

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH SINH LÝ VÀ ĐỊNH TÊN CHŨNG VI KHUẨN ƯA MẶN SINH TỔNG HỢP CANTHAXANTHIN CAO

*Đỗ Thị Thủy Lê¹, Nguyễn Mạnh Đạt¹, Bùi Thị Hồng Phương¹,
Đỗ Thị Thanh Huyền², Nguyễn Thị Hồng Linh²*

Canthaxanthin (β,β -Carotene-4,4'-dione) là carotenoid màu đỏ cam thuộc nhóm xanthophyll. Canthaxanthin có khả năng tăng cường màu sắc cho cá hồi, chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, có lợi cho sức khỏe con người. Vi khuẩn ưa mặn là nhóm vi sinh vật với số lượng chủng lớn nhất có khả năng sinh tổng hợp canthaxanthin. Bộ sưu tập giống - Viện Công nghiệp thực phẩm rất phong phú và đa dạng, bao gồm các chủng vi khuẩn ưa mặn được phân lập từ chượp cá, đất của cánh đồng muối. Chủng VTP20181 là chủng vi khuẩn ưa mặn có khả năng sinh tổng hợp canthaxanthin, đã được sơ tuyển từ Bộ sưu tập giống - Viện Công nghiệp thực phẩm. Chúng tôi đã xác định đặc tính sinh lý, định được tên chủng là *Paracoccus carotinificiens* VTP20181, hàm lượng canthaxanthin trong sinh khối khô đạt 530,01 $\mu\text{g/g}$. Đây là chủng có tiềm năng, có thể áp dụng sản xuất canthaxanthin quy mô công nghiệp, ứng dụng làm thức ăn cho cá hồi.

Từ khóa: *Vi khuẩn ưa mặn, Paracoccus carotinificiens, canthaxanthin.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Canthaxanthin được tìm thấy trong tự nhiên ở một số loài thực vật, vi sinh vật, tảo, giáp xác... Cá không có khả năng tự sinh tổng hợp carotenoid nhưng có khả năng tích lũy các chất này trong cá khi chúng ăn các loại trên. Đó là do cá có khả năng vận chuyển và giữ chất màu này ở các vị trí đặc hiệu trong thịt cá, giống như phân tử canthaxanthin tích lũy tự nhiên. Canthaxanthin từ thức ăn đi vào cá đem lại chất lượng cho cá thực phẩm nhờ chức năng chống oxy hóa như chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, rất có lợi cho sức khỏe con người (Baker, 2001).

Vi khuẩn ưa mặn thường được phân lập từ đất của những cánh đồng muối. Asker và Ohta (Asker và Ohta, 1999) đã phân lập 31 chủng vi khuẩn rất ưa mặn *Halobacterium* từ cánh đồng muối vùng Alexandria, Ai Cập. Trong số các chủng ưa mặn này, có chủng được phát hiện có khả năng sinh tổng hợp carotenoid cao đạt 2,06 mg/g sinh khối khô (bao gồm 0,06 mg/g β -caroten & 0,70 mg canthaxanthin/g sinh khối khô). Từ đó, các chủng vi khuẩn ưa mặn ngày càng được chú ý và tập trung nghiên cứu như một đối tượng sản xuất canthaxanthin hiệu quả. Nhiều chủng vi

¹TS. Viện Công nghiệp thực phẩm

²ThS. Viện Công nghiệp thực phẩm

Email:ledtt@firi.vn

Ngày gửi bài: 1/9/2019

Ngày phản biện đánh giá: 20/11/2019

Ngày đăng bài: 30/12/2019

khuẩn ưa mặn đã được ghi nhận có khả năng sinh tổng hợp canthaxanthin như: *Micrococcus roseus* (Cooney và cs, 1966), *Bradyrhizobium* (Hannibal và cs, 2000), *Dietzia natronolimnaea* (Khodaiyan và cs, 2007), *Rhodobacter sphaeroides* (Chen và cs, 2006), *Marinococcus*, *Planococcus*, *Paracoccus schoinia* NBRC 100637, *Paracoccus* sp NBRC 101723 (Takaichi và cs, 2006). Rất nhiều patent đã công bố về khai thác vi khuẩn ưa mặn thuộc chi *Paracoccus* cho sản xuất canthaxanthin (Tanaka và cs, 2013).

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng giống và môi trường

- Chủng VTP20181 phân lập từ đất ruộng muối vùng Diêm Điền, Thái Bình thuộc bộ sưu tập giống của Bộ môn Công nghệ Enzyme & Protein, Viện Công nghiệp thực phẩm. Chủng đã được đánh giá sơ bộ khả năng sinh tổng hợp canthaxanthin bằng phương pháp TLC.

- Môi trường thạch LB cho chủng vi khuẩn ưa mặn: Tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 17 g/l, agar 15 g/l.

2.2. Phương pháp

2.2.1 Phương pháp quan sát hình thái vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram [Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 1979]

Lấy 1 vòng que cấy sinh khối chủng VTP20181 bổ sung vào ống nghiệm chứa 5ml môi trường LB lỏng cho vi khuẩn ưa mặn, nuôi ở nhiệt độ 30⁰C sau 24 giờ, lấy dịch soi hình thái tế bào và nhuộm gram.

2.2.2. Phương pháp phân tích canthaxanthin bằng HPLC [Vo Xuan Hoai và cs, 2014]

Sinh khối vi khuẩn được chiết tách bằng phương pháp tán siêu âm đầu dò để phá vỡ màng tế bào với hệ dung môi thích hợp là chloroform-methanol (2:1, tt/tt), hiệu suất chiết đạt khoảng 95%. Canthaxanthin được định lượng bằng phương pháp HPLC sử dụng cột pha đảo C18 với hệ dung môi phân tích là acetonitril- methanoldichloromethan (70:20:10, tt/tt/tt) bổ sung amonium acetat 10 mM với thời gian phân tích là 4,58 phút.

2.2.3. Phân tích trình tự và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Trình tự của ADNr 16S được phân tích sử dụng phần mềm CLUSTAL W ver 1.83 của Thompson và cộng sự [Thompson và cs, 1997]. Các trình tự tham khảo dùng trong nghiên cứu cây phát sinh chủng loại được lấy từ dữ liệu của DDBJ, EMBL, GenBank. Cây phát sinh được xây dựng theo Kimura [Kimura, 1980], sử dụng phương pháp của Saitou và Nei [Saitou và Nei, 1987].

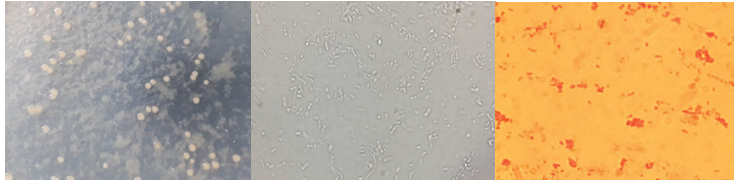
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhuộm gram chủng VTP20181

Dịch sau hoạt hóa mô tả ở mục 2.2.1 dùng để quan sát hình thái tế bào, tế bào nhuộm gram. Dịch hoạt hóa được pha loãng và ria trên đĩa thạch LB cho vi khuẩn ưa mặn, nuôi ở nhiệt độ 30⁰C, sau 3-5 ngày theo dõi hình thái khuẩn lạc.

Quan sát đặc điểm hình thái tế bào và tế bào nhuộm gram chủng VTP20181

trên kính hiển vi có độ phóng đại 100 lần tìm được: Tế bào hình que, kích thước $1 \div 1.5 \mu\text{m}$, là vi khuẩn Gram (-). Hình thái khuẩn lạc tròn, bóng, mép nhẵn, màu hồng nhạt.



Hình 1: Hình thái khuẩn lạc, tế bào, tế bào nhuộm gram chủng VTP20181

3.2. Đánh giá khả năng chịu mặn của chủng VTP20181

Tiến hành lên men chủng VTP20181 trên môi trường LB lỏng có bổ sung NaCl với nồng độ khác nhau: 1,7%, 2%, 5%, 10%. Đánh giá khả năng phát triển sau 3 ngày nuôi cấy.

Bảng 1. Đánh giá khả năng ưa mặn của chủng VTP20181

Nồng độ NaCl (%)	1,7	2	5	7
Khả năng phát triển	+	+	±	-

(Ghi chú: - không phát triển, ± phát triển yếu, + phát triển. Tế bào chết được xác định bằng nhuộm xanh methylen, đếm tế bào chết bằng buồng đếm hồng cầu)

Chủng VTP 20181 phát triển ở nồng độ muối thấp 1,7%, khi tăng nồng độ muối lên 5% phát triển rất yếu và không phát triển được khi nồng độ muối 7%. Chủng VTP20181 là chủng ưa mặn nhẹ.

3.3. Nghiên cứu xác định một số đặc tính sinh lý của chủng VTP 20181

Sử dụng môi trường LB lỏng cho vi

khẩn ưa mặn để xác định một số đặc tính sinh lý của chủng VTP 20181 như sau:

- Khả năng phát triển trên dải nhiệt độ từ $20 - 45^{\circ}\text{C}$

- Khả năng phát triển trên dải pH= 4,5 - 9

- Khả năng lên men trên một số loại đường: glucose, maltose,...

Kết quả thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Một số đặc tính sinh lý của chủng VTP20181

Nhiệt độ	20°C	25°C	30°C	35°C	45°C	
Khả năng phát triển	±	+	+	±	-	
pH	4,5	5,0	6,5	7,0	8,0	9,0
Khả năng phát triển	±	±	+	+	+	+
Đường	Lactose	Glucose	Mannose	Galactose	Maltose	Fructose
Khả năng phát triển	+	+	+	+	+	-

(Ghi chú: + phát triển tốt, ± phát triển yếu, - không phát triển. Tế bào chết được xác định bằng nhuộm xanh methylen, đếm tế bào chết bằng buồng đếm hồng cầu)

Qua kết quả ở bảng 2 cho thấy: Chủng VTP20181 phát triển yếu ở nhiệt độ 20°C, nhưng vẫn phát triển bình thường ở nhiệt độ trong khoảng 25-35°C, tuy nhiên khi nhiệt độ tăng lên 45°C thì không phát triển. Chủng VTP20181 phát triển tốt trên môi trường muối kiềm và có khả năng lên men hầu hết các loại đường đã sử dụng trong nghiên cứu, ngoại trừ đường fructose.

3.4. Nghiên cứu xác định khả năng yếm khí hay hiếu khí của chủng VTP 20181

Để xác định khả năng hiếu khí hay kỵ khí của chủng vi khuẩn, tiến hành nuôi cấy chủng VTP20181 trong 48 giờ, kết thúc lên men, ly tâm thu sinh khối. Sinh khối được đặt trên lam kính và nhỏ H₂O₂ 3%. Quan sát hiện tượng sủi bọt trong thí nghiệm catalase cho thấy dương tính và có hiện tượng sủi bọt, điều này chứng tỏ chủng VTP20181 hiếu khí.

3.5. Kết quả giải trình tự gen chủng VTP 20181

➤ Trình tự gen rARN 16S của chủng VTP20181

TGGCTCAGAACGAACGCT-
GGCGGCAGGCTTAACACATG-
CAAGTCGAGCGAGACCTTCG-
GGTCTAGCGGCGGACGGGT-
GAGTAACGCGTGGGAACGT-
GCCCTTCTCTACGGAATAGC-
CCCGGGAAACTGGGAGTA-
ATACCGTATACGCCCTTTGGG-
GGAAAGATTTATCGGAGAAG-
GATCGGCCCGCGTTGGATT-
AGGTAGTTGGTGGGGTAATG-
GCCCACCAAGCCGACGATC-
CATAGCTGGTTTGAGAGGAT-

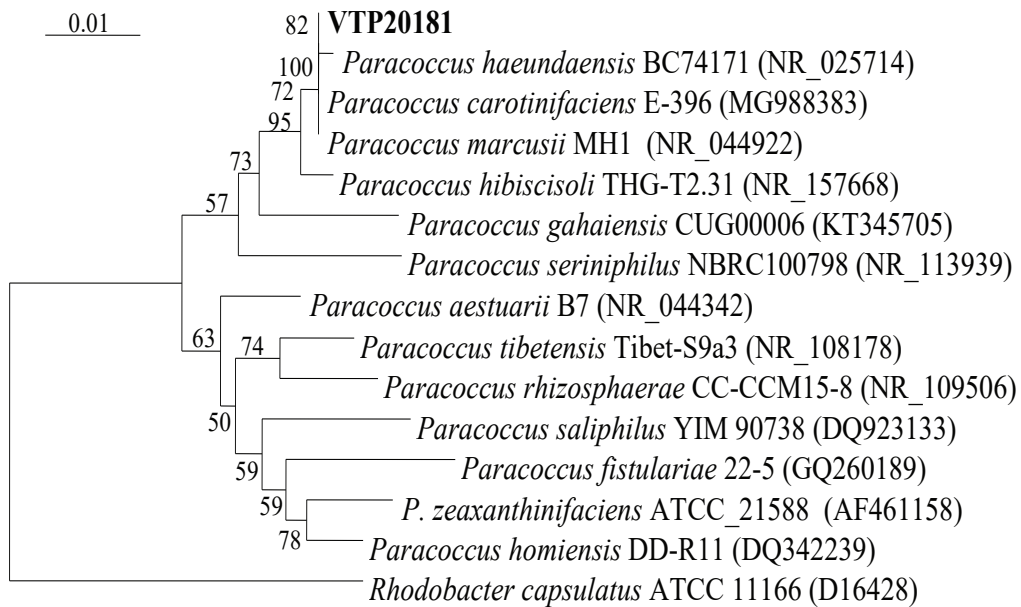
GATCAGCCACACTGGGACTGAG-
ACACGGCCCAGACTCCTACGG-
GAGGCAGCAGTGGGGAATCT-
TAGACAATGGGGGCAACCCT-
GATCTAGCCATGCCGCGT-
GAGTGATGAAGGCCTTAGG-
GTTGTAAAGCTCTTTCAGCT-
GGGAAGATAATGACGGTAC-
CAGCAGAAGAAGCCCCGGCTA-
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCG-
GTAATACGGAGGGGGCTAGC-
GTTGTTTCGGAATTACTGGGCG-
TAAAGCGCACGTAGGCGGACT-
GGAAAGTCAGAGGTGAAATC-
CCAGGGCTCAACCTTGGAACT-
GCCTTTGAAACTATCAGTCTG-
GAGTTCGAGAGAGGTGAGT-
GGAATTCGAGTGTAGAGGT-
GAAATTCGTAGATATTCGGAG-
GAACACCAGTGGCGAAGGCG-
GCTCACTGGCTCGATACTGAC-
GCTGAGGTGCGAAAGCGTGG-
GGAGCAAACAGGATTAGATAC-
CCTGGTAGTCCACGCCGTA-
AACGATGAATGCCAGACGTC-
GGCAAGCATGCTTGTCGGTGT-
CACACCTAACGGATTAAGCAT-
TCCGCCTGGGGAGTACGGTC-
GCAAGATTA AAACTCAAAG-
GAATTGACGGGGGGCCCGCA-
CAAGCGGTGGAGCATGTG-
GTTTAATTCGAAGCAACGCGCA-
GAACCTTACCAACCCTTGACAT-
GGCAGGACCGCTGGAGAGAT-
TCAGCTTTCTCGTAAGAGACCT-
GCACACAGGTGCTGCATG-
GCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG-
GAGATGTTTCGGTTAAGTCCGG-
CAACGAGCGCAACCCACGTC-
CCTAGTTGCCAGCATTAGTTG-
GGCACTCTATGGAAACTGC-
CGATGATAAGTCGGAGGAAGGT-

GTGGATGACGTCAAGTCCTCAT-
GGCCCTTACGGGTGGGGCTACA-
CACGTGCTACAATGGTGGTGA-
CAGTGGGTAAATCCCCAAAAGC-
CATCTCAGTTCGGATTGTCCTCT-
GCAACTCGAGGGCATGAAGTTG-
GAATCGCTAGTAATCGCGGAA-
CAGCATGCCGCGGTGAATAC-
GTTCCCGGGCCTTGTACA-
CACCGCCCGTACACCATGG-
GAGTTGGTTCTACCCGACGAC-
GCTGCGCTAACCTTCGGGGGG-
CAGGCGGCC

Trình tự gen rARN 16S của chủng
VTP20181 tương đồng 100 %

(1366/1366 bp) với đoạn 16S của
Paracoccus marcusii MH1; tương đồng
100 % (1366/1366 bp) với *Paracoc-
cus carotinifaciens* E-396 và tương
đồng 99,85 % (1364/1366 bp) với
Paracoccus haeundaensis BC74171.

Dựa trên đặc điểm về hình thái, đặc
tính sinh lý, kết quả giải trình tự gen
rARN 16S của chủng VTP20181,
chúng tôi xác định chủng VTP20181
là chủng *Paracoccus carotinifaciens* và
đặt tên chủng là *Paracoccus carotini-
faciens* VTP20181.



3.6. Xác định khả năng sinh tổng hợp canthaxanthin

Chủng *Paracoccus carotinifaciens*
VTP20181 lên men trên môi trường LB
lỏng cho vi khuẩn ưa mặn, nhiệt độ lên

men 30⁰C, thời gian 3 -7 ngày, đánh giá
sơ bộ khả năng sinh tổng hợp canthaxan-
thin của chủng theo phương pháp HPLC,
kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Đánh giá khả năng sinh tổng hợp canthaxanthin của chủng *Paracoccus carotinifaciens* VTP20181

Thời gian lên men (ngày)	3	5	7
Hàm lượng canthaxanthin ($\mu\text{g/g}$ skk)	530,01	450,22	321,31

Khả năng sinh tổng hợp canthaxanthin của chủng *Paracoccus carotinifaciens* VTP20181 cao nhất ở ngày thứ 3 đạt 530,01 $\mu\text{g/g}$ skk. Đây là kết quả tương đối khả quan đối với chủng phân lập từ đất ruộng muối, có thể nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp canthaxanthin của chủng ứng dụng trong sản xuất quy mô công nghiệp làm thức ăn cho cá hồi.

IV. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu quan sát hình thái và một số đặc tính sinh lý của chủng VTP20181. Chủng VTP20181 là vi khuẩn gram âm, hình que, khuẩn lạc hình tròn, bóng, màu hồng, là vi khuẩn ưa muối nhẹ, có khả năng phát triển tốt trên môi trường muối kiềm, nhiệt độ phát triển thích hợp từ 25^oC-30^oC, có khả năng phát triển trên nhiều loại đường: lactose, glucose, mannose, galactose, maltose. Dựa trên đặc điểm về hình thái, đặc tính sinh lý, kết quả giải trình tự gen rARN 16S của chủng VTP20181 (có độ tương đồng gen với chủng *Paracoccus carotinifaciens* E-396 là 99,85 % (1364/1366 bp)). Chủng VTP20181 được đặt tên là *Paracoccus carotinifaciens* VTP20181. Chủng *Paracoccus carotinifaciens* VTP20181 sinh tổng hợp canthaxanthin đạt 530,01 $\mu\text{g/g}$ skk, đây là chủng tiềm năng, có thể áp dụng sản xuất canthaxanthin quy mô công nghiệp, ứng dụng làm thức ăn cho cá hồi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Ty và D. Đ. Tiên (1979). *Vi sinh vật học tập 1*, NXB Đại học và trung cấp chuyên nghiệp.
2. Võ Xuân Hoài, Phan Thanh Dũng, Trần Cát Đông (2014). *Xây dựng qui trình định lượng carotenoid trong một số chế phẩm đang lưu hành trên thị trường*. Y Học TP. Hồ Chí Minh, Tập 18, Phụ bản của Số 2.
3. Asker, D. and Y. Ohta (1999). *Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria*. J. Biosci. Bioeng., 88: 617-621.
4. Cooney J.J, Marks H.W, Smith A.M (1966). *Isolation and identification of canthaxanthin from Micrococcus roseus*. Journal of Bacteriology 92(2), 342-345.
5. Hannibal, L., Lorquin, J., D'Ortoli, N. A., Garcia, N. et al.(2000). *Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium Bradyrhizobium sp. strain ORS278*. J. Bacteriol. 2000, 182, 3850–3853.
6. Khodaiyan, F., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S. M. A. (2007). *Optimization of canthaxanthin production by Dietzia natronolimnaea HS-1 using response surface methodology*. Pak. J. Biol. Sci. 2007, 10, 2544–2552.

7. Kimura, M. (1980). *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J. Mol. Evol., 16, 111-120.
8. Rémi T.M Baker (2001). *Canthaxanthin in aquafeed applications: is there any risk?* Trends in Food Science & Technology Volume 12, Issue 7, Pages 240-243.
9. Saitou N. and Nei M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.
10. Takaichi S, Maoka T, Akimoto N, Khan ST, Harayama S (2006). *Major carotenoid isolated from Paracoccus schoinia NBRC 100637T is adonixanthin diglucoside*. J Nat Prod 69: 1823–1825.
11. Toru Tanaka, Kawasaki; Teruhiko Ide, Hachioji (2013). *Microorganism and method for producing canthaxanthin*. US 8,569,014 B2.
12. Thompson JD, et al (1997). *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*, Nucleic Acids Res., 1997, vol. 25 (pg. 4876-4882)

Summary

STUDIES ON PHYSIOLOGICAL FEATURES AND TAXONOMY OF HALOPHILIC BACTERIUM SYNTHESIZING HIGH CANTHAXANTHIN

Canthaxanthin (β , β -Carotene-4, 4'-dione) is a red-orange carotenoid that belongs to the xanthophyll group. Canthaxanthin is also responsible for the color of salmon, and has the antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer features that are beneficial to human health. The halophilic bacterium is a group of microorganisms with the largest number of strains that are capable of canthaxanthin biosynthesis. The Culture Collection of Food Industry Research Institute (FIRI Culture Collection) is very diverse, including halophilic bacteria isolated from salt fish and soil of salt field. The VTP20181 strain in FIRI Culture Collection is a halophilic bacterium that produces canthaxanthin. We have identified physiological features and taxonomy VTP20181 strain that it is *Paracoccus carotinificiens* VTP20181, canthaxanthin content in dry biomass at 530.01 $\mu\text{g/g}$. This strain is used for production of canthaxanthin in industrial scale which is applied in salmon feed

Keywords: *Halophilic bacterium, Paracoccus carotinificiens, canthaxanthin.*

