

Isolation and selection of carotenoid-producing bacteria from marine environment and determination of carotenoid extraction condition

Cuc T. H. Le, Hoa T. M. Le, Trang T. Tran, Vi T. T. Van,
Phong V. Nguyen, & Thanh T. L. Bien*

Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: June 15, 2021

Revised: August 20, 2021

Accepted: September 06, 2021

Keywords

Carotenoid-producing bacteria

Carotenoids

Extraction

Isolation

Marine environment

*Corresponding author

Bien Thi Lan Thanh

Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The carotenoid is a natural pigment group, which is gradual of interest because of its essential biological activities and great production potentials such as using low-cost material and easy to apply on a large scale. For further development of natural carotenoid products, in this study, fourteen yellow, red, and orange pigment-producing marine bacterial strains were isolated from 25 seawater samples collected along coasts of Phu Quoc island (Kien Giang province), Vung Tau City (Ba Ria – Vung Tau province), Can Gio district (Ho Chi Minh city), and Thang Binh district (Quang Nam province). These isolates were identified as belonging to seven genera *Micrococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus* and *Exiguobacterium* with 96.7% - 100% of 16S rRNA sequences identity. Based on carotenoid producing ability and UV-absorbance profile, three of the isolates including *Micrococcus* sp. 64A3a (yellow), *Exiguobacterium* sp. YT09 (orange) and *Rhodococcus enclensis* strain RSA3 (red) were selected for investigation of carotenoid extraction conditions. Methanol at a concentration of 100% with ratio of 1 g bacterial cells/10 mL methanol is suitable conditions for extraction of red, orange and yellow pigments from the isolates.

Cited as: Le, C. T. H., Le, H. T. M., Tran, T. T., Van, V. T. T., Nguyen, P. V., & Bien, T. T. L. (2021). Isolation and selection of carotenoid-producing bacteria from marine environment and determination of carotenoid extraction condition. *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 53-61.

Phân lập, tuyển chọn các dòng vi khuẩn sinh carotenoid từ môi trường biển và xác định điều kiện ly trích sắc tố

Lê Thị Hoàng Cúc, Lê Thị Mỹ Hoa, Trần Thuỳ Trang, Văn Thị Tường Vi,
Nguyễn Vũ Phong & Biện Thị Lan Thanh*

Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 15/06/2021

Ngày chỉnh sửa: 20/08/2021

Ngày chấp nhận: 06/09/2021

Từ khóa

Carotenoids

Ly trích

Môi trường biển

Phân lập

Vi khuẩn sinh carotenoid

*Tác giả liên hệ

Biện Thị Lan Thanh

Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Carotenoid là một nhóm sắc tố tự nhiên đang dần được quan tâm sản xuất nhờ có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng và có tiềm năng lớn trong sản xuất như chi phí nguyên liệu thấp và dễ áp dụng ở quy mô lớn. Trong nghiên cứu này, nhằm hướng tới phát triển các sản phẩm carotenoid từ vi sinh vật, 14 chủng vi khuẩn sinh sắc tố vàng, đỏ và cam đã được phân lập từ 25 mẫu nước biển thu thập tại các vùng biển Tây Nam Bộ (huyện Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang), Đông Nam Bộ (Vũng Tàu và Cần Giờ) và Duyên hải Nam Trung Bộ (huyện Thăng Bình, tỉnh Quảng Nam). Các chủng phân lập được xác định thuộc 7 chi: *Micrococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Exiguobacterium* với độ tương đồng trình tự gene 16S rRNA 96,7% - 100%. Dựa vào khả năng sinh carotenoid và độ hấp thu của sắc tố, 3 chủng *Micrococcus* sp. 64A3a (màu vàng), *Exiguobacterium* sp. YT09 (màu cam) và *Rhodococcus enclensis* strain RSA3 (màu đỏ) được tuyển chọn để khảo sát điều kiện ly trích sắc tố. Các sắc tố đỏ, cam và vàng từ các chủng tuyển chọn được ly trích với hiệu suất cao khi sử dụng dung môi là methanol ở nồng độ 100% với tỉ lệ 1 g tế bào vi khuẩn/10 mL methanol.

1. Đặt Vấn Đề

Carotenoid là một trong những nhóm sắc tố tự nhiên quan trọng, tan trong lipid, có màu từ vàng tới đỏ, với cấu trúc cơ bản bao gồm một tetraterpene với một loạt các liên kết đôi liên hợp. Carotenoid xuất hiện trong hệ thống quang hợp của thực vật bậc cao, tảo và các vi khuẩn. Ở một số vi khuẩn và nấm, carotenoid đóng vai trò là các chất bảo vệ chống lại sự tổn thương bởi quang oxy hóa, bảo vệ khi điều kiện tăng trưởng có ánh sáng và nhiều không khí (Bartley & Scolnik, 1995). Một số carotenoid là tiền chất của vitamin A, và có các hoạt tính như kháng viêm, chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch, chống ung thư, dùng cho liệu pháp tim mạch và các bệnh thoái hóa thần kinh (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) và chống béo phì (Lai & ctv., 2015).

Mặc dù carotenoid hóa học có dãy màu sắc đa

dạng và chi phí sản xuất thấp nhưng việc sản xuất và sử dụng carotenoid hóa học tạo ra các chất thải có thể gây ra những ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường và sức khỏe con người (Burrows, 2009; Asker & ctv., 2018). Vì vậy sản xuất carotenoid có nguồn gốc từ nguồn thực vật và vi sinh vật dần được quan tâm. Việc sản xuất carotenoid từ thực vật ở quy mô công nghiệp thường phụ thuộc vào yếu tố mùa vụ và thổ nhưỡng. Do đó, sản xuất carotenoid từ vi sinh vật được xem là hướng tiềm năng, đặc biệt là đối với vi sinh vật biển với nhiều ưu điểm như: giảm tạp nhiễm do có thể nuôi cấy trong điều kiện độ mặn cao, dễ sản xuất ở quy mô lớn, sử dụng nguồn cơ chất rẻ tiền, giảm chi phí sản xuất, các điều kiện sản xuất có thể được tối ưu và rút ngắn thời gian (Tinoi & ctv., 2005; Wu & Liu, 2007; Markou & Nerantzis, 2013). Tuy nhiên, ở Việt Nam thông tin và các nghiên cứu về sắc tố từ vi sinh vật còn hạn chế, một số nghiên

cứu được công bố như Huynh & ctv. (2013), Tran & ctv. (2015) và Le & Huynh (2018).

Thực phẩm được bổ sung chất tạo màu sẽ thu hút người tiêu dùng trong việc lựa chọn thực phẩm, nhưng với sự nhận thức ngày càng cao về tính độc hại của màu tổng hợp, nhu cầu về các sắc tố an toàn từ thiên nhiên dần được quan tâm (Arulselvi & ctv., 2014). Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn một số vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid từ môi trường biển.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn sinh sắc tố từ nước biển

Mẫu nước biển được thu thập tại 3 khu vực: Tây Nam Bộ (huyện Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang), Đông Nam Bộ (Vũng Tàu và Cần Giờ), Duyên hải Nam Trung Bộ (huyện Thăng Bình, tỉnh Quảng Nam). Mẫu được thu một cách ngẫu nhiên cách mặt nước khoảng 5 – 10 cm, chứa trong các chai polypropylene và trữ lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm và phân tích trong vòng 1 – 2 ngày.

Các mẫu nước biển được pha loãng đến nồng độ thích hợp, sau đó 100 μ L dịch pha loãng được trải trên môi trường Nutrient agar (NA), phơi dưới đèn UV bước sóng 253,7 nm (UV-C) trong 3 phút, và ủ ở 30°C trong 5 ngày (Asker, 2017). Các khuẩn lạc có màu vàng, đỏ và cam trên các đĩa môi trường NA được chọn lọc, làm thuần và trữ ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Định danh các chủng vi khuẩn sinh sắc tố

Các chủng vi khuẩn tạo sắc tố được định danh dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, các phản ứng sinh hóa và giải trình tự vùng gene 16S rRNA.

DNA tổng số của vi khuẩn được ly trích với GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Vùng gene 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng PCR với cặp universal primer 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Sản phẩm PCR (khoảng 1500 bp) được kiểm tra trên gel agarose 1% và được gửi giải trình tự. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm Bioedit và so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gene NCBI để xác định loài tương đồng (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid cao

Các chủng vi khuẩn thuần được tăng sinh trong 50 mL Nutrient broth trong 3 ngày. Dịch vi khuẩn được ly tâm thu tế bào, sau đó rửa tế bào 2 lần với nước cất vô trùng. Thêm methanol (MetOH) vào sinh khối với tỉ lệ 1 g sinh khối/10 mL MetOH, vortex, ủ 60°C trong 5 phút và ly tâm thu dịch trích carotenoid. Độ hấp thu (Abs) của sắc tố từ các chủng vi khuẩn được phân tích với dãy bước sóng từ 300 – 700 nm (Asker & ctv., 2007). Chủng vi khuẩn có giá trị Abs ở $\lambda_{\max}$ cao nhất được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

2.4. Khảo sát các điều kiện ly trích sắc tố từ tế bào vi khuẩn (loại dung môi/nồng độ dung môi và tỷ lệ sinh khối/dung môi)

Các chủng vi khuẩn sinh sắc tố vàng, cam và đỏ có độ hấp thu cao nhất từ thí nghiệm ở mục 2.3 được chọn sử dụng để khảo sát điều kiện ly trích sắc tố. Thí nghiệm được bố trí với 2 yếu tố gồm: nồng độ dung môi (%), và tỷ lệ sinh khối/dung môi (g/mL). Dung môi được sử dụng MetOH trong quá trình trích ly được sử dụng gồm 3 mức nồng độ 50%, 70% và 100%. Lượng MetOH được sử dụng trong các thí nghiệm trích ly được sử dụng theo các mức 1/10, 1/15, 1/20 và 1/25 g/mL trong đó khối lượng của vật liệu trích ly được xem như hằng số và lượng thể tích MetOH được xem như biến số trong quá trình khảo sát. Dung dịch sau ly trích được định mức bằng MetOH về thể tích bằng 25 mL. Tiến hành quét phổ 300 – 700 nm để xác định đỉnh hấp thu ($\lambda_{\max}$) của dung dịch trích ly.

Thí nghiệm được thực hiện với quy trình cùng các thông số đầu vào cố định như kỹ thuật trích ly ngâm dầm ở điều kiện nhiệt độ 60°C trong 5 phút. Mẫu sau trích ly được ly tâm ở điều kiện 6000 vòng/phút và thu dịch nổi. Dịch sau ly tâm được đánh giá cảm quan màu sắc và xác định Abs bằng UV – Vis với thông số $\lambda_{\max}$ và xác định hàm lượng carotenoid tổng số theo công thức biến đổi từ Cunningham & ctv. (2015): $TCC = A \times \frac{V}{m}$.

Trong đó:

TCC là hàm lượng carotenoid tổng số

A là độ hấp thu của sắc tố tại $\lambda_{\max}$

V là thể tích dung môi định mức (mL)

m là khối lượng sinh khối (g)

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và xử lý thống kê theo mô hình CRD 2 biến ngẫu nhiên hoàn toàn với đáp ứng hàm lượng carotenoid tổng số. Kết quả thí nghiệm nhằm đánh giá mức độ ảnh hưởng có ý nghĩa của 2 yếu tố nồng độ dung môi và tỷ lệ sinh khối dung môi ở mức tin cậy $\alpha = 95\%$. Thông qua mô hình trắc nghiệm phân hạng LSD nhằm tìm được cặp yếu tố có sự tác động có ý nghĩa nhất với đáp ứng hàm lượng carotenoid tổng số (Williams & Abdi, 2010).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Phân lập vi khuẩn sinh sắc tố từ nước biển

Từ 25 mẫu nước biển thu thập ở các vùng biển thuộc tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu, huyện Cần Giờ thành phố Hồ Chí Minh, huyện Thăng Bình tỉnh Quảng Nam và huyện Phú Quốc tỉnh Kiên Giang, 14 chủng vi khuẩn có khả năng sinh sắc tố đã được phân lập trên môi trường NA dưới tác động của tia UV. Các vi khuẩn phân lập có khuẩn lạc màu vàng, cam, đỏ, hình dạng tròn đều, kích thước nhỏ và bờ nhẵn (Hình 1).



Hình 1. Màu sắc khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phân lập được.

Các sắc tố được vi sinh vật sinh ra là hợp chất có khả năng hấp thụ tia UV và bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân gây hại (Asker, 2017). Vì vậy phương pháp hiệu quả để loại bỏ những chủng không có khả năng sinh sắc tố là phơi dưới đèn UV 3 phút sau khi cấy trang mẫu trên đĩa thạch.

Môi trường biển từ lâu đã được quan tâm như nguồn tài nguyên sinh học để khai thác các hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó có carotenoid (Hosokawa & ctv., 2009). Năm 2006, Du & ctv. đã phân lập được các chủng vi khuẩn dị dưỡng sinh sắc tố (vàng, đỏ, hồng và cam) trong môi trường nước biển ở miền duyên hải Trung Quốc và Thái Bình Dương. Các chủng vi khuẩn này đã được xác định gồm 25 chi thuộc 6 lớp *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Flavobacteria* và *Sphingobacteria* có tiềm năng sản xuất các sắc tố sinh

học ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống. Ngoài ra, Srilekha & ctv. (2018) đã phân lập được chủng vi khuẩn *Salinicoccus* sp. sinh sắc tố cam từ vùng biển Nellore (Ấn Độ) và chứng minh được khả năng gây độc mạnh tế bào ung thư phổi A549 và tế bào ung thư vú MCF-7. Ở Việt Nam, năm 2020, Bang & ctv. đã phân lập được 54 dòng chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng tổng hợp carotenoid từ mẫu đất và nước mặn tại huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Sắc tố từ các chủng này được ly trích với hệ dung môi methanol/chloroform (1/2, v/v) với quang phổ hấp thụ ở bước sóng 400 - 600 nm. Tương tự, nhóm tác giả (Bang & Van, 2020) cũng đã phân lập được 55 dòng vi khuẩn từ các mẫu đất thu ở Núi Cẩm, huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang, có khả năng sinh carotenoid với độ hấp thụ ở bước sóng 400 - 600 nm.

3.2. Định danh các chủng vi khuẩn phân lập

Các đặc điểm về khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn sinh sắc tố phân lập được quan sát và ghi nhận trong Bảng 1. Tất cả 14 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc nhỏ, tròn, nhẵn và có màu cam, đỏ, vàng sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường NA. Kết quả kiểm tra các phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được trình bày cụ thể trong Bảng 2.

Các chủng vi khuẩn được trích DNA tổng số và khuếch đại vùng 16S rRNA bằng PCR với cặp mồi 27F/1492R. Sản phẩm PCR (khoảng 1500 bp) được giải trình tự và so sánh với trình tự đã biết trên ngân hàng gene NCBI, kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả định danh ở Bảng 3 tương đồng với các đặc điểm hình thái học và thử nghiệm sinh hóa của chủng phân lập. Các chủng đều là vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, không sinh bào tử và có thể được tìm thấy ở nhiều môi trường khác nhau như đất, nước ngọt, nước biển, khuẩn lạc nhỏ, tròn, bề mặt nhẵn và có màu. Trong các chủng phân lập, 9 chủng có tế bào hình que và 5 chủng có tế bào hình cầu. Trong đó, chi *Rhodococcus* có hình thái tế bào thay đổi phụ thuộc vào giai đoạn phát triển, một số chủng có thể biến đổi từ hình cầu sang hình que ngắn (Borisova, 2011).

Năm 2012, Jafarzade & ctv. đã phân lập được 55 chủng vi khuẩn có khả năng sinh sắc tố từ bọt biển, nước biển, trầm tích rừng ngập mặn, hải sâm và trai từ các khu vực ven biển khác nhau của Malaysia. Các chủng có các màu cam,

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào các chủng vi khuẩn sinh sắc tố phân lập từ nước biển

STT	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc điểm khuẩn lạc	
		Bìa	Hình dạng	Màu sắc	Gram	Hình dạng
1	V1	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
2	V2	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
3	V3	Nhấn	Tròn	Vàng nhạt	+	Que
4	V4	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
5	V5	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
6	V6	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
7	V7	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Que
8	V8	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Que
9	Đ1	Nhấn	Tròn	Đỏ đậm	+	Que
10	Đ2	Nhấn	Tròn	Đỏ đậm	+	Que
11	C1	Nhấn	Tròn	Cam đậm	+	Que
12	C2	Nhấn	Tròn	Cam đậm	+	Que
13	C3	Nhấn	Tròn	Cam nhạt	+	Que
14	C4	Nhấn	Tròn	Cam nhạt	+	Que

+: phản ứng dương tính.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Chủng vi khuẩn	Indole	MR/ VP	Citrate	Sinh H ₂ S	Catalase	Oxidase
1	V1	-	-/-	-	-	+	+
2	V2	-	-/-	-	-	+	+
3	V3	-	+/-	-	-	+	-
4	V4	-	-/-	-	-	+	-
5	V5	-	-/-	-	-	+	-
6	V6	-	-/-	-	-	+	-
7	V7	-	-/-	-	-	+	-
8	V8	-	-/-	-	-	+	-
9	Đ1	-	-/-	-	-	+	-
10	Đ2	-	-/-	-	-	+	-
11	C1	-	+/-	-	-	+	+
12	C2	-	+/-	-	-	+	+
13	C3	-	+/-	-	-	+	-
14	C4	-	-/-	+	-	+	-

+: phản ứng dương tính; -: phản ứng âm tính.

vàng, đỏ, hồng, xanh và tím, trong đó 18 chủng có khả năng kháng khuẩn thuộc 2 chi *Serratia* và *Zooshikella*. Leiva & ctv. (2015) đã phân lập được các chủng vi khuẩn sinh carotenoid thuộc 11 chi *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Citricoccus*, *Kocuria*, *Labedella*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Salinibacterium*, *Sanguibacter* và *Staphylococcus* từ bề mặt tảo tại Quần đảo Nam Shetland. Các chủng này đều là vi khuẩn Gram dương và có khả năng sinh sắc tố, trong đó có 5 chủng thể hiện khả năng kháng một số chủng vi khuẩn liên quan đến rong biển.

Năm 2020, từ 54 dòng vi khuẩn phân lập từ các mẫu đất và nước mặn thu ở Hòn Đất

(Kiên Giang) Bang & ctv. đã xác định được 2 dòng vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid cao nhất có trình tự gene 16S rDNA tương đồng 100% với *Bacillus marisflavi* IHBB 9971 và *Bacillus infantis* BAB-2130. Ngoài ra, Bang & Van (2020) cũng đã xác định được 10 chủng có hàm lượng carotenoid tổng số cao từ 2,41 - 3,4 µg/mL từ 55 chủng vi khuẩn sinh carotenoid phân lập từ các mẫu đất thu tại Núi Cẩm, tỉnh An Giang. Các chủng này thuộc các chi *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Geobacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Kocuria*, *Brevundimonas*. Nhiều loài sinh vật trong đó có vi khuẩn có

xu hướng tích lũy carotenoid dưới các điều kiện stress sinh học và phi sinh học thông qua quá trình điều hòa tăng các con đường sinh tổng hợp carotenoid như là phản ứng tự vệ tránh thiệt hại (Ram & ctv., 2020).

3.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid cao

Carotenoid từ các chủng vi khuẩn phân lập được ly trích cùng một điều kiện. Dịch ly trích được đo độ hấp thu trong dãy bước sóng từ 300 – 700 nm. Kết quả tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn sinh sắc tố vàng, đỏ và cam có độ hấp thu lớn nhất ở $\lambda_{\max}$ (Bảng 4). Đối với sắc tố vàng, độ hấp thu dao động từ 0,19 - 0,75 ở $\lambda_{\max}$ 438 – 439 nm. Trong đó, sắc tố từ chủng V1 ($\lambda_{\max}$ = 439 nm) có độ hấp thu cao nhất là 0,75, khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại.

Bảng 4. Độ hấp thu của dịch ly trích từ các chủng vi khuẩn phân lập

Chủng vi khuẩn	$\lambda_{\max}$ (nm)	Độ hấp thu
Sắc tố vàng	V1	0,75 ^a ± 0,05
	V2	0,19 ^c ± 0,12
	V3	0,28 ^{bc} ± 0,02
	V4	0,25 ^{bc} ± 0,13
	V5	0,20 ^c ± 0,02
	V6	0,47 ^b ± 0,14
	V7	0,47 ^b ± 0,08
	V8	0,25 ^{bc} ± 0,02
Sắc tố vàng	D1	0,70 ^a ± 0,04
	D2	0,47 ^b ± 0,03
Sắc tố cam	C1	0,42 ^a ± 0,04
	C2	0,24 ^b ± 0,11
	C3	0,24 ^b ± 0,05
	C4	0,24 ^b ± 0,04

a-c Theo từng sắc tố, các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị trung bình thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$.

Sắc tố đỏ từ 2 chủng vi khuẩn phân lập được có độ hấp thu 0,47 – 0,70 ở $\lambda_{\max}$ 475 nm. Trong đó, chủng D1 có độ hấp thu cao nhất là 0,70, khác biệt có ý nghĩa so với chủng D2. Đối với sắc tố cam, độ hấp thu của sắc tố từ các chủng C1, C2, C3 và C4 dao động trong khoảng 0,24 - 0,42 ở $\lambda_{\max}$ từ 452 - 467 nm. Trong đó, chủng C1 có độ hấp thu cao nhất là 0,42 với $\lambda_{\max}$ = 467 nm, khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại.

Kết quả trên phù hợp với công bố trước đây của Mohana & ctv. (2013), các sắc tố được ly

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Chủng vi khuẩn	Loài tương đồng	Độ tương đồng (%)	Accession number
1	V1	<i>Micrococcus</i> sp. 64A3a	96,66	KJ743999.1
2	V2	<i>Micrococcus</i> sp. HB-1	97,78	GU073283.1
3	V3	<i>Microbacterium lacus</i> strain SP-04	99,25	KX082876.1
4	V4	<i>Micrococcus</i> sp. DUT_AHX	100	DQ409081.1
5	V5	<i>Kocuria</i> sp. XJDR4	100	AB773222.1
6	V6	<i>Micrococcus</i> sp. PA-E028	98,94	FJ233852.1
7	V7	<i>Bacillus</i> sp. ROIS-10	97,07	KJ413088.1
8	V8	<i>Brevibacterium luteolum</i> strain KS-1	99,78	JX535359.1
9	D1	<i>Rhodococcus encensis</i> strain RSA3	99,48	MH384434.1
10	D2	<i>Rhodococcus</i> sp. CCBAU 10970	97,24	JF772580.1
11	C1	<i>Erigunobacterium</i> sp. YT09	100	JX274652.1
12	C2	<i>Erigunobacterium profundum</i> strain YH5	99,93	KM873375.1
13	C3	<i>Brevibacterium</i> sp. strain MCS	99,93	MF431777.1
14	C4	<i>Brevibacterium linens</i> strain BS258	100	CP014869.1

Bảng 5. Hàm lượng carotenoid tổng số ở các điều kiện trích ly khác nhau

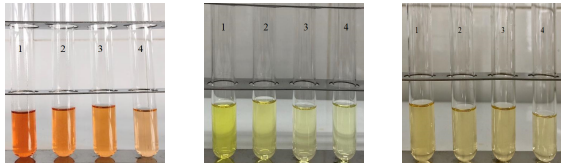
Tỷ lệ nguyên liệu dung môi (g/mL)	Nồng độ dung môi (%)											
	Chủng C1				Chủng V1				Chủng Đ1			
	100	70	50	100	70	50	100	70	50	100	70	50
1/10	9,41 ^a ±	2,12 ^e ±	3,07 ^{de} ±	21,74 ^a ±	7,52 ^{bc} ±	4,36 ^{bcd} ±	21,76 ^a ±	3,58 ^{cd} ±	4,92 ^{cd} ±	21,76 ^a ±	3,58 ^{cd} ±	4,92 ^{cd} ±
	0,45	0,34	1,51	2,10	0,43	0,49	5,70	0,34	1,38	5,70	0,34	1,38
	6,76 ^b ±	1,76 ^e ±	1,84 ^e ±	7,84 ^b ±	4,02 ^{bcd} ±	2,94 ^d ±	14,91 ^{ab} ±	1,93 ^{cd} ±	5,11 ^{cd} ±	14,91 ^{ab} ±	1,93 ^{cd} ±	5,11 ^{cd} ±
1/15	1,24	0,17	0,40	3,31	0,83	1,06	4,44	1,50	2,11	4,44	1,50	2,11
	5,72 ^{bc}	2,38 ^e	2,69 ^{de}	5,41 ^{bcd}	2,53 ^d	4,16 ^{bcd}	10,40 ^{bc}	1,17 ^d	4,90 ^{cd}	10,40 ^{bc}	1,17 ^d	4,90 ^{cd}
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
1/20	0,40	0,70	0,82	1,16	0,73	0,50	5,45	0,30	0,32	5,45	0,30	0,32
	4,60 ^{cd}	3,13 ^{de}	1,16 ^e	3,60 ^{cd}	3,55 ^{cd}	4,57 ^{bcd}	10,35 ^{bc}	3,04 ^{cd}	3,83 ^{cd}	10,35 ^{bc}	3,04 ^{cd}	3,83 ^{cd}
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
1/25	0,59	0,33	0,10	1,42	1,08	0,91	3,06	0,81	1,56	3,06	0,81	1,56

a-e Các trung bình có chữ cái khác nhau trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$.

trích từ 2 loài *Micrococcus roseus* và *Micrococcus luteus* sinh sắc tố màu đỏ và vàng với độ hấp thụ cực đại được quan sát lần lượt ở bước sóng 476,31 và 437,16 nm. Các sắc tố này được xác định là carotenoid. Trong thí nghiệm này, 3 chủng V1, Đ1 và C1 có độ hấp thụ cao nhất ở λ_{max} lần lượt là 439 nm, 475 nm và 467 nm. Theo Vu & ctv. (2011), dịch chiết sắc tố từ vi khuẩn có đỉnh hấp thụ trong vùng bước sóng từ 400 nm đến 600 nm là dãy phổ hấp thụ của carotenoid.

3.4. Khảo sát điều kiện ly trích sắc tố từ tế bào vi khuẩn

Sắc tố carotenoid được ly trích với dung môi MetOH với các nồng độ và tỉ lệ sinh khối/dung môi khác nhau. Sau khi định mức thể tích bằng 25 mL, dịch chiết sắc tố từ các chủng C1, V1 và Đ1 được đo độ hấp thụ ở các bước sóng lần lượt là 467 nm, 439 nm và 475 nm. Kết quả ly trích được trình bày ở Bảng 5. Hiệu quả ly trích sắc tố tương ứng với hàm lượng carotenoid tổng số đối với cả 3 chủng C1, V1 và Đ1 đều đạt cao nhất khi nồng độ MetOH 100% và tỷ lệ sinh khối/dung môi là 1/10 g/mL. Khi ly trích ở điều kiện trên, sắc tố màu cam từ chủng C1 và màu vàng từ chủng V1 có hàm lượng carotenoid tổng số cao nhất lần lượt là 9,41 và 21,74. Riêng chủng Đ1, hiệu quả ly trích sắc tố không khác biệt có ý nghĩa giữa tỷ lệ dung môi 1/10 g/mL và 1/15 g/mL. Tuy nhiên, xét về cảm quan màu sắc khi ly trích ở hai tỷ lệ này thì có sự khác biệt rõ rệt, màu sắc của dịch ly trích ở tỷ lệ 1/10 g/mL đậm hơn so với tỷ lệ 1/15 g/mL (Hình 2A). Theo Downham & Collins (2000), màu sắc đóng vai trò rất quan trọng và ảnh hưởng đến cảm quan, chất lượng cũng như giá thành của sản phẩm. Vì vậy, ly trích sắc tố đỏ từ chủng vi khuẩn Đ1 với nồng độ MetOH là 100% và tỷ lệ sinh khối dung môi 1/10 g/mL được xem như là điều kiện ly trích cho hiệu quả cao nhất trong điều kiện thí nghiệm.



(A) Chủng Đ1 (B) Chủng V1 (C) Chủng C1

Hình 2. Dịch ly trích sắc tố với MetOH 100% với 4 tỷ lệ 1/10, 1/15, 1/20 và 1/25 (g/mL) tương ứng với các ống nghiệm 1, 2, 3 và 4.

Theo Stafnes & ctv. (2010), MetOH cho hiệu suất chiết carotenoid tổng số tốt nhất so với các dung môi khác. Trong nghiên cứu này, carotenoid từ cả 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều được ly trích hiệu quả nhất ở nồng độ MetOH 100%. Điều này là do khi trộn lẫn MetOH và nước với những tỷ lệ khác nhau thì các hỗn hợp này có độ phân cực khác nhau, nồng độ dung môi có độ phân cực tương đương với hợp chất được trích ly sẽ hòa tan chất đó tốt hơn (Martin & ctv., 1985).

4. Kết Luận

Từ 25 mẫu nước biển đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn sinh sắc tố carotenoid trong đó có 8 chủng sinh sắc tố màu vàng, 2 chủng sinh màu đỏ và 4 chủng sinh màu cam. Các chủng phân lập thuộc 7 chi *Micrococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Exiguobacterium*. Ba chủng *Micrococcus* sp. 64A3a (màu vàng), *Exiguobacterium* sp. YT09 (màu cam) và *Rhodococcus* enclensis strain RSA3 (màu đỏ) có khả năng sinh carotenoid với độ hấp thu lần lượt là 0,75, 0,70 và 0,42 được tuyển chọn để khảo sát điều kiện ly trích sắc tố. Sắc tố carotenoid từ các chủng vi khuẩn tuyển chọn được ly trích với hiệu suất cao khi sử dụng MetOH 100% với tỉ lệ sinh khối/dung môi là 1/10 g/mL.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này là một phần của đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở mã số CS-SV20-CNSH-02 được cấp kinh phí bởi Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Arulselvi, I. P., Umamaheswari, S., Sharma, R. G., Kartik, C., & Jayakrishna, C. (2014). Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *Journal of Food Processing and Technology* 5(1), 292.
- Asker, D. (2017). Isolation and characterization of a novel, highly selective astaxanthin-producing marine bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 9101-9109.
- Asker, D., Awad, S. T., Beppu, T., & Ueda, K. (2018). Rapid and selective screening method for isolation and identification of carotenoid-producing bacteria. *Microbial Carotenoids* 1825,143-170.
- Asker, D., Beppu, T., & Ueda, K. (2007). Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(2), 383-392.
- Bang, H. L., & Van, V. L. (2020). Isolation and selection of carotenoid-biosynthesis bacteria strains from Cam mountain, Tinh Bien district, An Giang province. *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology* 8(117), 157-162.
- Bang, H. L., Huynh, T. H. T., Nguyen, L. T. D., & Nguyen, M. C. (2020). Isolation and selection of carotenoid-biosynthesis *Bacillus* spp. from the Coastal zone of Hon Dat district, Kien Giang province. *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology* 2(111),85-89.
- Bartley, G. E., & Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *The Plant Cell* 7(7), 1027-1038.
- Borisova, R. B. (2011). *Isolation of a Rhodococcus soil bacterium that produces a strong antibacterial compound* (Unpublished master's thesis). East Tennessee State University, Tennessee, USA.
- Burrows, A. (2009). Palette of our palates: a brief history of food coloring and its regulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(4), 394-408.
- Cunningham, W. C., Capar, S. G., & Mindak, W. R. (2015). *Elemental analysis manual for food and related products (section 3.4 special calculations)*. Retrieved May 1, 2021, from <https://www.fda.gov/media/89649/download>.
- Downham A., & Collins P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *Institute of Journal Food Science Technology* 35(1), 5-22.
- Du, H., Jiao, N., Hu, Y., & Zeng, Y. (2006). Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *FEMS Microbiology Ecology* 57(1), 92-105.
- Hosokawa, M., Okada, T., Mikami, N., Konishi, I., & Miyashita, K. (2009). Bio-functions of marine carotenoids. *Food Science and Biotechnology* 18(1), 1-11.
- Huynh, H. H., Le, T. T. L., Nguyen, T. M. L., Le, T. M. P., & Pham, T. H. (2013). Investigation of beta-carotene production from microalgae *Dunaliella* isolated in Vietnam. *Science & Technology Development* 16(1), 43-50.
- Jafarzade, M., Yahya, N. A., Mohamad, S., Usup, G., & Ahmad, A. (2012). Isolation and characterization of pigmented bacteria showing antimicrobial activity from Malaysian marine environment. *Malaysian Journal of Microbiology* 9(2), 152-160.

- Lai, C. S., Wu, J. C., & Pan, M. H. (2015). Molecular mechanism on functional food bioactives for antiobesity. *Current Opinion in Food Science* 2, 9-13.
- Le, B. T., & Huynh, K. Y. (2018). Isolation of some trophic marine microalgae lines capable of producing carotenoids in Ca Mau waters. *Cuu Long University Journal of Sciences* 10, 90-96.
- Leiva, S., Alvarado, P., Huang, Y., Wang, J., & Garrido, I. (2015). Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica. *FEMS Microbiology Letters* 362(24), fnv206.
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advance* 31(8), 1532-1542.
- Martin, A., Wu, P. L., Liron, Z., & Cohen, S. (1985). Dependence of solute solubility parameters on solvent polarity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74(6), 638-642.
- Mohana, D. C., Thippeswamy, S., & Abhishek, R. U. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Protection and Environment* 36(4), 168-174.
- Ram, S., Mitra, M., Shah, F., Tirkey, S. R., & Mishra, S. (2020). Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. *Journal of Functional Foods* 67, 103867.
- Shahidi F., & Ambigaipalan P. (2015). Novel functional food ingredients from marine sources. *Current Opinion in Food Science* 2, 123-129.
- Srilekha, V., Krishna, G., Mahender, P., & Charya, M. S. (2018). Investigation of in vitro cytotoxic activity of pigment extracted from *Salinococcus* sp. isolated from Nellore sea coast. *Journal of Marine Medical Society* 20(1), 31.
- Stafsnes, M. H., Josefsen, K. D., Kildahl-Andersen, G., Valla, S., Ellingsen, T. E., & Bruheim, P. (2010). Isolation and characterization of marine pigmented bacteria from Norwegian coastal waters and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties. *The Journal of Microbiology* 48(1), 16-23.
- Tinoi, J., Rakariyatham, N., & Deming, R. L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry* 40(7), 2551-2557.
- Tran, T. X. M., Nguyen, T. P., Nguyen, T. L., & Nguyen, V. B. (2015). Isolation and identification of thraustochytrid heterotrophic microalga for production of carotenoids. *Can Tho University Journal of Science* 37(1), 57-64.
- Vu, T. T., Tran, H. T., Tran, T. D., & Tran, C. D. (2011). Investigation of Carotenoid formation over time in the vegetative phase of some *Bacillus* strains. *Ho Chi Minh City Medical Journal* 15(1), 211-217.
- Williams, L. J., & Abdi, H. (2010). Fisher's least significant difference (LSD) test. *Encyclopedia of Research Design* 218, 840-853.
- Wu, J. Y., & Liu, Y. S. (2007). Optimization of cell growth and carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. *Biochemical Engineering Journal* 36(2), 182-189.