

SÀNG LỌC CHỦNG VI KHUẨN SINH CAROTENOID TỪ BIỂN VÀ CÁC HỒ TÔM Ở VIỆT NAM

Bùi Minh Giao Long*, Vũ Thanh Thảo*, Trần Cát Đông*

TÓM TẮT

Mở đầu: Các chất chống oxy hóa trong tự nhiên như flavonoid, carotenoid, polyphenol, vitamin C, vitamin E... được quan tâm và nghiên cứu rất nhiều do tiềm năng sử dụng làm thực phẩm chức năng. Carotenoid là nhóm sắc tố được tìm thấy nhiều nơi trong tự nhiên nhất là trong các sinh vật sống bao gồm thực vật, động vật, vi khuẩn, tảo, nấm...

Mục tiêu: Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid từ biển và hồ tôm ở Việt Nam.

Phương pháp: Chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất ở biển và hồ nuôi tôm. Xác định sự hiện diện của carotenoid và khả năng đánh bắt gốc tự do DPPH của các dịch chiết vi khuẩn đã phân lập. Bên cạnh đó, tiến hành giải trình tự 16S rDNA để định danh chính xác các chủng.

Kết quả: Từ 54 chủng vi khuẩn có màu được phân lập từ các mẫu đất, cát ở biển và hồ nuôi tôm (biển Vũng Tàu, Phan Thiết, Long Hải; suối nước nóng Bình Châu; hồ tôm ở Cần Giò và Bình Thuận), chọn được 5 chủng có khả năng sinh carotenoid. Các chủng này đều có hoạt tính chống oxy hóa lớn hơn 50%. Kết quả định danh bằng giải trình tự 16S rDNA cho thấy các chủng này đều thuộc chi *Bacillus*, bao gồm *Bacillus firmus*, *Bacillus indicus*, *Bacillus catenulatus*, *Bacillus aquimaris*, *Bacillus marisflavi*.

Kết luận: Phân lập được 5 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và có khả năng sinh carotenoid do đó có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất probiotic.

Từ khóa: carotenoid, gốc tự do, chất chống oxy hóa, *Bacillus*

ABSTRACT

SCREENING OF CAROTENOIDS PRODUCING BACILLUS FROM MARINE AND SHRIMP POND ENVIRONMENTS IN VIETNAM

Bui Minh Giao Long, Vu Thanh Thao, Tran Cat Dong

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Vol. 14 - Supplement of No 1 - 2010: 1-5

Background: Antioxidant compounds from natural sources (such as flavonoids, carotenoids, polyphenol, vitamin C, vitamin E, etc...) have gained many interests due to their potentials in functional food applications. Of these compounds, carotenoids are the pigment group existing in many organisms such as plant, fungi, bacteria, algae and some animals...

Objectives: To screening for carotenoids producing *Bacillus* from marine and shrimp pond environments in Vietnam.

Methods: The organic extracts from the strains was used for carotenoids identification by HPLC method with UV detector and radicals scavenging ability with DPPH method. Besides, phylogenetic analysis with 16S rDNA sequencing was performed for identification of the selective strains.

Results: From 54 pigmented bacterial strains isolated from variety samples of marine and shrimp ponds in Vung Tau, Phan Thiet, Long Hai's marine, Binh Chau hot spring, shrimp ponds at Can Gio and Binh Thuan, 5 strains that produce carotenoids were selected. These strains have antioxidant activity higher than 50%. 16S

* Bộ môn Dược Lý - Khoa Dược - Đại học Y Dược Tp.HCM

Địa chỉ liên hệ: ThS.DS. Bùi Minh Giao Long

ĐT: 0909396117 Email: bmglong@yahoo.com

rDNA-based identification showed that these strains have had the nearest relationship with five various Bacillus included Bacillus firmus, Bacillus indicus, Bacillus catenulatus, Bacillus aquimaris, Bacillus marisflavi.

Conclusion: Five Bacillus strains have been identified as carotenoid producers which have potential use as probiotics.

Keywords: carotenoid, free radicals, antioxidants, Bacillus

ĐẶT VẤN ĐỀ

Carotenoid là nhóm sắc tố có khả năng chống oxi hóa hữu hiệu, được tìm thấy nhiều nơi trong tự nhiên nhất là trong các sinh vật sống bao gồm thực vật, động vật, vi khuẩn, tảo, nấm... Kể từ khi được phát hiện cho đến nay, carotenoid được ứng dụng rộng rãi làm chất phụ gia tạo màu cho thực phẩm và thức ăn cho động vật, chất bổ sung giúp gia tăng giá trị dinh dưỡng và thẩm mỹ cho tôm, cá,... Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh các carotenoid với vai trò là chất chống oxi hóa đã mang lại lợi ích cho sức khỏe con người bằng cách ngăn ngừa hay trì hoãn các bệnh mãn tính như ung thư, xơ cứng động mạch, đục thủy tinh thể và một số bệnh khác. Do đó, carotenoid cũng đã được nghiên cứu và ứng dụng rất nhiều trong lĩnh vực dược, mỹ phẩm. (5,6,8,9)

Việc sản xuất carotenoid từ nguồn có sẵn trong tự nhiên được cho là an toàn hơn vì ít tạo ra các dạng đồng phân cấu trúc có khả năng ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người so với từ con đường tổng hợp hóa học. Ngoài ra, các yếu tố kinh tế khác như rẻ tiền, năng suất cao cũng làm cho việc sản xuất carotenoid từ nguồn tự nhiên ngày càng được ưu tiên. Nguồn vi khuẩn sinh carotenoid phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Việc sử dụng vi khuẩn có nhiều ưu thế như dễ nuôi cấy ở qui mô lớn, tăng trưởng nhanh và sử dụng cơ chất rẻ tiền. Ngoài ra, việc sử dụng vi khuẩn sinh carotenoid làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng có thể đem đến những giá trị cao hơn như gia tăng độ bền trong hệ tiêu hóa, tính ổn định trong bảo quản. (2,10,12)

Hiện nay, có rất nhiều loài vi khuẩn sinh

carotenoid được phân lập từ nguồn nước biển, suối nước nóng, vùng núi lửa, vùng có phóng xạ,... như các loài thuộc chi Micrococcus, Corynebacterium, Bacillus, Rhodococcus, ... cho thấy tiềm năng to lớn của việc sử dụng các chủng vi khuẩn này trong sản xuất carotenoid. (3,7)

VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Môi trường: TSA, TSB, MHA, DSM, môi trường chứa casein, lipase, gelatin, tinh bột

Hoá chất

- Cho test DPPH: chloroform, methanol (Merck), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Merck), vitamin C, BHT (2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol), β -caroten (Merck)
- Cho giải trình tự 16S rDNA: đệm ly giải Bacillus, lysozyme, N-laurylsarcosine 20%, PCI (phenol: chloroform: isoamyl alcol) (25: 24: 1), natri acetat 3M, ethanol 95%, ethanol 70%, đệm TE, đệm TAE 1X, Agarose (Merck), ethidium bromide, PCR buffer (BioLabs), dNTP (BioLabs), Taq polymerase (BioLabs), nước cất hai lần tiệt trùng, dung dịch nạp mẫu 10X, kit tinh chế sản phẩm PCR (Wizard SV gel & PCR clean-up system) (Promega).

Thiết bị: máy đo UV-vis Hitachi 2010, máy đông khô Christ, máy PCR, tủ ấm Shellab, kính hiển vi, máy lắc và các dụng cụ cần thiết khác

Thu mẫu và phân lập vi khuẩn từ nguồn đất, nước

Các mẫu đất, cát (khoảng 20g) được thu thập từ biển và hồ tôm đựng trong ống Falcon 50 ml vô trùng, cho nước vào đến vạch từ 30-40 ml, phân tán đều mẫu. Hút 0,1 ml mẫu pha loãng với dung dịch NaCl 0,85%. Nhỏ 100 μ l mẫu ở 3 độ pha loãng cuối lên TSA và trải đều. Ủ ở 37 °C trong 24 đến 48 giờ. Quan sát khóm có sắc tố vàng, đỏ cam, trích qua một hộp thạch dinh dưỡng mới. Phân lập và kiểm tra các khóm sinh sắc tố. Nhuộm Gram, quan sát dưới kính hiển vi xem màu sắc, hình dạng và cách sắp xếp. Tiến hành phân lập tiếp theo trên môi trường DSM để khảo sát sự tạo bào tử. (4)

Chiết xuất và sàng lọc hoạt tính chống oxi hoá

Chiết xuất: Nuôi cấy chủng vi khuẩn trong 200 ml TSB, ở 37°C, 24 giờ. Ly tâm thu sinh khối vi khuẩn và đông khô. Dùng khoảng 300 mg sinh khối và tiến hành chiết xuất bằng 2,5 ml methanol và 5 ml chloroform. Ủ trong nước đá trong 20 phút để tránh sự huỷ hoại carotenoid. Sau đó, thêm 2,5 ml nước vào và vortex trong 30 giây. Đem ly tâm hỗn dịch này trong 5 phút ở tốc độ 13000 vòng/phút. Lốp dưới có màu sẽ được thu lại và cho bay hơi hết chloroform. Lưu trữ dịch này ở -20°C và tránh ánh sáng để thực hiện thử nghiệm DPPH. (4,11)

Thử nghiệm DPPH: Dùng 1 ml dịch chiết (pha loãng để có độ hấp thu trong khoảng 0,3-0,5) cho vào 2 ml dung dịch DPPH có nồng độ 10 μ g/ml trong methanol. Hỗn hợp được lắc đều và để ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thu sau 60 phút ở bước sóng 517 nm, mỗi mẫu đo 3 lần lấy giá trị trung bình. Mẫu đối chiếu là mẫu chỉ có DPPH bao gồm 2 ml DPPH và 1 ml methanol để đảm bảo độ pha loãng.

Các chất so sánh được tiến hành trong cùng điều kiện bao gồm các chất chống oxi hóa như vitamin C, BHT nồng độ 10 μ g/ml trong methanol và β -caroten nồng độ 10 μ g/ml

trong hỗn hòa methanol và chloroform (1:1). (1,5)

Khả năng đánh bắt gốc tự do (S%) được tính theo công thức sau:

$$S(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{A_s^t}{A_c^t}\right)$$

A_s^t : Độ hấp thu của mẫu thử ở thời điểm t = 60 phút.

A_c^t : Độ hấp thu của mẫu đối chiếu ở thời điểm t = 60 phút.

Định danh với giải trình tự 16S rDNA

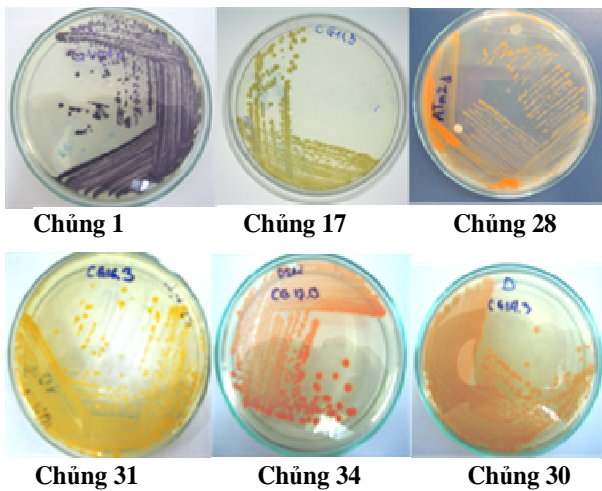
Tiến hành chiết tách DNA theo quy trình và khuếch đại sản phẩm bằng PCR với hai môi P1 [5'-GCGGCGTGCCTAATACATGC-3' (mũi xuôi từ 40 đến 59) và P2 [5'-CACCTTCCGATACGGCTACC-3'] (mũi ngược từ 1532 đến 1513). (4)

Việc giải trình tự gen 16S rADN được tiến hành bởi dịch vụ của công ty MacroGen (Hàn Quốc), mỗi mẫu được định trình tự với 2 phản ứng dùng môi P1 và P2. Trình tự thu được từ hai phản ứng được lắp ráp lại bằng chương trình SeqMan trong bộ phần mềm Lasergene 7.0, đối chiếu kết quả lắp ráp với dữ liệu giải trình tự ABI để xác định các nucleotid chưa rõ, khoảng 100 nucleotid ở hai đầu được loại bỏ do tín hiệu không rõ. Trình tự gen đã lắp ráp được so sánh bởi chương trình NCBI BLAST với các ADN của GenBank. Kết quả được chọn là kết quả có Max Ident và Query coverage cao nhất.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Thu mẫu và phân lập vi khuẩn từ nguồn đất, nước

Từ 200 mẫu đất và nước thu được từ biển và hồ nuôi tôm, sau khi thực hiện phân lập trên môi trường TSA đã thu được 54 chủng vi khuẩn tạo khóm có nhiều màu sắc khác nhau trong đó chiếm đa số là các khóm có màu vàng và cam với các sắc đậm, nhạt khác nhau.



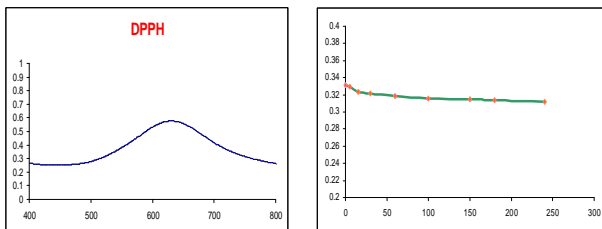
Hình 1. Các chủng phân lập được trên môi trường TSA

Chiết xuất và sàng lọc hoạt tính chống oxi hoá

Tính ổn định của DPPH (10 µg/ml) theo thời gian sẽ được khảo sát trước hết với kết quả được trình bày theo bảng 1

Bảng 1. Tính ổn định của DPPH theo thời gian

Phút	0	5	15	30	60	100	150	180	240
A	0,33	0,30	0,33	0,33	0,33	0,32	0,31	0,31	0,31



Hình 2. Phổ UV-vis và đồ thị khảo sát tính ổn định của DPPH

Kết quả trên cho thấy DPPH có đỉnh hấp thụ ở bước sóng 517 nm và mặc dù độ hấp thụ có giảm nhưng được chấp nhận là ổn định trong thời gian từ 0 đến 240 phút ($p=0,81$; $\alpha=95\%$).

Kết quả thực hiện phản ứng DPPH

Kết quả trên 54 dịch chiết hữu cơ thực hiện phản ứng DPPH chúng tôi nhận thấy có 5 dịch chiết có hoạt tính chống oxi hoá trung bình trên 50%.

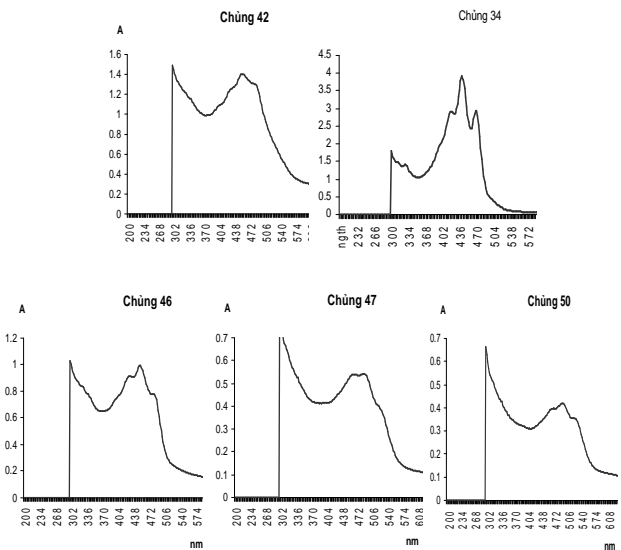
Bảng 2. Kết quả thực hiện phản ứng DPPH

Chủng	S60 (%)	TB
-------	---------	----

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	
34	51,34	48,16	55,67	51,72
36	89,73	87,43	79,89	85,68
42	77,63	79,93	73,16	76,90
46	66,42	67,87	77,15	70,48
47	51,34	54,45	61,33	55,71

Kết quả quét phổ UV-Vis

Kết quả UV-vis cho thấy 5 dịch chiết này đều có nhiều hơn một đỉnh hấp thụ trong vùng Vis (300-600 nm)



Hình 3. Kết quả phổ UV-vis các dịch chiết hữu cơ Định danh bằng giải trình tự 16S rDNA

Chúng tôi chọn phương pháp khuếch đại gen 16S rDNA để định danh 5 chủng vi khuẩn này vì đây là phương pháp cho kết quả chính xác. Tuy nhiên, các chủng được chọn chỉ được định danh là gần nhất với loài nào chứ không kết luận tên loài của các chủng này hoàn toàn.

Chúng tôi dùng phần mềm Seqman để ghép 2 trình tự được giải với 2 môi P1 và P2 để có được đoạn DNA hoàn chỉnh và đưa trình tự này vào NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) để so sánh đoạn DNA của các chủng chọn lọc với các chủng trong ngân hàng này. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả định danh với NCBI BLAST

Chủng	Loài gần nhất	Query coverage *(%)	Max ident **(%)
-------	---------------	---------------------	-----------------

34	Bacillus firmus	100	99
36	Bacillus indicus	100	99
42	Bacillus alcalophilus	99	99
46	Bacillus catenulatus	99	97
47	Bacillus aquimaris	99	98

* Query coverage: phần trăm trình tự được dùng để so sánh với cơ sở dữ liệu

** Max indent: phần trăm trình tự tương đồng với cơ sở dữ liệu

Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn được định danh đều thuộc chi Bacillus. Qua khảo sát dưới kính hiển vi cũng cho thấy hình ảnh bào tử tạo thành, tuy nhiên sự tạo thành bào tử ở các loài này ít và khá chậm so với các chủng Bacillus tạo khóm không màu.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập 54 chủng vi khuẩn từ nguồn đất, nước ở biển và các hồ tôm. Qua thử nghiệm DPPH của các dịch chiết hữu cơ từ các chủng vi khuẩn, chúng tôi đã sàng lọc được 5 chủng vi khuẩn có hoạt tính chống oxy hóa cao (trên 50%). Chúng tôi cũng đã định danh 5 chủng vi khuẩn trên là Bacillus bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rDNA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antolovich, M., P. D. Prenzler, E. Patsalides. (2002) Methods for testing antioxidant activity. Analyst 127(1): p. 183-198.
2. Bhosale, P. (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 63(4): p. 351-61.
3. Das, A., S. H. Yoon, S. H. Lee, et al. (2007) An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. Appl Microbiol Biotechnol.
4. Duc Le, H., P. D. Fraser, N. K. Tam, et al. (2006) Carotenoids present in halotolerant Bacillus spore formers. FEMS Microbiol Lett. 255(2): p. 215-24.
5. Galano, A. (2007) Relative antioxidant efficiency of a large series of carotenoids in terms of one electron transfer reactions. J Phys Chem B. 111(44): p. 12898-908.
6. Ishida, B. K., M. H. Chapman. (2004) A comparison of carotenoid content and total antioxidant activity in catsup from several commercial sources in the United States. J Agric Food Chem. 52(26): p. 8017-20.
7. Johnson, E. A., W. A. Schroeder. (1996) Microbial carotenoids. Adv Biochem Eng Biotechnol. 53: p. 119-78.
8. Jorgensen, K., L. H. Skibsted. (1993) Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial

9. McNulty, H., R. F. Jacob, R. P. Mason. (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. Am J Cardiol. 101(10A): p. 20D-29D.
10. Olson, J. A. (1999) Carotenoids and human health. Arch Latinoam Nutr. 49(3 Suppl 1): p. 7S-11S.
11. R. Khaneja, L. Perez-Fons, S. Fakhry, et al. (2009) Carotenoids found in Bacillus. Journal of Applied Microbiology. 9999(9999).
12. Rodriguez-Villalon, A., J. Perez-Gil, M. Rodriguez-Concepcion. (2008) Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. J Biotechnol. 135(1): p. 78-84.
