùng V3 16S rDNA của 10 mẫu nem chua là tốt.



Hình 1. Sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA của 10 mẫu trên gel agarose 1%.

3.2. Gel DGGE sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA của 10 mẫu nem chua

Những loài vi khuẩn khác nhau có cùng kích thước vùng biến đổi V3 16S rDNA nhưng khác nhau về thành phần base pair có thể nhận biết sự khác biệt của chúng bởi PCR – DGGE. Do đó việc phân tích sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA đã được sử dụng để xác định loài vi khuẩn trong thực phẩm [11, 4, 5] mỗi loài sẽ có vị trí những băng khác nhau trên gel DGGE, và sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16 S rDNA của 10 mẫu sẽ được tách biệt trên gel DGGE (Hình 2a, b).



Hình 2a, b. Gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA của quần thể vi khuẩn từ 10 mẫu nem chua.

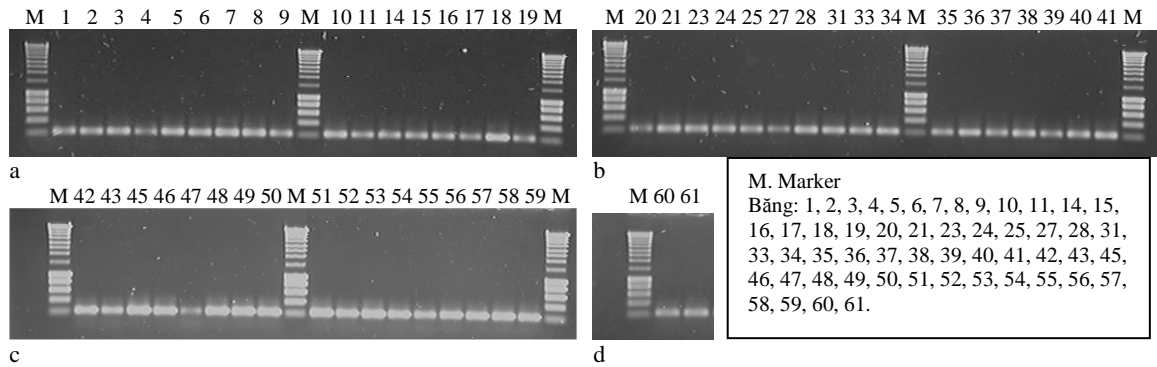
Kết quả phân tích DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA cho thấy 10 mẫu nem chua cho một loạt các băng khác nhau liên quan đến các loài vi khuẩn đại diện trong mẫu (Hình 2a,b). Như vậy, nem chua Hà Nội và Thanh Hóa có thành phần hệ vi khuẩn rất đa dạng. Theo đánh giá sơ bộ, có đến vài chục loài vi khuẩn có mặt trong nem chua. Việc xác định chính xác các loài này có thể đạt được bởi cắt, tinh sạch và giải trình tự các băng đó.

Từ gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA của 10 mẫu nem chua các băng đại diện được cắt như sau: mẫu nem chua DP4 (9 băng được cắt kí hiệu 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), DP5 (2 băng được cắt kí hiệu 2,11), DP6 (8 băng được cắt kí hiệu 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21), DV4 (5 băng được cắt kí hiệu 23, 24, 25, 27, 28), DV5 (5 băng được cắt kí hiệu 34,35, 36, 37, 38), DV6 (2 băng được cắt kí hiệu 31,33), DH5 (7 băng được cắt kí hiệu 39, 40, 41, 42, 43, 45, 53), DH6 (7 băng được cắt kí hiệu băng 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52), DH7 (8 băng được cắt kí hiệu 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61). Hình 2a cho thấy các băng trong mẫu DP7 có các băng giống với các băng trong mẫu DP6. Do đó không tiến hành cắt băng trong mẫu nem chua DP7. Như vậy, từ gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA của 10 mẫu nem chua cắt được 53 băng.

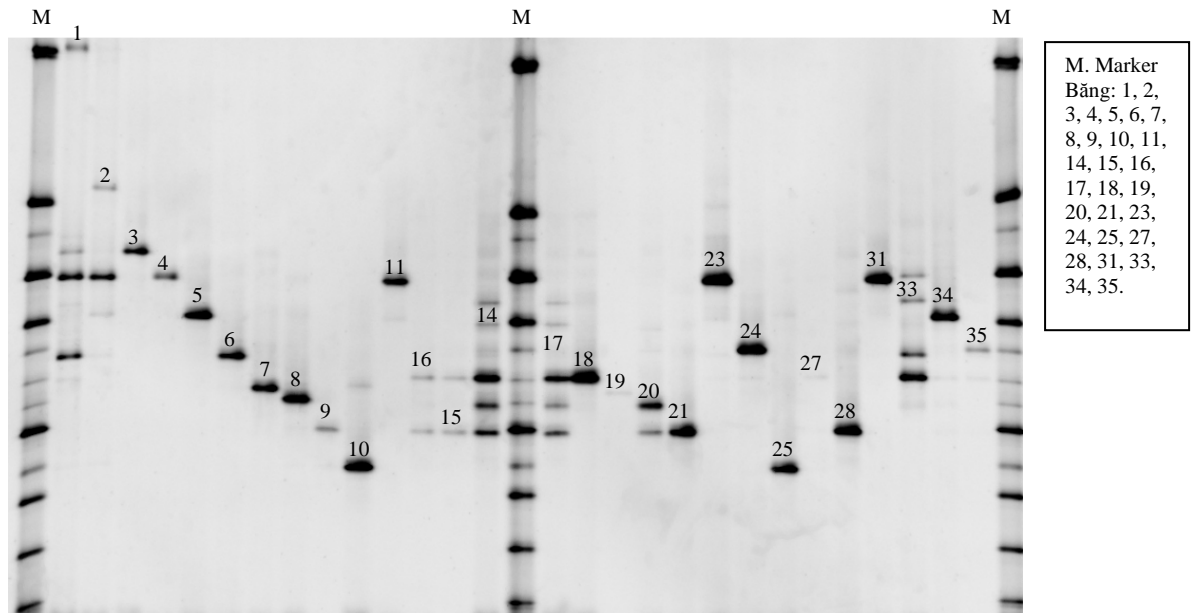
3.3. Gel DGGE của sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA của 53 băng

Trước khi xác định trình tự vùng biến đổi V3 16S rDNA, để có thể xác định chính xác vị trí của các băng trong các mẫu nem chua đã được cắt từ gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA có trùng với vị trí của chúng trong gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA ban đầu của 10 mẫu nem chua hay không, 53 băng được cắt từ gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA ban đầu của 10 mẫu nem chua sẽ được khuếch đại lại vùng V3 16S rDNA như miêu tả trong phần 2.23. Kết quả khuếch đại được kiểm tra trên gel agarose 1 % cho thấy 53 băng này cũng có kích thước là 200 bp (Hình 3 a.b.c.d) tương ứng với kích thước của vùng biến đổi V3 16S rDNA [16].

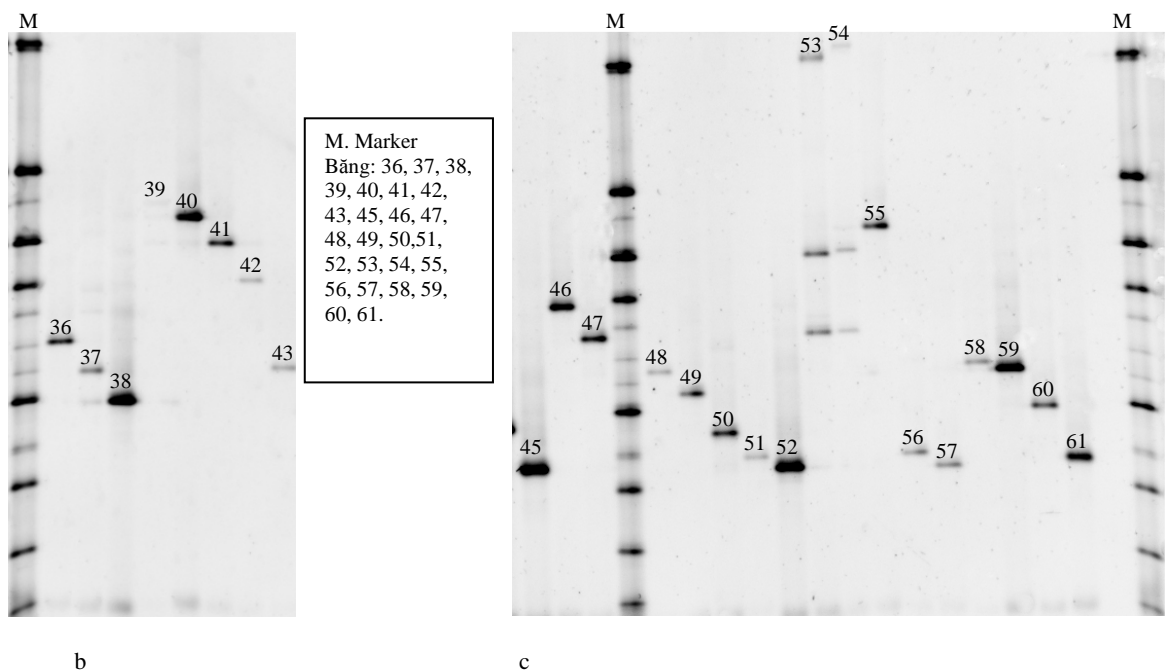
Sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA này được chạy điện di trên gel DGGE như mô tả trong phần 2.2.4. Kết quả phân tích gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA cho thấy 53 băng này (Hình 4 a.b.c.d) đều có vị trí như vị trí của chúng trong gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA ban đầu (Hình 2a.b).



Hình 3a.b.c. d. Sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA của 53 băng trên gel agarose 1 %.



Hình 4a. Gel DGGE của 53 băng được cắt từ gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA ban đầu của 10 mẫu nem chua.



Hình 4.b.c. Gel DGGE của 53 băng được cắt từ gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA ban đầu của 10 mẫu nem chua.

3.4. Giải trình tự DNA vùng biến đổi V3 16S rDNA của 53 băng và xác định loài

Để có thể nắm rõ hơn thành phần loài vi khuẩn trong 10 mẫu nem chua, 53 băng được cắt từ gel DGGE vùng biến đổi V3 16S rDNA (ở Hình 4a. b. c). 53 băng này được tinh sạch và khuếch đại như miêu tả trong phần 2.2.3 chỉ khác là lúc này sẽ sử dụng mồi 375f không có kẹp GC (GC clamp) (5' -GCCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG -3'). Sản phẩm PCR vùng biến đổi V3 16S rDNA được tinh sạch và giải trình tự để xác định loài. Trình tự vùng biến đổi V3 16S rDNA này được so sánh với ngân hàng trình tự nucleotide quốc tế (EMBL) bằng chương trình BLAST để xác định các loài có mối liên quan gần nhất. Kết quả trình bày ở Bảng 1.

Phân tích vùng biến đổi V3 16S rDNA bởi DGGE cho thấy quần thể vi khuẩn sinh trưởng trong các mẫu nem chua chủ yếu là vi khuẩn lactic với 48 trong số 53 băng (chiếm tới 90,6 %), bao gồm các chi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*. Trong các chi lactic thì *Lactobacillus* có số lượng lớn nhất với 31 băng trong số 48 băng (chiếm 64,6 %), chúng có vai trò thủy phân protein của thịt trong quá trình lên men quyết định tính chất cơ lí và chất lượng cảm quan của nem chua. Kết quả này cũng tương tự của Fadda và cộng sự [22] cho rằng một số loài *Lactobacillus* phân lập từ xúc xích lên men có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường thịt và thủy phân tốt protein. Ngoài ra, kết quả ở Bảng 1 cũng cho thấy trong số các loài thuộc *Lactobacillus* thì loài *Lb. plantarum* chiếm tỷ lệ cao nhất. *Lb. plantarum* vừa có khả năng sinh axit mạnh, vừa có khả năng sinh enzyme thủy phân tốt protein [23]. Do đó loài *Lb. plantarum* thường được tuyển chọn để sản xuất giống khởi động cho thực phẩm lên men. Ngoài ra, trong chi *Lactobacillus* còn có các loài *Lb. brevis*, *Lb. pentosus*, *Lb. fermentum*, chi *Pediococcus* có *P. Pentosaceu* và *P. acidilactici* và loài *Lactococcus lactis* cũng thường được sử dụng làm giống khởi động cho các sản phẩm thịt lên men [24]. Các loài

này không chỉ tạo ra axit lactic mà còn tạo ra chất kháng khuẩn sinh học bacteriocin giúp cho các sản phẩm thịt lên men kéo dài thời gian sử dụng. Đã có những công bố phát hiện bacteriocin (pediocin) được tổng hợp từ loài *P. acidilactici* làm giảm số lượng của *Listeria monocytogenes* của thịt tươi [25].

Ngoài ra, kết quả còn chỉ ra trong nem chua có loài *Lb. helveticus*, đây là loài tạo axit mạnh làm phomat chín, lần đầu tiên được tìm thấy từ phomat của Thụy Sĩ [26] và loài *Lb. mindensis* có tác dụng đối với chất lượng của bột trong quá trình sản xuất bánh mì [27]. Chi *Macrocooccus*, tiêu biểu là loài *Macrocooccus caseolyticus* cũng được phát hiện trong nem chua Hà Nội và Thanh Hóa. Chi này có mối quan hệ gần nhất với chi *Staphylococcus*, nhưng các loài thuộc chi *Macrocooccus* không gây bệnh cho người và động vật và chúng thường được phân lập trên da của động vật hoặc từ thực phẩm như sữa và thịt [3]. Cuối cùng là sự hiện diện của chi *Psychrobacter* trong nem chua. Chi này trước đây chỉ thường được tìm thấy trong nguồn thực phẩm khác nhau như gia cầm, cá và các sản phẩm thịt [28].

Bảng 1. Xác định loài của 53 băng trong 10 mẫu nem chua.

Băng	Loài có mối quan hệ gần nhất	% ID	Accession no.
Band 4	<i>Lb. plantarum</i>	97	GU292429.1
Band 11	<i>Lb. plantarum</i>	99	GU292429.1
Band 31	<i>Lb. plantarum</i>	98	GU292429.1
Band 41	<i>Lb. plantarum</i>	98	GU292429.1
Band 2	<i>Lb. plantarum</i>	98	GU292429.1
Band 23	<i>Lb. plantarum</i>	97	GU138591.1
Band 53	<i>Lb. plantarum</i>	93	GU292429.1
Band 1	<i>Lb. plantarum</i>	92	GU292429.1
Band 38	<i>Lb. mindensis</i>	98	GU138543.1
Band 9	<i>Lb. mindensis</i>	98	GU138543.1
Band 21	<i>Lb. mindensis</i>	98	GU138543.1
Band 28	<i>Lb. mindensis</i>	98	GU138543.1
Band 60	<i>Lb. mindensis</i>	98	GU138543.1
Band 15	<i>Lb. mindensis</i>	98	GU138543.1
Band 14	<i>Lb. helveticus</i>	100	GU138588.1
Band 16	<i>Lb. helveticus</i>	97	GU138588.1
Band 17	<i>Lb. helveticus</i>	100	GU138581.1
Band 18	<i>Lb. helveticus</i>	100	GU138578.1
Band 36	<i>Lb. helveticus</i>	100	GU138588.1
Band 33	<i>Lb. helveticus</i>	99	GU138588.1
Band 27	<i>Lb. helveticus</i>	100	GU138581.1
Band 34	<i>Lb. fermentum</i>	98	GU213430.1
Band 42	<i>Lb. fermentum</i>	98	GU213430.1
Band 6	<i>Lb. brevis</i>	100	GU295951.1

Band 47	<i>Lb.brevis</i>	97	<u>GU295951.1</u>
Band 45	<i>Lb. acidipiscis</i>	98	<u>AB326356.1</u>
Band 61	<i>Lb. acidipiscis</i>	96	<u>AB326356.1</u>
Band 20	<i>Lb. crispatus</i>	94	<u>FJ557001.1</u>
Band 37	<i>Lb. acidophilus</i>	94	<u>FJ557000.1</u>
Band 39	<i>Lb.pentosus</i>	99	<u>GU253891.1</u>
Band 59	<i>Lb.salivarius</i>	98	<u>AB425937.1</u>
Band 25	<i>Lc. lactis</i>	98	<u>FJ851688.1</u>
Band 10	<i>Lc. lactis</i>	98	<u>FJ851688.1</u>
Band 56	<i>Lc. lactis</i>	99	<u>FJ851688.1</u>
Band 51	<i>Lc. lactis</i>	97	<u>CP001834.1</u>
Band 57	<i>Lc. lactis</i>	97	<u>FJ429979.1</u>
Band 40	<i>Lc. garvieae</i>	98	<u>GQ850376.1</u>
Band 3	<i>Lc. garvieae</i>	99	<u>GQ850376.1</u>
Band 55	<i>Lc. garvieae</i>	94	<u>GQ850376.1</u>
Band 43	<i>P.pentosaceus</i>	100	<u>AB481102.1</u>
Band 8	<i>P.pentosaceus</i>	100	<u>AB481102.1</u>
Band 52	<i>P.acidilactici</i>	98	<u>GU222445.1</u>
Band 5	<i>Leuc. citreum</i>	99	<u>GU138585.1</u>
Band 24	<i>Leuc. fallax</i>	97	<u>EU439432.1</u>
Band 35	<i>Leuc. fallax</i>	97	<u>EU439432.1</u>
Band 49	<i>Vagococcus fluvialis</i>	99	<u>GQ337040.1</u>
Band 50	<i>E. termitis</i>	98	<u>AM039968.1</u>
Band 54	<i>W. cibaria</i>	98	<u>FJ429988.1</u>
Band 7	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	100	<u>GU197537.1</u>
Band 48	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	96	<u>GU197537.1</u>
Band 58	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	98	<u>GU197537.1</u>
Band 19	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	97	<u>GU197537.1</u>
Band 46	<i>Psychrobacter faecalis</i>	100	<u>FJ542330.1</u>

4. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật PCR- DGGE đã xác định được hệ vi khuẩn trong nem chua Hà Nội và Thanh Hóa bao gồm 9 chi, trong đó có 7 chi thuộc vi khuẩn lactic là *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Weissle*. Đây là những nhóm phổ biến và quan trọng đặc biệt là *Lactobacillus* đóng vai trò chủ yếu trong quá trình phân hủy protein, lipid của thịt, sinh axit và tổng hợp bacteriocin ... Để hình thành các hợp chất tạo hương vị đặc trưng cho nem chua và góp phần kéo dài thời gian sử dụng. Hai chi *Macrocooccus* và *Psychrobacter* cũng phát hiện có trong hai loại sản phẩm nem chua của Hà Nội và Thanh Hóa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Meroth C., Walter J., Hertel C., Brendt M and Hammes W. - Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology* **69** (2003) 475–482.
2. Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P. and Huys, G. - Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses, *Food Microbiol.* **25** (2008) 929-935.
3. Baba T., Arai K. K., Uchiyama I., Takeuchi F., Ito T and Hiramatsu K. - Complete Genome Sequence of *Macrococcus caseolyticus* Strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic *Staphylococci*, *Journal of Bacteriology* **16** (2009) 1180–1190.
4. Nguyen T. L. D., Van Hoorde K., Cnockaert M., De Brandt E., De Bruyne K., Le T. B., Vandamme P. - A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product, *Food Research International* **50** (2013) 232–240.
5. Nguyen T. L. D., Van Hoorde K., Cnockaert M., De Brandt E., Aerts M., Le T. B., Vandamme P. - A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam, *International Journal of Food Microbiology* **163** (2013) 19–27.
6. Amann R. I., Ludwig W and Schleifer. K. H. - Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.* **59** (1995) 143–169.
7. Ben N. and Ampe F. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol, *Applied and Environmental Microbiology* **66** (2000) 3664–3673.
8. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Urso R., Cantoni C. and Comi G. - Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods, *Applied and Environmental Microbiology* **70** (2004) 1883– 1894.
9. Cocolin L., Manzano M., Cantoni C. and Comi G. - Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages, *Applied and Environmental Microbiology* **67** (2001) 5113– 5121.
10. Ercolini D., Hill P.J. and Dodd C.E.R. - Bacterial communities structure and location in Stilton cheese, *Applied and Environmental Microbiology* **69** (2003) 3540–3548.
11. Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G. and Coppola S. - Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis, *Curr. Microbiol.* **42** (2001a) 199– 202.
12. Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G. and Coppola S. - The potential of a polyphasic PCR–DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses, *Syst. Appl. Microbiol.* **24** (2001b) 610– 617.

13. Randazzo C. L., Torriani S., Akkermans A. D. L., de Vos W and Vaughan E. - Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis, *Applied and Environmental Microbiology* **68** (2002) 1882–1892.
14. Muyzer G., Brinkhoff T., Nubel U., Santegoeds C. and Waver C. - Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology, *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands **73** (1998) 1 – 27.
15. Pitcher D. G., Saunders N. A. and Owen R. J. - Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanates, *Letters in Applied Microbiology* **8** (1989) 151–156.
16. Yu Z and Morrison M. - Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology* **708** (2004) 4800–4806.
17. Temmerman R., Scheirlinck I., Huys G. and Swings J. - Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology* **691** (2003) 220–226.
18. Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S. and Myers R.M. - Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes, *Proc. Natl. Acad. Sci* **861** (1989) 232–236.
19. Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K and Mattick J.S. - ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, *Nucleic Acids Res.* **1914** (1991) 4008.
20. Muyzer G and de Waal E. C. - Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactions-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology* **59** (1993) 650–700.
21. Vancanneyt M., Naser S. M., Engelbeen K., De Wachter M., Van der Meulen R., Cleenwerck I., Hoste B., De Vuyst L. and Swings J. - Reclassification of *Lactobacillus brevis* strains LMG 11494 and LMG 11984 as *Lactobacillus parabrevis* sp. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **567** (2006) 1553–1557.
22. Fadda S., Vignolo G and Holgado A. - Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry cured sausages on muscle sarcoplasmic proteins, *J. Meat Sciences* **49** (1998) 11-18.
23. Fadda S and Sanz Y. - Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*, *Journal Applied and Environmental Microbiology* **65** (1999) 3540-3546.
24. Hugas M., Garriga M., Aymerich T., and Monfort J. M. - Biochemical characterization of *lactobacilli* from dry fermented sausages, *International Journal of Food Microbiology* **18** (1993) 107-113.
25. Nielsen J. W., Dickson J. S. and Crouse J. D. - Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat, *Applied and Environmental Microbiology* **56** (1990) 2142-2145.

26. Madkor S. A., Tong P. S and Soda M. E. - Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of *Lactobacilli*, Journal of Dairy Science **83** (2000) 1684-1691.
27. Matthias A., Martin R. A and Vogel R. F. - Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53** (2003) 7–13.
28. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Psychrobacter>

ABSTRACT

STUDYING ON BACTERIAL COMMUNITY IN FERMENTED FOODS BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (PCR - DGGE)

Nguyen Thi Lam Doan^{1*}, Van Hoorde Koenraad³, Cnockaert Margo³, Le Thanh Binh²,
Vandamme Peter³

¹*Faculty of Food Science and Technology, VNUA, Trauquy - Gialam, Hanoi, Vietnam*

²*Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

³*Department of Biochemistry and Microbiology, Gent University, K.L. Ledeganckstraat 35,
B-9000 Gent, Belgium*

*Email: nlddoan@yahoo.com

Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) fingerprinting was recently introduced into food microbiology. PCR – DGGE were used to investigate bacterial communities developed in Hanoi and Thanhhoa nem chua. Total microbial DNAs were extracted directly from 10 nem chua samples. PCR of V3 16S rDNAs were subjected to DGGE analysis. The results have showed that 10 nem chua samples have different bands involved to microbial species in nem chua. 53 bands were collected. Then, these bands were cut, purified, sequenced and compared to known sequence database in EMBL bank. The results indicated that there are mostly belong to lactic acid bacteria such as genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, remains only two as *Macroccoccus* and *Psychrobacter* found in Hanoi and Thanhhoa nem chua. The results also indicated *Lactobacillus* are mainly member in nem chua and they play especially important role in producing specific aroma, bacteriocin to improve the quality and preservation of nem chua as well.

Keywords: PCR-DGGE, 16S rDNA, V3.