



## PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI TẢO BIỂN DƯỠNG THRAUSTOCHYTRID SẢN XUẤT CAROTENOID

Trần Thị Xuân Mai<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Pha<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Liên<sup>1</sup> và Nguyễn Văn Bé<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Phòng Hợp tác Quốc tế, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 31/07/2014

Ngày chấp nhận: 27/04/2015

### Title:

Isolation and identification of thraustochytrid heterotrophic microalga for production of carotenoids

### Từ khóa:

*Aurantiochytrium* sp., Carotenoid, Thraustochytrid, vi tảo biển dị dưỡng, xác định trình tự

### Keywords:

*Aurantiochytrium* sp., carotenoid, heterotrophic microalga, sequencing, Thraustochytrid

### ABSTRACT

Carotenoids, an important class of natural pigments, can be used in various fields including medicine, cosmetics, feed stock and food industry. In recent years, the increase of consumer demand for carotenoids obtained from natural sources has promoted major efforts to improve carotenoid production from biological sources, thus opening opportunities for microalgae development. In this study, a heterotrophic microalga, strain BCM05, with the ability to produce carotenoids was successfully isolated from decayed *Sonneratia* leaves at marine habitat in Ca Mau province. Determination of cell dry weight is a time-consuming process, to overcome this problem, a calibration curve reflecting the relation between the optical density and cell dry weight from BCM05 strain was established. Total carotenoid of strain BCM05 was found to be 7569 $\mu$ g/kg of dry cell weight. The results of the analysis of a part from the region of the 18S rRNA gene showed that there was a 97% similarity of the 18S rRNA gene from BCM05 to *Aurantiochytrium* sp. B072 (JF266572). Phylogenetic tree analysis by using MEGA software version 5.05 with a high bootstrap value of 1000 replicates, strain BCM05 was determined and named as *Aurantiochytrium* sp. BCM05. These results suggested that this strain could be considered as a potential source for aquaculture feed additives or large scale production of carotenoids.

### TÓM TẮT

Carotenoid, một loại quan trọng của các sắc tố tự nhiên, có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau bao gồm y học, mỹ phẩm, thức ăn chăn nuôi và công nghiệp thực phẩm. Trong những năm gần đây, sự gia tăng nhu cầu sử dụng carotenoid từ các nguồn tự nhiên đã thúc đẩy nhiều nỗ lực lớn để cải thiện sản xuất carotenoid từ các nguồn sinh học, do đó mở ra cơ hội phát triển vi tảo. Trong nghiên cứu này, một loại vi tảo biển dị dưỡng, dòng BCM05 có khả năng sản xuất carotenoid đã được phân lập thành công từ các mẫu lá bần đang trong giai đoạn phân hủy ở rừng ngập mặn của tỉnh Cà Mau. Xác định trọng lượng khô sinh khối tế bào là một tiến trình mất nhiều thời gian, do đó một đường chuẩn cho sự tương quan giữa trọng lượng sinh khối khô với mật độ quang của dòng BCM05 đã được xây dựng. Hàm lượng carotenoid tổng số của dòng BCM05 là 7.600 $\mu$ g/kg trọng lượng khô. Kết quả phân tích trình tự một phần vùng gen 18S rRNA của dòng BCM05 đã cho thấy có 97% đồng hình với trình tự của loài *Aurantiochytrium* sp. B072. Qua phân tích cây phả hệ bằng phần mềm MEGA 5.05 và sử dụng giá trị bootstrap cao với 1.000 lần lặp lại, dòng BCM05 đã được xác định và được đặt tên là *Aurantiochytrium* sp. BCM05. Dòng vi tảo này có thể được xem là nguồn vi tảo tiềm năng để sử dụng làm thức ăn bổ sung cho động vật thủy sản hoặc để sản xuất carotenoid với số lượng lớn.

## 1 MỞ ĐẦU

Thraustochytrid thuộc lớp Labirinthula, ngành Heterokonta, giới Chromista, là nhóm vi tảo biển dị dưỡng đơn bào. Tế bào của chúng thường có hình ovan hoặc hình cầu. Các chi thuộc nhóm Thraustochytrid bao gồm *Thraustochytrium*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia*, *Aurantiochytrium* và có khoảng 40 loài. Chúng được tìm thấy phổ biến ở các môi trường như biển hay các cửa sông và đóng vai trò quan trọng trong các hệ sinh thái này. Thraustochytrid gần đây được chú ý đến nhiều do chúng có khả năng sản xuất ra nhiều hợp chất sinh học rất quý trong đó có acid béo không bão hòa omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) bao gồm docosahexaenoic acid (DHA) và eicosapentaenoic acid (EPA), cả hai hợp chất này rất quan trọng cho sức khỏe con người cũng như trong ngành nuôi trồng thủy sản (Jain *et al.*, 2007; Fan *et al.* 2007, Raghukumar, 2008) và gần đây nhiều nghiên cứu đã phát hiện các loài thuộc nhóm vi tảo này có thể sản xuất carotenoid như  $\beta$ -caroten, Phoenicoxanthin, astaxanthin và canthaxanthin (Yamaoka *et al.*, 2004, Yokoyama and Honda, 2007), cũng chính vì vậy mà nhóm Thraustochytrid đang được ứng dụng rộng rãi như nguồn thức ăn bổ sung cho tôm, cá (Yamasaki *et al.*, 2007).

Carotenoid là nhóm sắc tố hòa tan trong chất béo, không tan trong nước, có màu từ vàng nhạt tới đỏ sậm tùy cấu trúc phân tử, có trong tự nhiên được tìm thấy ở thực vật, tảo, một vài loài nấm và một vài loài vi khuẩn (Ishida and Chapman, 2004). Hiện nay, người ta đã tìm được khoảng 600 loại carotenoid, sắp xếp theo hai nhóm, xanthophyll (có chứa oxy) và carotene (có chứa chuỗi hydrocarbon nhưng không chứa oxy). 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 cho tôm, cá,... (Jorgensen and Skibsted, 1993). Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu đã chứng minh các carotenoid với vai trò là chất chống oxy hóa đã mang lại lợi ích cho sức khỏe con người bằng cách ngăn ngừa các bệnh như ung thư, xơ cứng động mạch, đục thủy tinh thể và một số bệnh khác. Do đó, carotenoid đã được nghiên cứu và ứng dụng rất nhiều trong lĩnh vực dược, mỹ phẩm (Olson, 1999). Theo báo cáo gần đây giá trị của carotenoid trên thị trường thế giới đang gia tăng, năm 2010 được đánh giá là khoảng 1,2 tỉ USD và có thể lên đến 1,4 tỉ USD trong năm 2018 (<http://www.bccresearch.com>). Do nhu cầu của người tiêu dùng ngày càng ưa chuộng sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc thiên nhiên đã tạo cơ

hội cho sự phát triển của vi tảo bởi vì chúng là một trong những nguồn có khả năng sản xuất carotenoid. Hiện nay, nguồn vi tảo sản xuất carotenoid phân bố rộng rãi trong tự nhiên, việc sử dụng vi tảo có nhiều ưu thế như chúng phát triển đơn giản, vòng đời ngắn, năng suất cao (Chisti, 2007), điều quan trọng nữa là dễ nuôi cấy ở quy mô lớn, tăng trưởng nhanh và sử dụng cơ chất dễ tiền (Bhosale, 2004). Trong những năm gần đây, việc sử dụng các loài vi tảo biển dị dưỡng Thraustochytrid để sản xuất acid béo không no và carotenoid đang ngày càng được quan tâm vì các loài tảo này dễ nuôi cấy và không yêu cầu các yếu tố cần thiết trong nuôi cấy như điều kiện ánh sáng, nguồn CO<sub>2</sub> (Ratledge, 1993). Ở Việt Nam, những nghiên cứu về vi tảo biển dị dưỡng và ứng dụng của nó còn khá hạn chế. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và nhận diện dòng vi tảo dị dưỡng Thraustochytrid có khả năng sản xuất carotenoid ở vùng biển tỉnh Cà Mau.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Các mẫu lá bần (*Sonneratia caseolaris* L.) đang trong giai đoạn phân hủy, trôi dạt trên bãi biển hoặc nằm trên lớp bùn ở rừng ngập mặn của tỉnh Cà Mau được thu thập, rửa sạch bùn bằng nước biển tại nơi thu mẫu rồi cho vào túi nylon, sau khi mang về phòng thí nghiệm được trữ ngay trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4-6°C. Tại vị trí các điểm thu mẫu, độ mặn đo được là 20‰, pH trong khoảng từ 6,0-7,0 và nhiệt độ trong khoảng 30-32°C.

### 2.2 Phương pháp

#### 2.2.1 Quy trình khử trùng mẫu

Chọn những phần lá còn nguyên vẹn, loại bỏ những phần bị mục nát nhiều để rửa và loại bỏ bùn bám vào lá (trong trường hợp thu thập lá bần nằm trên hoặc vùi trong lớp bùn) được dễ dàng. Các mẫu lá được rửa với 50% nước biển tự nhiên (NBTN) 2 lần để loại bỏ bùn đất. Cắt những mẫu lá này thành các mảnh nhỏ khoảng 3x3mm và rửa với 50% NBTN đã khử trùng 4-5 lần, mỗi lần rửa được đặt trên máy khuấy từ trong 20 phút.

#### 2.2.2 Phân lập vi tảo

Các mẫu lá đã xử lý khử trùng được cấy trực tiếp vào các đĩa petri chứa môi trường glucose-yeast extract peptone seawater (GYPS), thành phần môi trường gồm: 3,0 g glucose, 1,25 g yeast extract, 1,25 g peptone, thêm 50% NBTN cho đủ 1 L, chỉnh pH=6, môi trường được làm đặc với 15 g agar/L, môi trường sau khi khử trùng ở 121°C trong 10 phút được làm nguội đến khoảng 60°C,

sau đó bổ sung 300mg/L streptomycin (Strep.) và 300 mg/L penicillin G (Peni.) (Arafiles *et al.* 2011). Những đĩa này được ủ trong tối ở nhiệt độ  $28\pm 1^\circ\text{C}$  trong 2-3 ngày. Khi xuất hiện các khuẩn lạc xung quanh rìa mảnh lá, tiếp tục cấy chuyển các khuẩn lạc sang đĩa môi trường GYPS+Strep.+ Peni. (300 mg/L) mới cho đến khi thu được các khuẩn lạc thuần. Sau khi phân lập, các dòng vi tảo được lưu trữ trong tủ lạnh  $4-6^\circ\text{C}$  và cấy chuyển trên môi trường GYPS mới mỗi tháng/1 lần.

### 2.2.3 Xác định trọng lượng khô tế bào vi tảo

Trọng lượng khô tế bào (TLKTB) vi tảo được xác định như sau: Thu hoạch tế bào trong 200 ml dung dịch nuôi cấy bằng cách ly tâm dung dịch ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$ . Đổ bỏ phần dịch lỏng lấy phần tủa là sinh khối tảo, rửa với 50 ml nước cất vô trùng, lặp lại hai lần. Chuyển dung dịch tảo sang đĩa petri có đặt một tấm giấy lọc bên trong đĩa (đã cân trọng lượng đĩa petri và giấy lọc trước đó) sấy ở  $60^\circ\text{C}$  đến khi khối lượng không thay đổi.

### 2.2.4 Xác định tốc độ tăng trưởng của tế bào

Sự tăng trưởng của tế bào trong dung dịch nuôi cấy được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) tại bước sóng  $\lambda = 600\text{ nm}$  trong một dãy OD từ 0,2-1,8 cùng lúc với xác định TLKTB (Taha *et al.*, 2013), thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Từ những thông số thu được xây dựng đường chuẩn qua phương trình hồi quy tuyến tính giữa chỉ số OD và TLKTB của vi tảo có dạng  $y = ax + b$ . Trong đó, y là chỉ số OD và x là TLKTB tương ứng của vi tảo (g/200ml).

### 2.2.5 Nhân sinh khối các dòng vi tảo phân lập được

– Nhân giống cấp I: Chuyển cẩn thận một khuẩn lạc đang nuôi cấy trên môi trường GYPS đặc vào ống nghiệm 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng GYPS+Strep+ Peni (300 mg/L). Nuôi cấy dung dịch trên máy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ  $28\pm 1^\circ\text{C}$  với điều kiện tối, trong 3 ngày.

– Nuôi giống cấp II: Sau nhân giống cấp I, mật độ vi tảo được chỉnh về  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$ , chuyển 1 ml dịch vi tảo sang bình tam giác 500 ml chứa 199 ml môi trường GYPS+Strep.+ Peni. (300 mg/L) lỏng. Tiếp tục nuôi ở chế độ lắc 200 vòng/phút ở  $28\pm 1^\circ\text{C}$  trong 4 ngày.

### 2.2.6 Xác định hàm lượng carotenoid

Hàm lượng carotenoid được xác định theo phương pháp của Hoàng Thị Lan Anh *et al.* (2010). Nghiền sinh khối tảo với cát thủy tinh và

thêm vào 10 ml acetone 90% lạnh. Lọc lấy dịch trong bằng giấy lọc chuyên biệt Whatman GF/C. Định mức lên 10 ml bằng acetone 90%. Đo quang phổ ở bước sóng 480 nm.

Hàm lượng carotenoid trong dung dịch được tính theo công thức (Strickland and Parsons, 1972):

$$\text{Hàm lượng sắc tố } (\mu\text{g/L}) = C/V$$

Trong đó:

V là lượng thể tích dịch tảo đem lọc (L)

C (carotenoid tổng số) =  $4,0 * E_{480}$  (( $\mu\text{g}$ ))

Với  $E_{480}$  là giá trị OD đo được ở bước sóng 480 nm.

### 2.2.7 Ly trích DNA

Quy trình căn bản được dựa theo quy trình trích DNA bằng CTAB của Rogers and Bendich (1994) nhưng có thêm một số bước thay đổi: Dung dịch vi tảo (10 ml) được nuôi cấp I và được thu sinh khối bằng cách ly tâm ở vận tốc 5.000 vòng/phút trong 10 phút, ở nhiệt độ phòng. Chuyển phần tủa vào trong một cối bằng sứ, cho một lượng tương đương cát thủy tinh đã khử trùng vào cối, thêm 4 ml dung dịch trích (100 mM Tris-HCl (pH8), 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM beta-mercaptho ethanol), dùng chày nghiền kỹ. Chuyển 2 ml dung dịch vi tảo vào tuýp eppendorf mới. Thêm 100  $\mu\text{l}$  SDS 10% vào tuýp. Trộn đều, tránh lắc mạnh. Ủ ở  $65^\circ\text{C}$  trong 30 phút, khoảng 5 phút đảo nhẹ tuýp để trộn mẫu. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, ở nhiệt độ phòng. Chuyển phần trong vào tuýp mới, thêm một lượng tương đương isopropanol, ủ 20 phút trên khay nước đá. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, ở nhiệt độ phòng. Bỏ phần dung dịch, hòa tan tủa DNA với 500  $\mu\text{l}$  TE 1X. Thêm 500  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm CTAB và ủ ở  $65^\circ\text{C}$  trong 15 phút. Thỉnh thoảng đảo tuýp để trộn đều mẫu. Thêm 1ml Chloroform:Isoamylalcohol và trộn đều. Ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Chuyển phần dung dịch trong qua tuýp mới. Thêm 1 ml Ethanol 96% và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, đổ bỏ phần dung dịch và rửa phần tủa với 500  $\mu\text{l}$  Ethanol 70%. Thực hiện thao tác rửa 2 lần. Loại bỏ dung dịch Ethanol 70%. Sấy khô DNA với máy ly tâm chân không ở  $45^\circ\text{C}$  trong 30 phút. Hòa tan DNA với 100  $\mu\text{l}$  nước cất vô trùng.

### 2.2.8 Phân tích PCR và xác định trình tự DNA

Hai đoạn mồi Thrau For. 5' AAA GAT TAA GCC ATG CAT G 3' và Thrau Rev. 5' GCT GGC ACC AGA CTT GCC CTC 3' (Dương Tấn Phát,

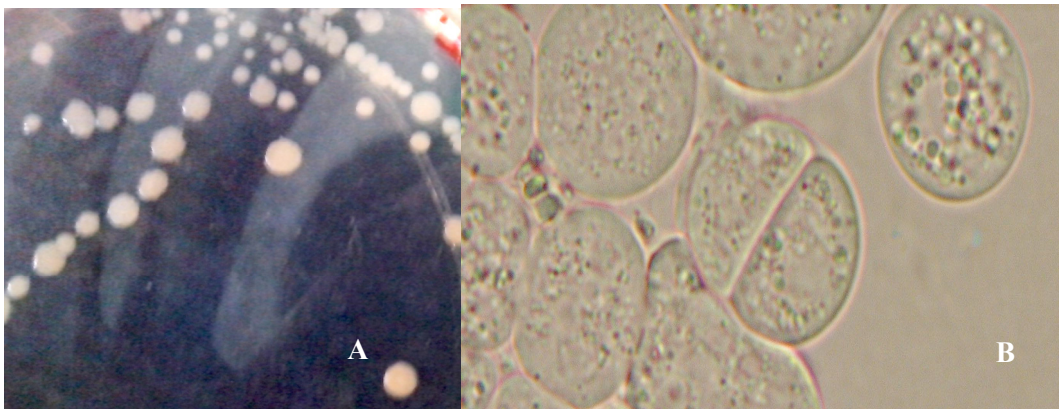
2013) đã được sử dụng để khuếch đại một đoạn DNA có kích thước khoảng 530bp thuộc vùng gen mã hóa 18S-rRNA bằng kỹ thuật PCR từ DNA đã ly trích. Phản ứng PCR được thực hiện với các thành phần: 75 mM Tris HCl (pH 8,8), 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1% Triton X-100; 0,5% DMSO, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP mỗi loại, 200 nM mỗi loại, 1,25 unit *Taq* polymerase và 50-100 ng DNA. Thêm nước cất vô trùng cho đủ thể tích 25  $\mu\text{l}$ . Phản ứng khuếch đại được tiến hành ở 95°C trong 3 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: biến tính ở 95°C trong 45 giây, bắt cặp mỗi vào khuôn ở 58°C trong 45 giây, kéo dài ở 72°C trong 50 giây. Cuối cùng phản ứng được duy trì 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%. Sau khi kiểm tra, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch của Promega (Mỹ) và được giải trình tự cả hai đầu 5' và 3' bằng máy giải trình tự DNA tự động ABI 3130 (Mỹ). Các kết quả giải trình tự gen 18S rRNA được so sánh với các trình tự nucleotid đã được công bố từ dữ liệu trong ngân hàng gen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bằng cách tìm kiếm các trình tự nucleotid đồng hình qua sử dụng chương trình nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Sử dụng các trình tự đã

công bố để so sánh vùng tương đồng bởi clustalW của chương trình Bioedit Version 7.2.3, từ đó cây phả hệ được xây dựng với phần mềm MEGA Version 5.05 sử dụng bootstrap phân tích các mẫu với 1.000 lần lặp lại để đánh giá độ tin cậy của cây phả hệ.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Kết quả phân lập vi tảo

Dòng vi tảo BCM05 đã được phân lập từ các mẫu lá bần thu tại tỉnh Cà Mau, dòng vi tảo này phát triển tốt trên môi trường thạch GYPS, thời gian khuẩn lạc xuất hiện từ 2 đến 3 ngày. Khuẩn lạc có bề mặt trơn nhẵn, mép viền, khi mới phát triển khuẩn lạc có màu trắng ngà, sau 1-2 tuần khuẩn lạc chuyển sang vàng cam, điều này là do sự tích lũy carotenoid nội bào của vi tảo. Đây là đặc điểm đặc trưng của khuẩn lạc của nhiều dòng vi tảo dị dưỡng thuộc nhóm Thraustochytrid đã được phân lập trong những nghiên cứu trước đó (Aki *et al.*, 2003; Chatdumrong *et al.*, 2007; Hoàng Thị Lan Anh *et al.*, 2010; Arafles *et al.*, 2011). Dưới kính hiển vi các tế bào vi tảo dòng BCM05 có dạng hình cầu, đường kính khoảng 20  $\mu\text{m}$ , các tế bào luôn luôn hình thành cụm trong môi trường nuôi cấy (Hình 1).

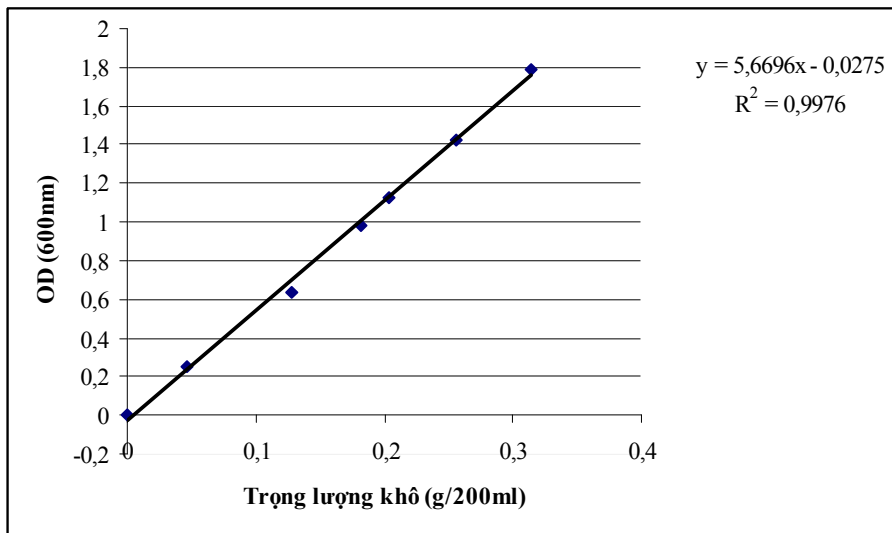


**Hình 1: (A) Khuẩn lạc màu hồng của dòng BCM05; (B) Hình dạng tế bào dòng BCM05 dưới kính hiển vi với vật kính 100**

#### 3.2 Xây dựng đường chuẩn giữa trọng lượng khô và đo mật độ quang (OD) tế bào vi tảo

Kết quả xây dựng đường chuẩn về mối tương quan giữa trọng lượng khô và mật độ quang

( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) tế bào vi tảo dòng BCM05 đã được chỉ ra trên Hình 2, các điểm hầu như đều nằm trên một đường thẳng, với hệ số tương quan  $R^2 = 0.9976$



**Hình 2: Đường chuẩn giữa trọng lượng khô và mật độ quang tế bào dòng BCM05**

Theo nghiên cứu của Rocha *et al.* (2003), để xác định nhanh sinh khối khô đã xây dựng đường chuẩn giữa TLKT dòng vi tảo *Nannochloropsis* sp. và đồng thời đo mật độ quang tế bào ở bước sóng 540 nm. Trong một báo cáo khác để xác định sự tăng trưởng của vi tảo *Schizochytrium* sp., và *Aurantiochytrium* sp., bước sóng được đo tại OD= 600 nm (Hong *et al.*, 2013; Taha *et al.*, 2013).

Xác định TLKTB của tế bào là một trong những phương pháp thường được sử dụng để định lượng mật số tế bào. Ở vi tảo biến việc xác định TLKTB có một vài điểm hạn chế do sự hấp phụ muối trên bề mặt tế bào và các bước rửa muối trước khi sấy khô làm mất đi một lượng tế bào. Do đó, việc xây dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa chỉ số OD mà dịch tảo hấp thụ ở bước sóng 600 nm và TLKTB vi tảo có ý nghĩa rất lớn, nó giúp xác định nhanh chóng sinh khối khô tảo thông qua việc đo mật độ quang dịch tảo ở bước sóng 600 nm mà không cần phải ly tâm thu sinh khối, sấy khô và cân khối lượng sau khi sấy - một quá trình mất nhiều thời gian và tính chính xác chưa cao do một lượng tế bào có thể bị mất đi sau khi ly tâm.

### 3.3 Hàm lượng carotenoid của dòng vi tảo BCM05

Sau 4 ngày nhân sinh khối với thể tích 200 ml, tiến hành trích carotenoid từ sinh khối tươi của dòng vi tảo đã phân lập bằng phương pháp nghiền và lọc như mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. Phân tích kết quả cho thấy dòng BCM05 có hàm lượng carotenoid tổng số là 7.600 µg/kg trọng lượng sinh khối khô.

So với dòng *Thraustochytrium* sp. TN22 đã được Hoàng Thị Lan Anh *et al.* (2010) phân lập từ đầm ngập mặn Thị Nại - Bình Định chứa hàm lượng carotenoid là 5.200 µg/kg trọng lượng sinh khối khô và là đối tượng tiềm năng trong ứng dụng nuôi trồng thủy sản, thì dòng vi tảo BCM05 đã được phân lập trong nghiên cứu này chứa hàm lượng carotenoid cao hơn 46%.

Mặc dù, các vi tảo quang dưỡng được ứng dụng sản xuất carotenoid phổ biến hiện nay như *Dunaliella* hay *Haematococcus* có hàm lượng carotenoid rất cao, chẳng hạn tảo *Dunaliella salina* được nuôi cấy trong 15 ngày trên môi trường chứa 16% NaCl và 2,5 mM nitơ (pH 8,5), thêm 1,5% thể tích CO<sub>2</sub> trong không khí và được chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang cường độ 200 W.m<sup>-2</sup> và đèn UV-B 0,50 W.m<sup>-2</sup> có thể sản xuất ra carotenoid tổng số với hàm lượng cao nhất là 115 mg/g trọng lượng khô (trong đó β-carotene chiếm 54%); và *Haematococcus pluvialis* đạt được hàm lượng astaxanthin cao nhất là 24,5 mg/g trọng lượng khô khi nuôi cấy trên môi trường Basal dưới cường độ ánh sáng 30 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> với chu kỳ sáng/tối là 16/8 h và sau đó sinh khối tiếp tục được nuôi trên môi trường Basal có thêm 17,1 mM NaCl và 4,4 mM sodium acetate NaOAc và ù liên tục dưới cường độ ánh sáng 60 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> trong 9 ngày (El-Baky *et al.*, 2004; Vidhyavathi *et al.*, 2008). Có thể thấy mặc dù hàm lượng sắc tố carotenoid ở loài vi tảo quang dưỡng rất cao nhưng điều kiện nuôi cấy của chúng rất phức tạp và tốn kém hơn rất nhiều so với các dòng dị dưỡng, hơn nữa sự tăng

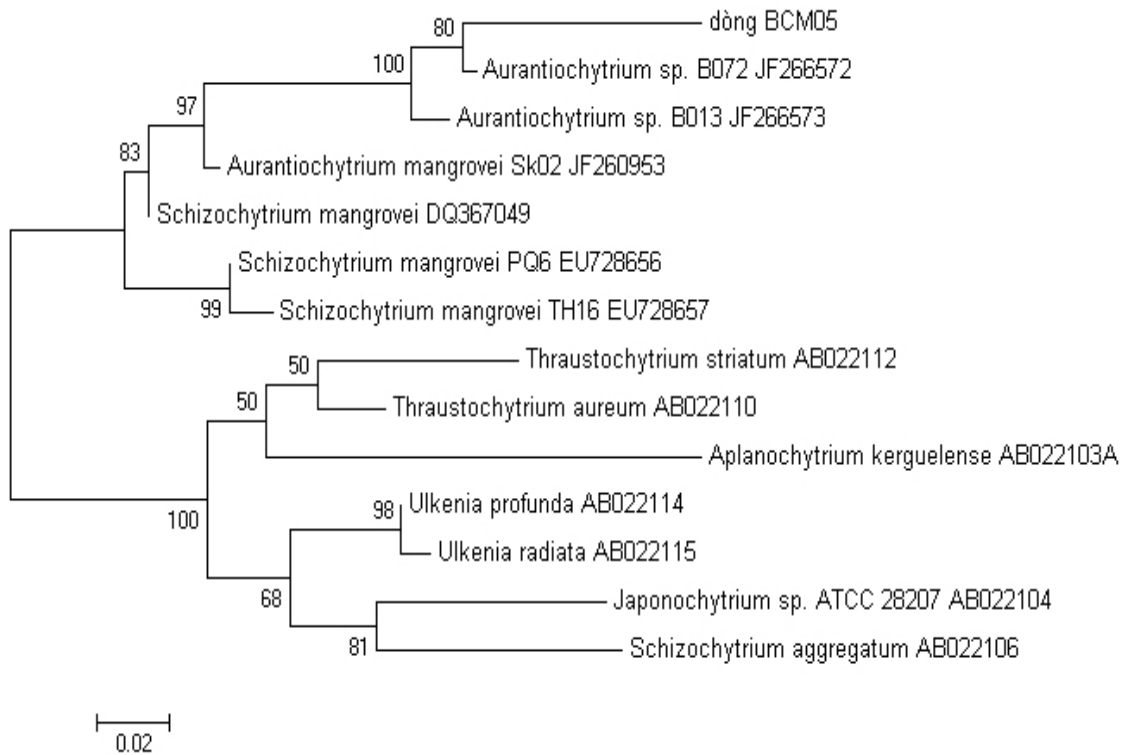
trường của các dòng vi tảo quang dưỡng chậm hơn so với các dòng tảo dị dưỡng (Aki *et al.*, 2003).

Từ những lý do đó, nếu các dòng vi tảo dị dưỡng được cải thiện quy trình nuôi cấy tăng sinh khối hơn nữa thì việc sử dụng các đối tượng này trong sản xuất carotenoid là rất khả thi.

### 3.4 Xác định trình tự DNA của dòng vi tảo BCM05

Phân tích sản phẩm PCR đã cho thấy một đoạn DNA khoảng 530bp được khuếch đại từ vùng gen 18S rRNA. Như vậy, dựa trên hình thái khuẩn lạc,

hình dạng tế bào và sản phẩm PCR bước đầu có thể kết luận dòng vi tảo BCM05 thuộc nhóm Thraustochytrid. Tuy nhiên, để có thể kết luận chính xác hơn, sản phẩm PCR đã được tiếp tục xác định trình tự. Một đoạn 500bp đã đọc được qua máy giải trình tự, so sánh trình tự này với các trình tự từ ngân hàng dữ liệu trên NCBI bằng chương trình BLAST, kết quả cho thấy sự giống nhau về trình tự 18S rRNA của dòng BCM05 với dòng *Aurantiochytrium* sp. B072 (JF266572) là 97%, *Aurantiochytrium* sp. B013 (JF266573) là 96% và *Aurantiochytrium mangrovei* Sk02 (JF260953) là 92%.



Hình 3: Cây phả hệ của dòng vi tảo BCM05 với các loài vi tảo nhóm Thraustochytrid

Phân tích cây phả hệ của dòng BCM05 với các dòng vi tảo khác thuộc nhóm Thraustochytrid (Hình 3) đã cho thấy dòng vi tảo BCM05 có thể thuộc dòng *Aurantiochytrium* sp.

Theo báo cáo của Yokoyama và Honda (2007), hầu hết các loài *Aurantiochytrium* đều có khả năng sản xuất carotenoid và đặc biệt là thành phần carotenoid rất đa dạng bao gồm:  $\beta$ -caroten, Phoenicoxanthin, astaxanthin, Echinenone và canthaxanthin. Nghiên cứu của Gao *et al.*, (2013) cho thấy *Aurantiochytrium* sp. có hàm lượng lipid chiếm 56,3% trọng lượng khô tế bào, trong đó

DHA chiếm 50,9% acid béo tổng số. Do đó, bên cạnh khả năng sản xuất carotenoid, đây cũng là đối tượng lý tưởng để sản xuất dầu sinh học diesel và DHA.

### 4 KẾT LUẬN

Dòng vi tảo BCM05 thuộc nhóm Thraustochytrid từ lá bần ở rừng ngập mặn tỉnh Cà Mau đã được phân lập. Đường chuẩn giữa OD và TLKTB của vi tảo dòng BCM05 đã được xây dựng với hệ số tương quan cao nên có thể sử dụng trị số OD trong nghiên cứu tảo. Hàm lượng carotenoid tổng số của dòng này là 7.600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dựa vào kết

quả giải trình tự đoạn gen 18S-rRNA của dòng BCM05 và qua việc xây dựng cây phả hệ đã cho thấy dòng vi tảo này thuộc chi *Aurantiochytrium* và được đặt tên là *Aurantiochytrium* sp. BCM05.

### LỜI CẢM ƠN

Tập thể các tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ đã cấp kinh phí cho công trình nghiên cứu này. Xin chân thành cảm ơn Bộ môn Kỹ thuật nuôi hải sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ đã cung cấp nước biển phục vụ cho các thí nghiệm. Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng trang thiết bị của phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aki, T., K. Hachida, M. Yoshinaga, Y. Katai, T. Yamasaki, S. Kawamoto, T. Kakizono, T. Maoka, S. Shigeta, O. Suzuki and K. Ono. 2003. Thraustochytrid as a potential sources of carotenoid. *JAOCS*, 80(8): 789-794.
2. Arafiles, K.H.V., J.C.O. Alcantara, J.A.L. Batoon, F.S. Galura, P.R.F. Cordero, E.M. Leño and G.R. Dedeles. 2011. Cultural optimization of thraustochytrids for biomass and fatty acid production. *Mycosphere*, 2(5): 521-531.
3. Bhosale, P.. 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(4): 61-351.
4. Chatdumrong, W., W. Yongmanitchai, S. Limtong and W. Worawattanamateekul. 2007. Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a Shizochytrium limacinum isolated from mangrove forest in Thailand. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*, 41: 324-334.
5. Chisti, Y.. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.
6. Dương Tấn Phát. 2013. Phân lập một số dòng vi tảo biển dị dưỡng nhóm Thraustochytrid sản xuất carotenoid ở tỉnh Cà Mau. Luận văn tốt nghiệp đại học. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học – Đại học Cần Thơ.
7. El-Baky, A.H.H., F.K. El-Baz and G.S. El-Baroty, 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int. J. Agric. Biol.* 6:49-57.
8. Fan KW., F. Chen. 2007. Production of high value products by marine microalgae thraustochytrids. In: *Bioprocessing for Value-added Products from Renewable Resources – New Technologies and Applications*, (ed. ST Yang). First Edition, Elsevier, The Netherlands. 293-323.
9. Gao, M., X. Song, Y. Feng, W. Li and Q. Cui. 2013. Isolation and characterization of *Aurantiochytrium* species: high docosahexaenoic acid (DHA) production by the newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. *J Oleo Sci*, 62(3): 143-51.
10. Hoàng Thị Lan Anh, Đinh Thị Ngọc Mai, Ngô Thị Hoài Thu và Đặng Diễm Hồng, 2010. Phân lập chủng vi tảo biển dị dưỡng mới thuộc chi *Thraustochytrium* giàu DHA và carotenoid từ đầm ngập mặn Thị Nại - Bình Định. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 8(3A): 459-465.
11. Hong, W.K., A. Yu, B.R. Oh, J.M. Park, C.H. Kim, J.H. Sohn, A. Kondo, J.W. Seo. 2013. Large-scale production of microalgal lipids containing high levels of docosahexaenoic acid upon fermentation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Food and Nutrition Sciences*, 4(9A): 1-5. doi: 10.4236/fns.2013.49A1001.
12. Ishida, B.K. and 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): 20-8017.
13. Jain, R., S. Raghukumar, K. Sambaiah, Y. Kumon, T. Nakahara. 2007. Docosahexaenoic acid accumulation in thraustochytrids: search for the rationale. *Mar Biol* 151:1657-1664
14. Jorgensen, K. and L.H. Skibsted. 1993. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z Lebensm Unters Forsch*. 196(5): 9-423.
15. Olson, J.A.. 1999. Carotenoids and human health. *Arch Latinoam Nutr*, 49(3 Suppl 1): 7S-11S.
16. Raghukumar, S.. 2008. Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Mar. Biotechnol*, 10: 631-640.

17. Ratledge, C.. 1993. Single cell oils have they a biotechnological future. *Trends Biotechnol*, 11: 278–284.
18. Rocha, J. M. S., J.E.C. Garica and M.H.F. Henriques. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20: 237-242.
19. Rogers, S.O. and A. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In *Plant molecular biology manual – Section A6*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp.1 – 11.
20. Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd ed. *Bull Fish Res Bd Can*, 167: 1-311.
21. Taha, A.I.B.H.M., T. Kimoto, T. Kanada and H.Okuyama. 2013. Growth optimization of thraustochytrid strain 12B for the commercial production of docosahexaenoic acid. *Food Sci. Biotechnol.*, 22: 53-58. DOI: 10.1007/s10068-013- 0048-2.
22. Vidhyavathi, R., L. Venkatachalam, R. Sarada and G.A. Ravishankar, 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 59 (6): 1409-1418.
23. Yamasaki, T., T. Aki, Y. Mori, T. Yamamoto, M. Shinozaki, S. Kawamoto and K. Ono. 2007. Nutritional enrichment of larval fish feed with thraustochytrid producing polyunsaturated fatty acids and xanthophylls. *J Biosci Bioenq*. 104(3): 200-6.
24. Yamaoka, Y., M.L. Carmona and S. Oota. 2004. Growth and Carotenoid Production of *Thraustochytrium* sp. CHN-1 Cultured under Superbright Red and Blue Light-emitting Diodes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (7): 1594-1597.
25. Yokoyama, R. and D. Honda. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensulato* based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (*Thraustochytriaceae*, *Labyrinthulomycetes*): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, 48: 199-211.