

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TẠO XANTHAN CỦA VI KHUẨN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PHÂN LẬP ĐƯỢC Ở VIỆT NAM

Đoàn Duy Lộc, Cao Văn Thắng, Nguyễn Thị Mỹ Lan, Lê Thị Mỹ Phước
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG –HCM

1. GIỚI THIỆU

Các polysaccharide có tính chất làm đông đặc thường được chiết xuất từ thực vật hay tảo biển, những hợp chất này có tên là gum. Tính chất và năng suất của các hợp chất này thường phụ thuộc vào những điều kiện khó kiểm soát, ví dụ như thời tiết, môi trường, đất đai, nhân công lao động, ... và những điều này sẽ ảnh hưởng đến giá thành của sản phẩm[4].

Ngày nay, việc sản xuất các hợp chất cao phân tử từ vi sinh vật là một khám phá quan trọng. Quá trình sản xuất này không phụ thuộc vào mùa màng, điều kiện khí hậu hay nguồn nước. Những sản phẩm này được kiểm soát và có tính chất ổn định, được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp[1]. Xanthan gum là một polysaccharide giữ một vai trò quan trọng trong những ngành công nghiệp ứng dụng gum như công nghiệp thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm, công nghiệp dầu mỏ và nhiều ngành công nghiệp khác[2]. Đây là loại polysaccharide ngoại bào, được tạo ra từ loài vi khuẩn chi *Xanthomonas*.

Xanthomonas là chi vi khuẩn gây bệnh điển hình trên các cây họ cải, hồ tiêu và dâu tây[3]. Tuy nhiên, hiện nay người ta không chỉ quan tâm đến khả năng gây bệnh trên thực vật của các loài vi khuẩn thuộc chi *Xanthomonas* mà còn bắt đầu chú ý đến lợi ích kinh tế của chúng[8]. Hầu hết các loài thuộc chi *Xanthomonas* đều có khả năng tạo xanthan.

Kể từ khi được phát hiện, xanthan đã thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Cho đến nay, người ta vẫn không ngừng cải tiến các tính chất của xanthan để mở rộng thêm những ứng dụng của chúng trong công nghiệp. *Tuy nhiên, ở Việt Nam lĩnh vực nghiên cứu này còn khá mới mẻ, chưa có một công trình nào nghiên cứu về xanthan được công bố.*

2.VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP:

2.1.Phân lập các chủng vi khuẩn *Xanthomonas*

Phân lập trên các môi trường mFS[10], mCS20ABN, NSCAA[7] chọn lọc cho vi khuẩn *Xanthomonas* các mẫu:

- ØHạt cải xà lách (*Lactuca saliva*) - Hóc Môn.
- ØHạt cải bẹ xanh (*Brassica juncea*) - Bình Phước.
- ØHạt cải củ (*Raphanus salivus*) - Bình Phước.
- ØLá bắp cải (*Brassica oleracea*) - Đà Lạt.

2.2.Định danh vi khuẩn phân lập được[3]

Quan sát hình thái khuẩn lạc, quan sát hiển vi, thực hiện các test sinh lý sinh hóa như: khả năng phân giải tinh bột, thử nghiệm catalase, oxidase, khả năng hình thành nitric, khả năng phân giải gelatin, khả năng làm đông tụ sữa, khả năng tạo sắc tố nâu trên môi trường thạch nước chiết thịt, khả năng chịu muối, khả năng sinh H₂S, khả năng lên men sinh acid từ các nguồn đường khác nhau, Dựa vào khóa phân loại của Bergey để định danh đến loài các chủng vi khuẩn phân lập được.

2.3.Khảo sát khả năng tạo xanthan của vi khuẩn phân lập được[5,7,10]

Thử khả năng tạo xanthan ở các chủng được xác định là *Xanthomonas campestris*.

2.4. Khảo sát một số đặc tính lý hóa của xanthan thu nhận được[9]: kiểm tra sản phẩm tủa bằng kiểm chứng acid pyruvic, khảo sát độ nhớt của các chế phẩm xanthan thô, khảo sát ảnh hưởng của độ pH lên độ nhớt của xanthan.

2.5. Bước đầu khảo sát khả năng ổn định của xanthan trong nước quả[2,6] : bổ sung xanthan 0,1% vào nước cam ép. Theo dõi sự ổn định về màu sắc, chất lượng nước quả sau 2 tuần.

2.6. Thử độc tính cấp trên chuột: cho chuột uống nước cam có bổ sung xanthan 0,1%. Theo dõi sự phát triển của chuột sau 2 tuần.

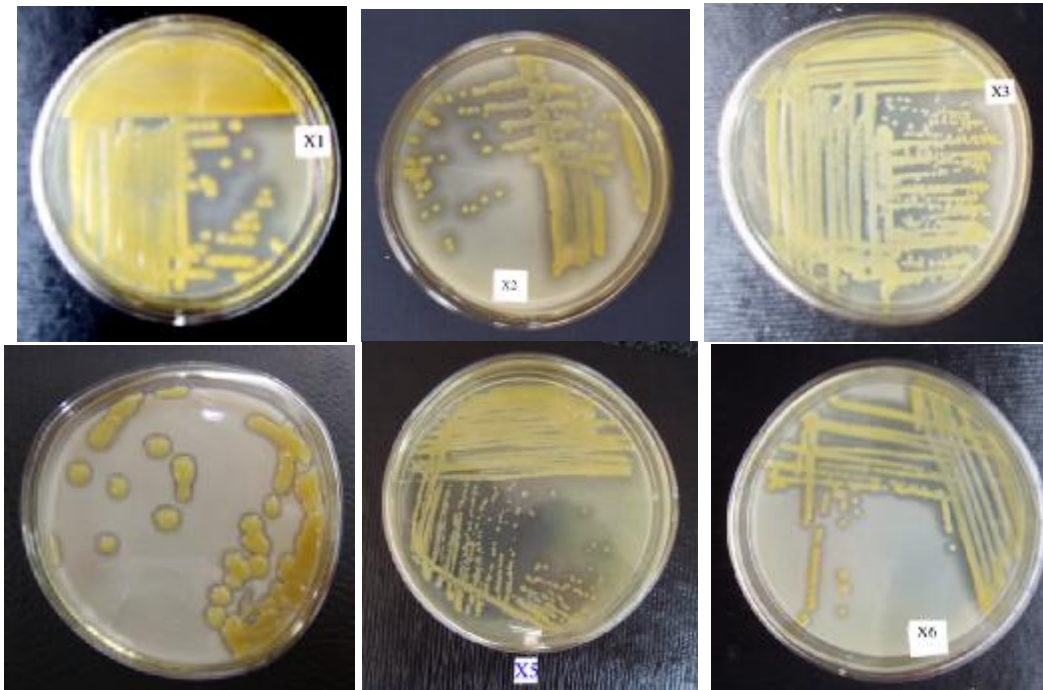
- o Nguồn gốc chuột thí nghiệm: Viện Pasteur TP HCM.
- o Các chuột thí nghiệm có trọng lượng trung bình 26gram/con.
- o Mỗi lô thí nghiệm sử dụng 10 con chuột.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính giá trị trung bình.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN:

3.1. Phân lập và định danh vi khuẩn

Từ mẫu lá bắp cải bệnh, hạt cải xà lách, hạt cải bẹ xanh, hạt cải củ trôi lên các môi trường phân lập mFS, mCS20ABN, NSCAA, chúng tôi thu được nhiều khuẩn lạc vi khuẩn. Từ đó, chọn được 6 chủng có các đặc điểm: khuẩn lạc nhỏ, màu vàng, bóng, nhầy nhót, có vòng phân giải tinh bột, ký hiệu là X1, X2, X3, X4, X5, X6. Các khuẩn lạc này được làm thuần nhiều lần và sau đó được tiến hành quan sát hiển vi và kiểm tra các đặc tính sinh lý, sinh hóa của chúng.



Hình 1: Các khuẩn lạc của các chủng X1, X2, X3, X4, X5, X6

Chúng đều hình que, gram âm, di động, kích thước $0.4-0.7 \times 0.7-1.8 \mu\text{m}$, tồn tại ở dạng đơn lẻ, catalase (+), oxidase (-) hoặc (+) yếu, không khử nitrate. Dựa vào khóa phân loại của Bergey, kết luận : thuộc chi *Xanthomonas*.

3.2. Định danh các vi khuẩn phân lập được:

Bảng 1: Các kết quả thử nghiệm sinh hóa

Đặc tính	X1	X2	X3	X4	X5	X6
Khả năng phân giải tinh bột	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	+	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+

Khử nitrate thành nitrite	-	-	-	-	-	+
Khả năng làm đông tụ sữa	+	+	+	+	+	+
Phân giải gelatin	+	+	+	+	+	+
Tạo sắc tố nâu trên môi trường thạch nước chết thịt	-	-	-	-	-	-
Chịu nồng độ muối cao nhất %	Lần 1 3	Lần 2 4	Lần 3 5	Lần 3 5	Trung bình 0,5	2
X1	Galactose 1,7864	+	2,5792	+	-	2,3341
	Maltose	+	-	-	+	+
X2	Sucrose 1,5030	-	1,1208	-	-	1,4153
X2	Manitol	-	-	-	+	-
X3	Lactose 0,9604	+	1,5250	+	-	1,4247
					+	1,3033

Quy ước : (+) : thử nghiệm là dương tính.

(-) : thử nghiệm là âm tính.

Từ kết quả các kiểm tra sinh hóa, sinh lý, bước đầu chúng tôi xác định:

+ X1, X2, X3 : *Xanthomonas campestris*.

+ X6 : *Xanthomonas maltophilia*.

+ X4, X5 : chưa xác định được đến loài.

3.3.Lên men tạo xanthan: thử khả năng tạo xanthan ở 3 chủng được xác định là *Xanthomonas campestris* đó là các chủng X1, X2, và X3. Kết quả:

Bảng 2: Kết quả thu xanthan thô

Cả 3 chủng X1, X2 và X3 đều có khả năng tạo xanthan, X1 có khả năng tạo xanthan nhiều nhất, xanthan của X3 nhớt nhất.

Các xanthan thu được đều có màu kem hơi vàng, nhớt, dễ tan trong nước, không tan trong cồn.

Trong quá trình lên men, dịch lên men có màu vàng sáng, lượng sinh khối tăng dần lên làm cho dịch lên men trở nên sánh lại.



Hình 2: Xanthan thô

3.3.Khảo sát một số đặc tính lý hóa của xanthan thu được

3.3.1.Kiểm tra sản phẩm tủa bằng kiểm chứng acid pyruvic

Xanthan gum dương tính khi mẫu chứa hơn 1,5% trọng lượng acid pyruvic và âm tính khi chứa ít hơn 1,5% trọng lượng acid pyruvic. Mẫu ở đây sử dụng 4mg tức là trong mẫu phải cần có

nồng độ acid pyruvic lớn hơn hoặc bằng 0,00006 tương đương với giá trị OD lớn hơn hoặc bằng 0,018.

Bảng 3: Giá trị OD và nồng độ acid pyruvic của các sản phẩm được tạo ra từ chủng X_1 , X_2 , X_3

Chủng và môi trường	OD _{375nm}	Nồng độ acid pyruvic .10 ⁻⁴ (%)
X_0	0,084	3,0
X_1	0,073	2,6
X_2	0,062	2,2
X_3	0,078	2,8

Từ bảng số liệu ta thấy, cc chế phẩm xanthan thô đều là xanthan dương tính.
 X_3 tạo xanthan có nồng độ acid pyruvic cao nhất, chỉ thấp hơn xanthan chuẩn 0,2%.

3.3.2.Xác định độ nhớt của các chế phẩm xanthan thô:

Bảng 4. Độ nhớt của các dung dịch xanthan thô

Chủng	Độ nhớt trung bình (Cp)
X_0	5,03
X_1	3,69
X_2	3,12
X_3	3,89

Từ bảng số liệu cho thấy: Các dung dịch xanthan thô thu được từ các chủng khác nhau đều có độ nhớt gần như nhau nhưng thấp hơn so với sản phẩm xanthan chuẩn.

3.3.3.Khảo sát ảnh hưởng của pH lên độ nhớt của xanthan:

Độ nhớt của các chế phẩm xanthan thô đều không thay đổi trong dãy pH khảo sát từ 2 đến 12 (nghiệm đúng so với nghiệm thức mẫu đối chứng là xanthan chuẩn). Điều này cho thấy độ nhớt của xanthan ổn định với sự thay đổi độ pH trong khoảng rộng.

3.4.Bước đầu khảo sát khả năng làm ổn định nước quả của xanthan

Nước cam có bổ sung xanthan chuẩn: sau hai tuần vẫn sử dụng được bình thường, không bị lên men. Nước cam vẫn giữ được màu ban đầu, không bị tách ra thành hai lớp như nước cam không bổ sung xanthan.

Nước cam có bổ sung sản phẩm xanthan thô: sau hai tuần vẫn sử dụng được bình thường, không bị lên men. Nước cam vẫn giữ được màu ban đầu, cho trạng thái ổn định giống như xanthan chuẩn.

Như vậy, xanthan có khả năng giữ cho dung dịch nước cam ở trạng thái ổn định.



Hình 3: Nước cam ngày đầu tiên



Hình 4: Nước cam ép sau 14 ngày

3.5. Thử độc tính cấp trên chuột

Cho chuột uống nước cam có bổ sung xanthan chuẩn và xanthan thô. Theo dõi sau 2 tuần, các con chuột đều có biểu hiện bình thường.

Bảng 3: Trọng lượng và trạng thái của chuột thí nghiệm

Mẫu	m_0 (g)	$m_{1\text{tuần}}$ (g)	$m_{2\text{tuần}}$ (g)	Trạng thái sinh lý của chuột
Nước (đối chứng)	25,8	27,1	28,0	Bình thường
Nước cam	25,9	26,7	27,9	Bình thường
Nước cam + X_c	26,0	27,2	28,1	Bình thường
Nước cam + X_t	26,1	27,1	28,0	Bình thường

Điều này cho thấy xanthan không có độc tính cấp trong thời gian thí nghiệm.

4. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu nhận được, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Phân lập vi khuẩn từ 4 nguồn mẫu thực vật là hạt cải củ, hạt cải xà lách, hạt cải bẹ xanh và lá bắp cải trên các môi trường mFS, mCS20ABN, NSCAA chọn lọc cho vi khuẩn *Xanthomonas*, khảo sát về các đặc tính sinh lý sinh hóa, hình thái khuẩn lạc và tế bào và khả năng tạo xanthan của các chủng thu được, chúng tôi xác định được:

- Chủng X_1 , X_2 , X_3 thuộc loài *Xanthomonas campestris*.
- Chủng X_6 thuộc loài *Xanthomonas maltophilia*.
- Chủng X_4 , X_5 thuộc chi *Xanthomonas*, chưa xác định được đến loài.

- Ba chủng vi khuẩn *Xanthomonas campestris* phân lập được đều có khả năng tạo xanthan, X_1 có khả năng tạo xanthan nhiều nhất

- Khảo sát một số đặc tính lý hóa, cho thấy chế phẩm xanthan thô thu được có đầy đủ các tính chất nhưng còn thấp hơn so với xanthan chuẩn.

- Bước đầu khảo sát khả năng ổn định của xanthan trong nước quả, sau 2 tuần thí nghiệm, nước cam vẫn cho màu ổn định giống như khi sử dụng xanthan chuẩn.

- Xanthan thu được không gây độc tính cấp trên chuột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Ash SG, *Polymers from microbes: the polysaccharide gums*. Shel Polym 9: 18±2, (1985).
- [2]. Becker A, Katzen F, Pühler A, Ielpi L, *Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective*. Appl Microbiol Biotechnol; 50:145–52, (1998).
- [3]. Bradbury JF, Genus II, *Xanthomonas*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 199_/211, (1994).
- [4]. Brandford PA, Baird J., In: Aspinall GO, editor. *The polysaccharides*, vol. 2. New York: Academic Press, 411–90, (1983).
- [5]. Félix García-Ochoa, Vitoria E. Santos, and José A. Casas. *Production and isolation of xanthan gum from Methods in Biotechnology*, Vol.10: *Carbohydrate Biotechnology Protocols* Edited by: Bucke, Christopher, Humana Press Inc., Totowa, NJ, (1998).
- [6]. *Food additives permitted for direct addition to food for human consumption*, Food and Drug Administration, the U.S. Government Printing Office via GPO Access, p66-67, (2001).
- [7]. Kennedy JF, Jones P, Barker SA., *Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of Xanthomonas campestris culture*. Enz Microb Technol; 4:39–43, (1982).
- [8]. Lawson CJ, Sutherland IW., (1978), In: Rose AH, editor. *Economic Microbiology*, vol. 2. New York and London: Academic Press, 327–92.
- [9]. Leela JK, Sharma G., *Studies on xanthan production from Xanthomonas campestris*. Bioprocess Eng; 23(6):687 /9, (2000).
- [10]. Lo YM, Yang ST, Min DB. *Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of Xanthomonas campestris*. Appl Microbiol Biotechnol; 47(6):689_/94, (1997).