

TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN THUỘC CHI *PARACOCCLUS* SINH TỔNG HỢP ASTAXANTHIN

Lê Thị Thanh Xuân¹, Phạm Thanh Hà¹, Nguyễn Huy Hoàng², Nguyễn Thị Kim Liên², Nguyễn Thị Diệu Phương³, Nguyễn Quang Huy³, Nguyễn Kim Thoa^{1,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nkthoa@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 02.10.2017

Ngày nhận đăng: 28.4.2018

TÓM TẮT

Astaxanthin (thuộc nhóm carotenoids) không những có vai trò quan trọng trong dinh dưỡng mà còn góp phần tạo nên màu sắc đỏ, làm tăng giá trị thương mại và giá trị thẩm mỹ của một số loài thủy sản như cá hồi, tôm, cá chép koi. Ngoài ra astaxanthin cũng được ứng dụng nhiều trong các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Cho đến nay, astaxanthin được thu nhận chủ yếu từ tảo *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Phaffia rhodozyma*. Bên cạnh đó, một số nhóm vi khuẩn, đặc biệt các loài thuộc chi *Paracoccus* như *P. carotinifaciens*, *P. haeundaensis*... cũng được công bố có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tuyển chọn các chủng thuộc chi *Paracoccus* phân lập từ một số vùng biển và rừng ngập mặn có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin cao nhằm tạo nguồn dinh dưỡng bổ sung vào thức ăn cho một số loại thủy sản. Từ 50 mẫu đất và nước thu thập được chúng tôi đã phân lập được hơn 90 chủng có khả năng sinh tổng hợp các sắc tố, trong đó có 33 chủng Gram âm. Phân tích hỗn hợp carotenoid của các chủng này bằng phương pháp TLC và phương pháp quang phổ cho thấy có 3 chủng C32, C38 và C47 có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin lần lượt đạt 23 mg, 18 mg và 11 mg astaxanthin trên 1 g sinh khối. Dựa vào đặc điểm sinh lý, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA có thể kết luận rằng chúng tôi đã phân lập được chủng vi khuẩn C32 và C38 có đặc điểm giống nhất với loài *P. carotinifaciens* và chủng C47 có đặc điểm giống nhất với loài *P. kocurii*.

Từ khóa: Astaxanthin, chủng vi khuẩn C32, chủng vi khuẩn C38, *Paracoccus carotinifaciens*, vi khuẩn vùng nước lợ

MỞ ĐẦU

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) là sắc tố thuộc nhóm carotenoid, phân bố rộng rãi trong tự nhiên và có mặt trong các mô động vật biển như cá đỏ, cá hồi và tôm hùm biển (Fujita *et al.*, 1983; Johnson, 1991; Nelis, De Leenheer, 1991). Sản phẩm carotenoid này có ứng dụng rộng rãi trong các ngành sản xuất dược phẩm, mỹ phẩm, thực phẩm và đặc biệt đóng vai trò vô cùng quan trọng trong nuôi trồng thủy sản. Astaxanthin tổng hợp từ hai nguồn chính là hóa học và sinh học được nhiều quốc gia trên thế giới cho phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản và thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, các sản phẩm astaxanthin có nguồn gốc sinh học vẫn được ưa chuộng hơn do có mức độ an toàn cao với động

vật nuôi và ít ảnh hưởng tới sức khỏe người tiêu dùng (García-Chavarría, Lara-Flores, 2013).

Có rất nhiều nhóm sinh vật có khả năng tổng hợp astaxanthin, tuy nhiên để sản xuất được một lượng astaxanthin lớn nhằm đáp ứng nhu cầu của thị trường thì chỉ có công nghệ lên men vi sinh vật chiếm ưu thế do có thể hoàn toàn chủ động quy trình, quy mô lên men, đồng thời thời gian sinh trưởng của vi sinh vật ngắn và hiệu suất thu hồi sản phẩm cao... Cho đến nay, các loài vi sinh vật có khả năng tổng hợp astaxanthin được biết đến bao gồm nấm men *Phaffia rhodozyma* (Miller *et al.*, 1976), tảo lục *Haematococcus pluvialis* (Bubrick, 1991), chủng vi khuẩn Gram dương *Brevibacterium* 103 (Lizuka, Nishimura, 1969), vi khuẩn biển Gram âm *Agrobacterium aurantiacum* (Yokoyama *et al.*,

1994), các chủng thuộc chi *Paracoccus* như *P. carotinifaciens* (Tsubokura *et al.*, 1999), *P. haeundaensis* (Lee *et al.*, 2004). Các sản phẩm astaxanthin được sản xuất rộng rãi và thương mại hóa trên thế giới chủ yếu từ tảo *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Phaffia rhodozyma*. Bột tảo *H. pluvialis* có hàm lượng astaxanthin cao là một trong những sản phẩm được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thức ăn cá hồi. Carotenoid của bột tảo *H. pluvialis* có chứa khoảng 70% monoester, 10% diesters của astaxanthin, 5% astaxanthin tự do và phần còn lại bao gồm carotene, canthaxanthin, lutein và các carotenoids khác. Tuy nhiên, việc sử dụng tảo cho sản xuất quy mô công nghiệp bị hạn chế, nguyên nhân chính là do tảo có tốc độ sinh trưởng chậm và chu kỳ sống phức tạp. Hơn nữa, astaxanthin từ tảo *H. pluvialis* khó hấp thụ vì astaxanthin nằm trong nội bào, thành tế bào dày, do đó muốn nâng cao hiệu quả sử dụng phải phá vỡ màng tế bào (Shah *et al.*, 2016).

Năm 1999, Tsubokura *et al.*, công bố phân lập được chủng vi khuẩn đất *P. carotinifaciens* có khả năng tổng hợp chủ yếu astaxanthin trong hỗn hợp carotenoid. Hiện nay sản phẩm astaxanthin Panaferd-AX của Công ty JXTG Nippon Oil & Energy (Nhật Bản) cũng được sản xuất từ loài vi khuẩn này. Ưu điểm của quy trình sản xuất astaxanthin từ vi khuẩn *P. carotinifaciens* so với tảo và nấm men là thời gian lên men ngắn, không quá nhạy cảm về nhiệt độ, thành tế bào mỏng, do vậy dễ phá vỡ để thu hồi astaxanthin thô.

Trong bài báo này chúng tôi đặt mục tiêu tuyển chọn được các chủng thuộc chi *Paracoccus* có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin cao để làm nguyên liệu sản xuất astaxanthin bổ sung cho thức ăn nuôi cá hồi, tôm giống và cá koi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Tập hợp 90 chủng vi khuẩn phân lập ở các vùng biển Hải Phòng, Nam Định, Thanh Hóa, Nghệ An, Đà Nẵng, Nha Trang, Vũng Tàu và rừng ngập mặn Xuân Thủy.

Môi trường

Môi trường nuôi cấy được chuẩn bị với nước lợ (nồng độ muối 1,2-1,5%) / nước biển (nồng độ muối 2-3%) có thành phần như sau (g/L): Peptone 10, cao nấm men 5, pH 7,2-7,5.

Phương pháp

Xác định đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn

Đặc điểm hình dạng tế bào

Tế bào được soi sống bằng kính hiển vi điện tử Olympus có độ phóng đại 4000 lần. Hình dạng tế bào của chủng C32 được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét SEM.

Đặc điểm Gram

Tiến hành nhuộm Gram phân loại sơ bộ các chủng vi khuẩn phân lập được.

Phân loại các chủng vi khuẩn

Sử dụng Kit API (BioMerieux, Pháp)

Các chủng vi khuẩn Gram âm sau khi phân loại sơ bộ bằng đặc điểm hình dạng tế bào, cách sắp xếp tế bào sẽ tiếp tục được phân loại bằng Kit API 20NE theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Giải trình tự gen 16S rRNA

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên dịch lỏng qua đêm ở 28°C-30°C để thu sinh khối tế bào. DNA tổng số của các chủng được tách chiết bằng GeneJET Genomic DNA purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Gen 16S rRNA của các chủng được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Chu trình nhiệt được thực hiện như sau: 95°C 3 min, 35 chu kỳ (95°C 30 s, 52°C 1 min, 72°C 1,5 min), 72°C 5 min. Sản phẩm khuếch đại gen được kiểm tra trên gel agarose 0,8% và được làm sạch bằng GeneJET PCR purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Sau đó các đoạn gen tinh sạch này được giải trình tự bằng máy giải trình tự gen tự động ABI 3500 Bio System (USA). Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự các gen 16S rRNA trong Ngân hàng gen GenBank để xác định mức độ tương đồng với các loài gần nhất. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Định tính astaxanthin trong cặn chiết của tế bào các chủng vi khuẩn

Định tính astaxanthin trong cặn tế bào bằng phương pháp quang phổ

Dịch nuôi cấy (20 mL) các chủng vi khuẩn được chuyển vào ống falcon thể tích 50 mL và ly tâm ở 8000 v/p trong 10 min để thu tế bào, loại bỏ dịch huyền phù. Rửa sạch cặn tế bào bằng nước khử ion

vô trùng và ly tâm ở 8000 v/p trong 10 min để thu tế bào. Bổ sung 5 mL methanol tinh khiết vào ống falcon, sau đó vortex mạnh trong 2 min để hòa cạn tế bào. Phá tế bào bằng sóng siêu âm trong 30 s. Để ống falcon trong tủ lạnh -20°C qua đêm để nâng cao hiệu suất tách chiết carotenoid. Ly tâm ống falcon ở 12000 v/p trong 5 min để loại bỏ cạn tế bào, thu dịch màu phía trên. Tiến hành đo phổ hấp phụ của dịch màu ở dải bước sóng 466-488 nm, sử dụng dung dịch astaxanthin 5% chuẩn (Sigma, USA) làm đối chứng.

Định tính astaxanthin trong cạn tế bào bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng TLC

Dịch nuôi cấy (200 mL) được chiết 3 lần với dung môi etylacetate 100% theo tỷ lệ 1:1 (v/v) bằng thiết bị chiết siêu âm ở 40°C trong 10 min. Dịch chiết được thu gom lại và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm bằng máy cất quay để thu cạn chiết (~ 5 mg dạng keo). Thực hiện chạy sắc ký bản mỏng (TLC) trên bản mỏng tráng sẵn RP18 F254s (Merck, Đức) để phân tích sự có mặt astaxanthin. Dịch chiết tế bào sau khi cất dung môi được hòa lại trong dung môi methanol, dùng vi quản để chấm mẫu lên bề mặt tấm sắc ký, sấy nhẹ tấm sắc ký để dung môi bay hơi khỏi vết chấm trước khi nhúng bản sắc ký vào hệ dung môi sử dụng cho chạy sắc ký. Phát hiện chất cần phân tích bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên trên bản mỏng, sấy khô bản mỏng rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu. Astaxanthin được phát hiện khi trên bản TLC xuất

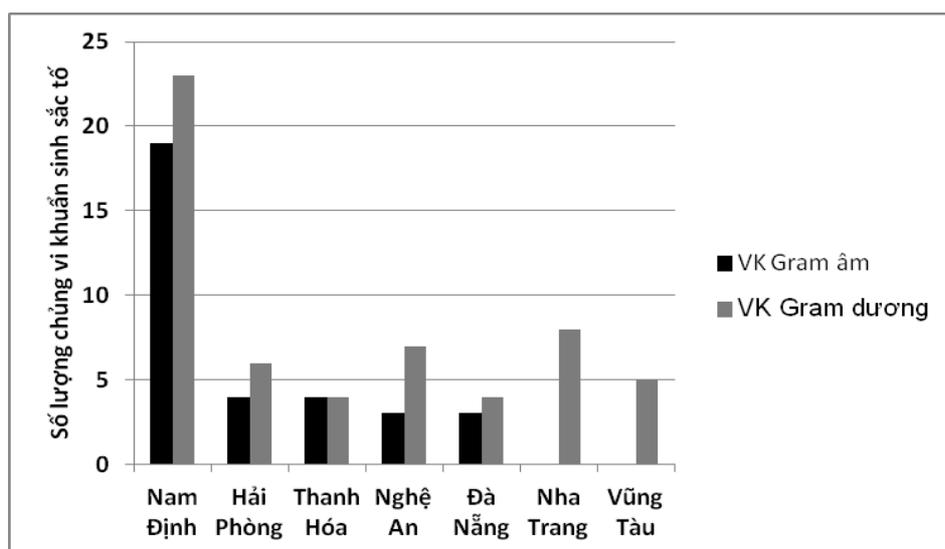
hiện màu cam đỏ đặc trưng khi so sánh với astaxanthin chuẩn.

Xác định hàm lượng astaxanthin trong cạn chiết tế bào của các chủng vi khuẩn bằng phương pháp tách chiết

Dịch nuôi cấy tế bào được chuẩn bị như phần định tính, sau khi thu hồi được cạn chiết tế bào của các chủng, sử dụng các hệ dung môi hữu cơ để tiến hành phân lập và tách chiết astaxanthin. Hoà tan cạn chiết tế bào của các chủng vào 100 mL nước cất và tiến hành chiết phân bố lần lượt với *n*-hexane và etylacetate bằng dụng cụ phễu chiết phân lớp. Các dịch chiết *n*-hexane và etylacetate được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm bằng máy cất quay thu được 3 phân đoạn là *n*-hexane, etylacetate và nước.

Sử dụng phương pháp sắc ký cột (CC) để phân lập được chất astaxanthin tinh khiết: sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha đảo. Phân đoạn etylacetate được phân tách trên cột silica gel pha đảo C18 (YMC-30-50 µm, Fuji Silysia Chemical Ltd.) với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (5/1, v/v) thu được hợp chất astaxanthin sau khi so sánh với chất chuẩn trên sắc ký lớp mỏng (TLC - bản mỏng tráng sẵn RP18 F254s (Merck, Đức).

Các phương pháp định tính và định lượng astaxanthin được thực hiện theo tài liệu của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007).



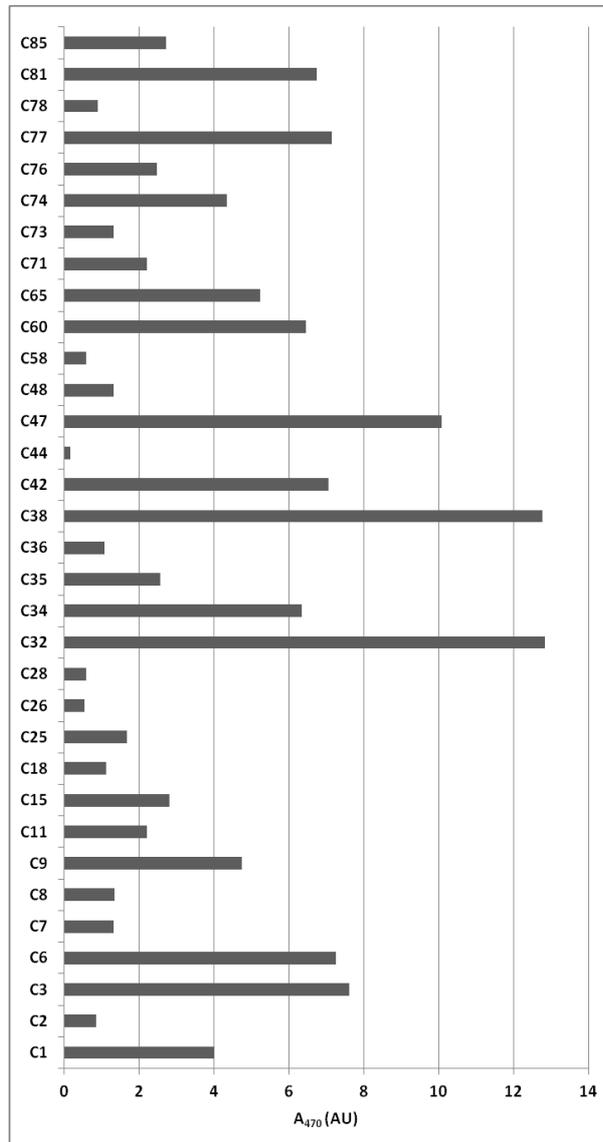
Hình 1. Số lượng các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp các sắc tố từ vàng đến đỏ phân lập ở các vùng biển khác nhau và rừng ngập mặn Xuân Thủy.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn Gram âm sinh sắc tố cam đỏ

Từ tập hợp 90 chủng vi khuẩn sinh tổng hợp các sắc tố từ vàng đến đỏ phân lập được từ các vùng biển khác nhau và rừng ngập mặn Xuân Thủy, 33 chủng vi khuẩn Gram âm (chiếm 36,7%) đã được lựa chọn. Kết quả trên hình 1 cho thấy có sự khác biệt về số lượng và tỷ lệ các chủng vi khuẩn Gram âm và Gram dương khác nhau giữa các vùng sinh thái lấy mẫu.

Kết quả ở hình 1 cho thấy số lượng các chủng vi khuẩn sinh sắc tố được phân lập ở rừng ngập mặn Nam Định cao nhất với 42 chủng trong đó 19 chủng vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm. Các mẫu đất và nước ở Hải Phòng thu được 10 chủng, trong đó 4 chủng Gram âm. Mẫu đất và nước ở Thanh Hóa, Nghệ An, Đà Nẵng phân lập được lần lượt 4, 3 và 3 chủng Gram âm trong khi hai mẫu ở Nha Trang và Vũng Tàu không phân lập được chủng Gram âm sinh sắc tố nào. Hầu hết ở tất cả các mẫu tỷ lệ phân lập được các chủng vi khuẩn sinh sắc tố thuộc nhóm Gram dương cao hơn nhóm Gram âm.



Hình 2. Độ hấp thụ ở bước sóng 470 nm của các dịch màu chiết từ cặn tế bào các chủng vi khuẩn Gram âm sinh sắc tố phân lập ở các vùng biển khác nhau của Việt Nam.

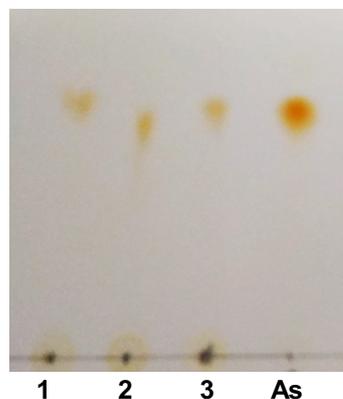
Tuyển chọn các chủng vi khuẩn Gram âm sinh tổng hợp astaxanthin

Các sinh phẩm có màu sắc có thể hấp thụ ánh sáng từ vùng ánh sáng tím đến ánh sáng đỏ (trương đương từ bước sóng 400-700 nm). Nhóm carotenoid hấp thụ ánh sáng xanh, từ bước sóng 440-490 nm, tuy nhiên bước sóng hấp thụ của các loại carotenoid cũng phụ thuộc rất lớn vào dung môi hữu cơ tách chiết và cấu trúc của dạng carotenoid đó. Tokarz *et al.*, (2014) đã chứng minh astaxanthin thu nhận từ tảo lục *H. pluvialis* có độ hấp thụ mạnh nhất ở bước sóng 470-475 nm khi tách chiết bằng dung môi methanol 100%. Khi tách chiết bằng dung môi methanol:nước (1:3, v/v) thì astaxanthin có độ hấp thụ mạnh nhất ở bước sóng 387 nm. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tách chiết cận tế bào bằng methanol tinh khiết và sử dụng dung môi này để hòa tan astaxanthin chuẩn (Sigma, USA). Sử dụng máy đo quang phổ UV-Vis (Eppendorf, USA) quét độ hấp thụ của mẫu astaxanthin chuẩn cho thấy astaxanthin có độ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 470 nm. Dịch màu chiết cận tế bào của các chủng vi khuẩn Gram âm sinh sắc tố từ cam đến đỏ được đo ở bước sóng 470 nm để định tính các chủng sinh tổng hợp astaxanthin (Hình 2).

Kết quả ở hình 2 cho thấy có 3 chủng C32, C38 và C47 có độ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 470 nm (A_{470} lần lượt là 12,827; 12,758 và 10,091). Chủng C32 và C38 phân lập được ở vùng biển Hải Phòng còn chủng C47 phân lập được ở vùng biển Thanh Hóa. Ngoài ra một số chủng như C3, C6, C42, C65 và C77 cũng có độ hấp thụ ở bước sóng 470 nm dao động từ 5-7 AU. Các chất màu thuộc nhóm carotenoid, bên cạnh astaxanthin, một số các chất màu khác như β -caroten, canthaxanthin... cũng có ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và nuôi trồng thủy sản. Các chủng vi khuẩn phân lập được từ các vùng biển khác nhau ngoài việc có thể sinh tổng hợp astaxanthin cũng có thể tổng hợp các hợp chất carotenoid khác trong dịch màu, do đó cần phải có những phân tích sâu hơn về thành phần dịch màu chiết.

Dịch chiết cận tế bào của 3 chủng C32, C38 và C47 sau khi được tách chiết bằng dung môi ethylacetate đều có chứa astaxanthin khi được kiểm tra định tính bằng phương pháp TLC. Hàm lượng astaxanthin được xác định bằng phương pháp tách chiết, sản phẩm là hợp chất sạch astaxanthin thu được có đặc trưng bột màu đỏ, không mùi, tan trong các dung môi hữu cơ và nước. Kết quả của bản TLC ở hình 3 cho thấy cả 3 mẫu chấm của các chủng C32,

C38 và C47 đều xuất hiện vạch tương đương với mẫu chấm astaxanthin chuẩn và có $R_f = 0.63$ (retention factor - hệ số lưu).



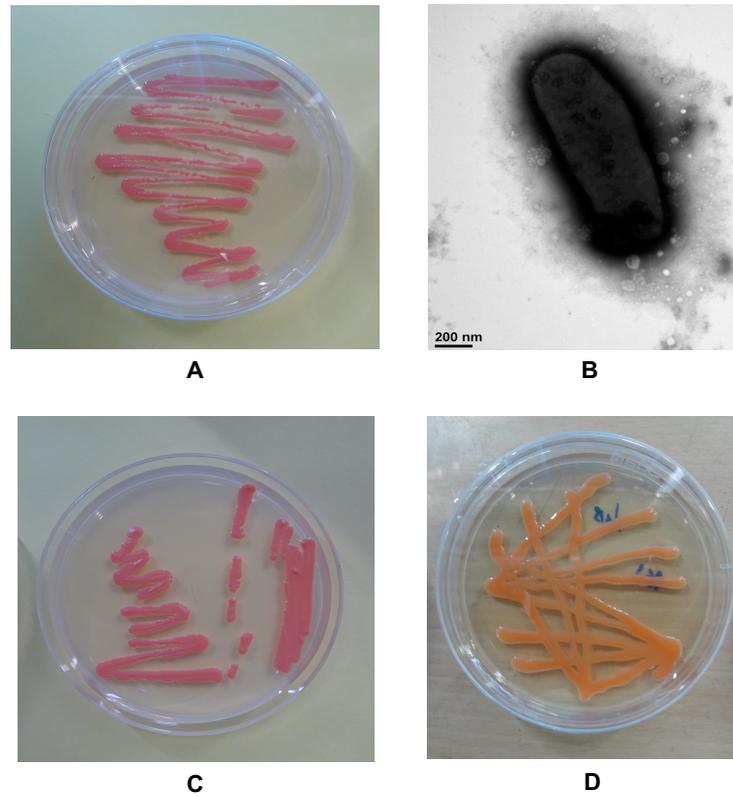
Hình 3. Phân tích hàm lượng astaxanthin của các chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng phương pháp TLC. Chấm 1: Chủng C47, 2: Chủng C32; 3: Chủng C38, As: mẫu chấm astaxanthin chuẩn (Sigma, USA)

Định lượng hàm lượng astaxanthin trong cận tế bào chủng C32, C38 và C47

Dựa vào kết quả nghiên cứu tách chiết cho thấy, cùng một thể tích dịch nuôi cấy lỏng ban đầu của các chủng, sau khi ly tâm thu sinh khối và sử dụng các dung môi hữu cơ để tách chiết sẽ xác định được hiệu suất và hàm lượng astaxanthin có trong các chủng vi khuẩn. Theo phương pháp tách chiết thì hàm lượng astaxanthin của chủng C47 được xác định là khoảng 11 mg trong 1 g sinh khối, đặc biệt hàm lượng astaxanthin của hai chủng C32 và C38 tích lũy được lần lượt 23 và 18 mg. Mức độ tích lũy astaxanthin của 2 chủng C32 và C38 tương đương với hàm lượng astaxanthin trong chế phẩm Panaferd-AX từ chủng *P. carotinifaciens* của Công ty JXTG Nippon Oil & Energy (Nhật Bản).

Phân loại các chủng C32, C38, C47

Quan sát hình dạng, màu sắc khuẩn lạc 3 chủng C32, C38, C47 và hình dạng tế bào chủng C38 (Hình 4) cho thấy cả 3 chủng là các chủng vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, hình que, không sinh bào tử. Trên môi trường dinh dưỡng khuẩn lạc vi khuẩn có màu từ cam đến đỏ, tròn, bề mặt nhẵn mịn. Cả ba chủng đều có thể sinh trưởng ở nhiệt độ 20°C-37°C, sinh trưởng tối ưu ở 25°C-30°C. Các chủng đều có khả năng sinh trưởng từ pH 6.0 - 9.0, pH tối ưu cho sinh trưởng là 6.5-7.5.



Hình 4. Hình dạng, màu sắc khuẩn lạc của các chủng C32 (A), C38 (C) và C47 (D). Hình dạng tế bào chủng C32 (B).

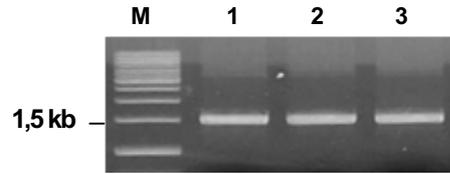
Bảng 1. Đặc điểm sinh hóa của các chủng C32, C38 và C47 (theo tiêu chuẩn của Kit API 20NE).

Đặc điểm sinh hóa	Chủng C32	Chủng C38	Chủng C47
ONPG	+	+	+
ADH	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
CIT	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
VRE	-	-	-
TDA	-	-	-
ZND	-	-	-
VP	+	+	w
GEL	-	-	+
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	w	w	+
SOR	-	-	-
RMA	w	w	+
SAC	+	+	+
MEL	-	-	+
AMY	-	-	+
ARA	w	w	+

Ghi chú: (+). Có phát triển; (-). Không phát triển; (w). Phát triển yếu.

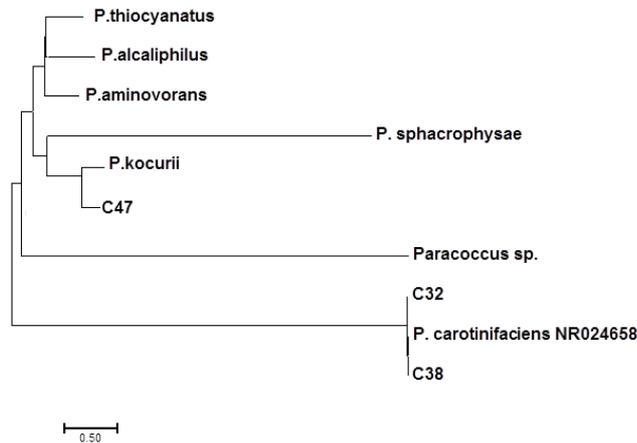
Ba chủng C32, C38 và C47 tiếp tục được phân loại bằng Kit API 20NE. Kết quả được xử lý bằng phần mềm APIweb™ thể hiện ở bảng 1 cho thấy cả 3 chủng đều có đặc điểm giống chi *Paracoccus* với chỉ số index > 95%. Tuy nhiên, để phân loại các chủng đến loài cần thiết phải giải trình tự gen 16S rRNA của ba chủng này.

Các đoạn gen 16S rRNA của chủng C32, C38 và C47 được khuếch đại các bằng cặp mồi 27F/1492R. Sản phẩm khuếch đại gen được kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 5) cho thấy sản phẩm được khuếch đại đặc hiệu ở cả 3 mẫu có kích thước khoảng 1,5 kb, các đoạn DNA sắc nét, không bị gãy.



Hình 5. Sản phẩm khuếch đại gen 16S rRNA của 3 chủng C32 (1), C38 (2) và C47 (3). M: marker 1 kb.

Trình tự đoạn 16S rRNA của các chủng nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Chromas, so sánh và sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA 7 cho thấy chủng C32 và C38 có quan hệ gần nhất (99%) với loài *P. carotinifaciens* NR024658. Chủng C47 có quan hệ gần nhất với loài *P. kocurii* (95%) (tương ứng) (Hình 6).



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7 với các chủng C32, C38 và C47.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 chủng C32, C38 và C47 có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin lần lượt là 2,3%, 1,8% và 1,1%. Dựa vào đặc điểm sinh lý, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA, chủng vi khuẩn C32 và C38 có đặc điểm giống nhất với loài *P. carotinifaciens* và chủng C47 có quan hệ gần nhất với loài *P. kocurii*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cho đề tài “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm giàu astaxanthin có nguồn gốc từ vi khuẩn *Paracoccus carotinifaciens* bổ sung vào thức ăn cá cảnh, cá hồi và tôm bố mẹ”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bubrick P (1991) Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresour Technol* 38: 237–239.
- Fujita T, Satake M, Watanabe T, Kitajima C, Miki W, Yamaguchi K, Konosu S (1983) Pigmentation of cultured red sea bream with astaxanthin diester purified from krill oil. *Nippon Suisan Gakkaishi* 49: 1855–1865.
- García-Chavarría M, Lara-Flores M (2013) The use of carotenoid in aquaculture. *Research J Fisheries Hydrobiol* 8(2): 38–49.
- Johnson EA (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol* 11: 297–326.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874.

- Lee JH, Kim YS, Choi TJ, Lee WJ, Kim YT (2004) *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin - producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1699–1702.
- Lizuka H, Nishimura Y (1969) Microbiological studies on petroleum and natural gas. X. Carotenoid pigments of hydrocarbon- utilizing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 15: 127–134.
- Miller MW, Yoneyama M, Soneda M (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int J Syst Bacteriol* 26: 286–291.
- Nelis HJ, De Leenheer AP (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J Appl Bacteriol* 70: 181–191.
- Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB ĐH Quốc Gia TP.HCM.
- Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ and Daroch M (2016) Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci* 7: 531. doi: 10.3389/fpls.2016.00531.
- Tokarz D, Cisek R, El-Ansari O, Espie GS, Fekl U, Barzda V (2014) Organization of astaxanthin within oil bodies of *Haematococcus pluvialis* studied with polarization-dependent harmonic generation microscopy. *PLoS One* 9: e107804.
- Tsubokura A, Yoneda H, Mizuta H (1999) *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int Syst Bacteriol* 49: 277–282.
- Yokoyama A, Izumida H, Miki W (1994) Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1842–1844.

SELECTION OF BACTERIAL STRAINS BELONGING TO THE ASTAXANTHIN PRODUCING *PARACOCCLUS* GENUS

Le Thi Thanh Xuan¹, Pham Thanh Ha¹, Nguyen Huy Hoang, Nguyen Thi Kim Lien², Nguyen Thi Dieu Phuong³, Nguyen Quang Huy³, Nguyen Kim Thoa¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Research Institute for Aquaculture No1, Ministry of Agriculture & Rural Development*

SUMMARY

Astaxanthin, a member of the carotenoid group, is an important additive not only in feed nutrition but also in providing the red color of salmon meat, cooked shellfish and koi fish. This leads to an increase in the commercial and aesthetic values for those aquatic products. In addition, astaxanthin is widely used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Nowadays, astaxanthin has been mainly extracted from *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. Moreover, some bacterial groups, especially *Paracoccus* genus including *P. carotinifaciens*, and *P. haeundaensis* have also been reported to synthesize a high level of astaxanthin. In this study, a number of bacterial strains belonging to *Paracoccus* genus isolated from several in-shore regions of Vietnam have been screened to find high astaxanthin producing strains for aquatic feed production. More than 90 colourful biosynthesis strains were isolated from 50 soil and water samples in different beaches and ramsa, of which 33 strains belong to negative bacterial group. Analysis of the extracted carotenoid mixtures obtained from the pellets of those strains by UV-Vis spectrophotometer and TLC reveals that 3 strains including C32, C38 and C47 are able to yield a high level of astaxanthin at 23 mg, 18 mg, and 11 mg astaxanthin per 1 g biomass, respectively. Based on the physiological, biochemical and 16S rRNA gene sequence, the C32 and C38 strains are most related to *P. carotinifaciens* whereas the C47 strain is most closely to *P. kocurii*.

Keywords: *Astaxanthin, bacteria from brackish water, Paracoccus carotinifaciens, the C32 strain, the C38 strain*