

PHÂN LẬP MỘT SỐ DÒNG VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT CAROTENOID Ở VÙNG BIỂN CÀ MAU

Lê Bích Tuyền*, Huỳnh Kim Yên**

TÓM TẮT

Carotenoid là chất chống oxy hóa mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm ra những dòng vi tảo biển dị dưỡng có khả năng sản xuất carotenoid với hàm lượng cao. Kết quả cho thấy, năm dòng vi tảo được phân lập từ các mẫu lá và nước ở vùng biển Cà Mau đều có chứa carotenoid. Sau khi tiến hành ly trích carotenoid bằng hai loại dung môi acetone 90% và ethanol 90% thì hai dòng D5, D6 đều có hàm lượng carotenoid tổng số rất cao. Trong đó, dòng D5 có hàm lượng carotenoid tương ứng với hai loại dung môi lần lượt là 3017 $\mu\text{g}/\text{kg}$ trọng lượng khô; 7569 $\mu\text{g}/\text{kg}$ trọng lượng khô. Dòng D6 có hàm lượng carotenoid tương ứng với hai loại dung môi lần lượt là 4769 $\mu\text{g}/\text{kg}$ trọng lượng khô; 3760 $\mu\text{g}/\text{kg}$ trọng lượng khô.

Từ khóa: Carotenoid, vi tảo, phân lập.

ABSTRACT

Carotenoid is an antioxidant that brings many benefits to human health. This study was conducted to identify heterotrophic microalgae capable of producing high levels of carotenoids. Results showed that five strains of microalgae isolated from leaf samples and water in Ca Mau waters contain carotenoids. After carotenoid extraction with 90% acetone and 90% ethanol, both D5 and D6 have a very high total carotenoid content. In particular, the D5 strains has a carotenoid content corresponding to two types of solvent, respectively 3017 $\mu\text{g} / \text{kg}$ dry weight; 7569 $\mu\text{g} / \text{kg}$ dry weight. D6 carotenoids were found to be 4769 $\mu\text{g} / \text{kg}$ dry weight respectively; 3760 $\mu\text{g} / \text{kg}$ dry weight.

Key word: Carotenoids, microalgae, isolates.

1. Đặt vấn đề

Nguồn vi tảo sản xuất carotenoid phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Việc sử dụng vi tảo có nhiều ưu thế như vi tảo phát triển đơn

giản, vòng đời ngắn, năng suất cao (Chisti, 2007). Vi tảo có thành phần dinh dưỡng và hàm lượng sắc tố cao, đặc biệt là carotenoid. Trong đó, các loài vi tảo quang dưỡng là những đối tượng quen thuộc để sản xuất carotenoid. Tuy nhiên các loài vi tảo quang dưỡng này phát triển chậm hơn các loài vi tảo dị dưỡng. Trong những năm gần đây, việc sử dụng các loài vi tảo biển dị dưỡng thuộc nhóm *Thraustochytrid*

* Thạc sĩ, Khoa Khoa học biển và công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Kiên Giang

** Thạc sĩ, Khoa Khoa học biển và công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Kiên Giang

và *Schizochytrium* để sản xuất 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 CO₂ (Ratledge, 1993). Ở nước ta những nghiên cứu về vi tảo dị dưỡng còn khá hạn chế. Xuất phát từ những vấn đề này, vì vậy việc phân lập một số dòng vi tảo biển dị dưỡng có khả năng sản xuất carotenoid là vấn đề cấp thiết.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

Các mẫu lá đước và lá bần đang trong giai đoạn phân hủy, trôi dạt trên bãi biển hoặc ở đầm ngập mặn hoặc nằm trên lớp bùn ở rừng ngập mặn của biển Cà Mau; Nước biển được lấy từ bãi biển Khai Long huyện Ngọc Hiển, Cà Mau.

2.2 Phân lập vi tảo

Đối với mẫu nước: Hút 10ml mẫu nước cho vào bình tam giác 250ml chứa 90ml môi trường lỏng GYPS ủ trong tối ở 28-30°C trên máy lắc (120 rpm) trong vòng 48 giờ nhằm tăng sinh khối các dòng vi tảo cần phân lập trong mẫu. Tiến hành pha loãng. Chọn các nồng độ thích hợp trải lên môi trường đặc GYPS (Đối với mẫu lá sau khi thu về thì dùng kẹp cây trực tiếp vào môi trường GYPS đặc) ủ trong tối ở nhiệt độ 28-30°C trong 48 giờ. Sau 48 giờ, các khuẩn lạc có hình dạng khác nhau được chọn để cấy chuyển sang môi trường GYPS. Sau đó các khuẩn lạc này sẽ được tách ròng bằng phương pháp ria cấy cho đến khi thu được những khuẩn lạc ròng của các dòng vi tảo. Sau khi phân lập, các dòng vi tảo được lưu giữ trong tủ mát 4-6°C (Bremer, 2000).

2.3 Xác định trọng lượng khô dựa trên OD 600nm

Để xác định trọng lượng khô của các dòng vi tảo phân lập được, tiến hành dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ dịch tảo đo được ở bước sóng 600nm và trọng lượng khô của các dòng vi tảo phân lập được. Các bước tiến hành như sau:

+ Sau 4 ngày nhân sinh khối các dòng vi tảo với thể tích 500ml, tiến hành pha loãng dịch tảo ở nhiều nồng độ khác nhau bằng môi trường GYPS lỏng (thể tích dịch tảo ở mỗi nồng độ pha loãng là 200ml).

+ Đo quang phổ các nồng độ pha loãng ở bước sóng 600nm.

+ Tương ứng với mỗi nồng độ pha loãng, ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút ở 28°C trong 10 phút. Dịch tảo ở các nồng độ pha loãng đem ly tâm có thể tích bằng nhau (200ml).

+ Đổ bỏ phần dịch lỏng, lấy phần tủa là sinh khối tảo.

+ Sinh khối tảo được sấy ở 65°C đến khối lượng không đổi.

+ Cân và ghi nhận sinh khối khô của các dòng vi tảo.

+ Xử lý kết quả bằng phần mềm Microsoft excel để xây dựng đường chuẩn.

2.4 Xác định hàm lượng carotenoid

Sau 4 ngày nhân sinh khối với thể tích 200 ml, dùng sinh khối tươi của các dòng vi tảo để xác định hàm lượng carotenoid. Hàm lượng carotenoid được xác định theo phương pháp của Hoàng Thị Lan Anh et al. (2010). Carotenoid được ly trích với 2 loại dung môi

khác nhau: ethanol 90% và acetone 90%. Từ đó so sánh hiệu suất chiết carotenoid của hai loại dung môi này. Hàm lượng carotenoid tính theo trọng lượng khô dựa vào carotenoid tổng số thu được từ dịch trích, chỉ số OD mà dịch tảo hấp thu ở bước sóng 600nm và đường chuẩn (phương trình hồi quy tuyến tính) thể hiện mối tương quan giữa OD 600nm và trọng lượng khô của vi tảo có dạng $y = ax + b$. Mỗi dòng vi tảo được lặp lại thí nghiệm 3 lần.

2.5 Phân tích kết quả và xử lý thống kê

Tất cả số liệu thu được trong đề tài được phân tích thống kê ANOVA (analysis of Variance) bằng phần mềm MS Excel. Giá trị trung bình được kiểm tra thống kê khác biệt

có ý nghĩa LSDT (Least Significant Difference Test) bằng phần mềm Statgraphic Plus version 3.0.

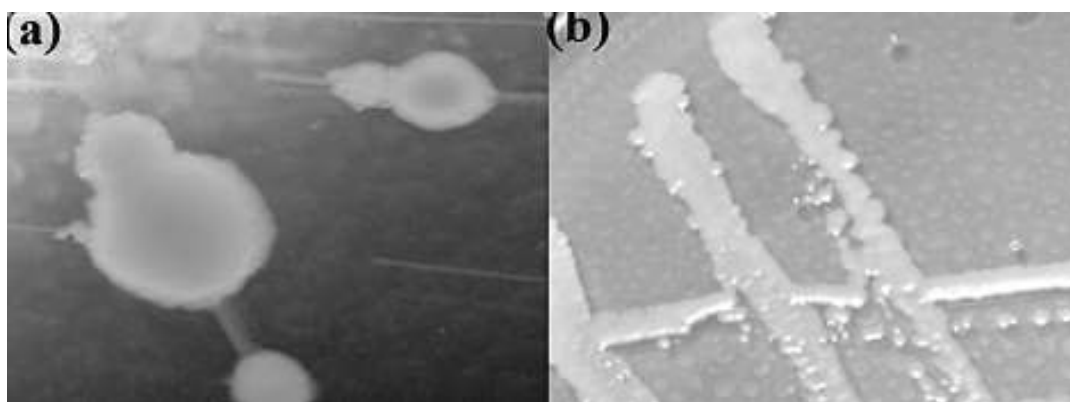
3. Kết quả thảo luận

3.1 Kết quả phân lập vi tảo

Từ các mẫu nước và lá thu tại vùng biển Cà Mau đã phân lập được năm dòng vi tảo có chứa carotenoid. Sau khi phân lập xong, các dòng vi tảo được cấy trên môi trường GYPS đặc để quan sát hình thái khuẩn lạc. Thời gian trung bình để vi tảo phát triển thành khuẩn lạc trên môi trường phân lập từ 24 - 48h. Đặc điểm về hình thái khuẩn lạc của các dòng vi tảo được mô tả trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm, hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi tảo phân lập

Dòng vi tảo	Đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường thạch GYPS	Đặc điểm hình thái tế bào vi tảo
D2	Tốc độ mọc nhanh, bề mặt trơn, ướt, không có mép viền, khuẩn lạc có màu trắng sữa.	Hình cầu hoặc hình elip, kích thước không đều, đường kính khoảng 3-7 μ m, sóng độc lập.
D5	Tốc độ mọc trung bình, bề mặt nhẵn, có mép viền, khi còn nhỏ khuẩn lạc có màu trắng ngà, khi lớn chuyển sang vàng cam.	Hình cầu, đường kính khoảng 20 μ m, một số sóng độc lập, phần lớn tập trung thành từng cụm tế bào xếp sát nhau.
D6	Tốc độ mọc chậm, bề mặt xù xì, tròn, ở mép có răng cưa, khi còn nhỏ khuẩn lạc màu trắng, khi lớn chuyển sang vàng cam.	Hình chuông, dài khoảng 20 μ m, rộng khoảng 10-15 μ m, sóng độc lập.
D7	Tốc độ mọc nhanh, bề mặt nhẵn, phẳng, tạo răng cưa ở mép, khuẩn lạc có màu trắng đục.	Hình elip, kích thước không đều, đường kính khoảng 2-5 μ m, sóng độc lập.
D8	Tốc độ mọc nhanh, bề mặt trơn, ướt, không tạo răng cưa ở mép, khi còn non khuẩn lạc có màu hồng nhạt, khi già có màu hồng đậm hơn.	Hình cầu hoặc hình elip, đường kính khoảng 3-7 μ m, đơn bào, các tế bào tập hợp lại thành từng đám không có sự sắp xếp.



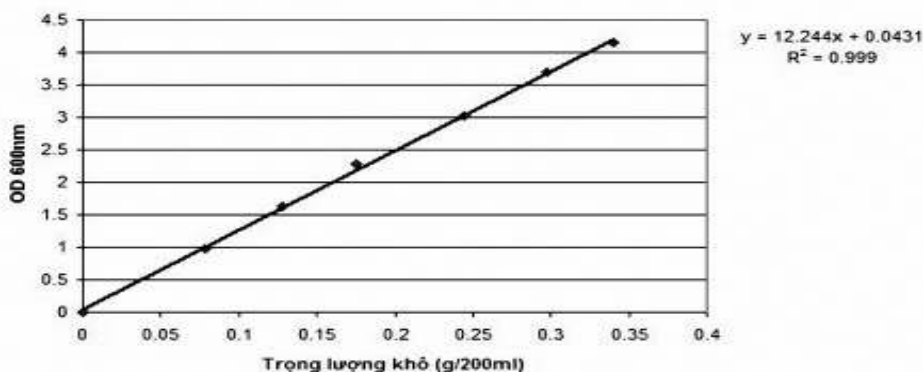
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi tảo phân lập (a) D5; (b) D8

Khuẩn lạc của năm dòng vi tảo phân lập được có hình thái đa dạng từ bề mặt trơn lồi cho đến nhám lồi, bìa nguyên cho đến không đều hoặc răng cưa. Màu sắc khuẩn lạc của các dòng đa số là trắng đục và trắng ngà, hồng, vàng cam và có sự thay đổi màu sắc khuẩn lạc theo tuổi của khuẩn lạc. Điều này là do sự tích lũy carotenoid nội bào của vi tảo. Đây cũng là đặc điểm đặc trưng của khuẩn lạc của nhiều dòng vi tảo dị dưỡng như *Thraustochytrium* và *Schizochytrium* đã được phân lập trong những nghiên cứu trước đó (Hoàng Thị Lan Anh et al., 2010). Hình thái tế bào của các dòng vi tảo phân lập được cũng rất đa dạng, đa số đều có dạng hình cầu hay hình elip, một số có dạng hình elip hơi kéo dài, và hình chuông. Đặc biệt các tế bào của dòng D5 có khả năng phát triển và phân chia thành từng cụm gồm hai tế bào

hay nhiều hơn. Đây cũng là điểm đặc trưng của các dòng vi tảo thuộc chi *Schizochytrium* (Goldstein & Belsky, 1964).

3.2 Xác định trọng lượng khô dựa vào OD 600nm

Sau 4 ngày nhân sinh khối năm dòng vi tảo đã phân lập với thể tích 500ml, tiến hành các bước như trong mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu. Sau khi thu được kết quả về chỉ số OD mà dịch tảo hấp thụ ở bước sóng 600nm và trọng lượng khô của 5 dòng vi tảo phân lập rỗng, sử dụng phần mềm Microsoft excel để dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa trọng lượng khô của vi tảo và chỉ số OD hấp thụ ở bước sóng 600nm của dịch tảo (hình 2).



Hình 2. Đường chuẩn OD 600nm - trọng lượng khô dòng D2

Sau khi xử lý kết quả bằng phần mềm excel, thu được kết quả như sau (bảng 2):

Bảng 2: Phương trình hồi quy tuyến tính giữa chỉ số OD 600nm và trọng lượng khô của vi tảo

STT	Dòng	Phương trình hồi quy tuyến tính	Hệ số tương quan
1	D2	$y = 12,244x + 0,0431$	$R^2 = 0,999$
2	D5	$y = 5,6696x - 0,0275$	$R^2 = 0,9976$
3	D6	$y = 28,75x - 0,0727$	$R^2 = 0,9945$
4	D7	$y = 18,257x + 0,0481$	$R^2 = 0,9976$
5	D8	$y = 19,577x + 0,0726$	$R^2 = 0,9978$

Việc xây dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa chỉ số OD mà dịch tảo hấp thu ở bước sóng 600nm và trọng lượng khô của sinh khối tảo có ý nghĩa rất lớn, nó giúp xác định được trọng lượng khô của sinh khối tảo một cách nhanh chóng thông qua việc đo quang phổ dịch tảo ở bước sóng 600nm mà không cần phải ly tâm thu sinh khối, sấy khô và cân khối lượng - một quá trình mất nhiều thời gian.

3.3 Xác định hàm lượng carotenoid của các dòng vi tảo

Sau bốn ngày nhân sinh khối với thể tích 200ml, tiến hành trích carotenoid từ sinh khối tươi của năm dòng vi tảo đã phân lập như mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. Sau khi xử lý số liệu bằng tính toán và thống kê, kết quả cho thấy khả năng sản sinh ra carotenoid tổng số giữa các dòng vi tảo tương đối khá chênh lệch (Bảng 3).

Bảng 3. Hàm lượng carotenoid tổng số của các dòng vi tảo phân lập được

Dòng vi tảo	Hàm lượng carotenoids ($\mu\text{g}/\text{kg}$ trọng lượng khô)	
	Ethanol 90%	Acetone 90%
D2	1219 ^a	2984 ^c
D5	7569^f	3017 ^c
D6	3670 ^{cd}	4769 ^d
D7	795 ^a	811 ^a
D8	539 ^a	529 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau khác biệt không ý nghĩa (mức độ 5%).

Mặc dù được trích bằng loại dung môi nào thì dòng D5, D6 đều có hàm lượng carotenoid tổng số rất cao. Trong khi đó, các dòng vi tảo chứa hàm lượng carotenoid thấp như dòng

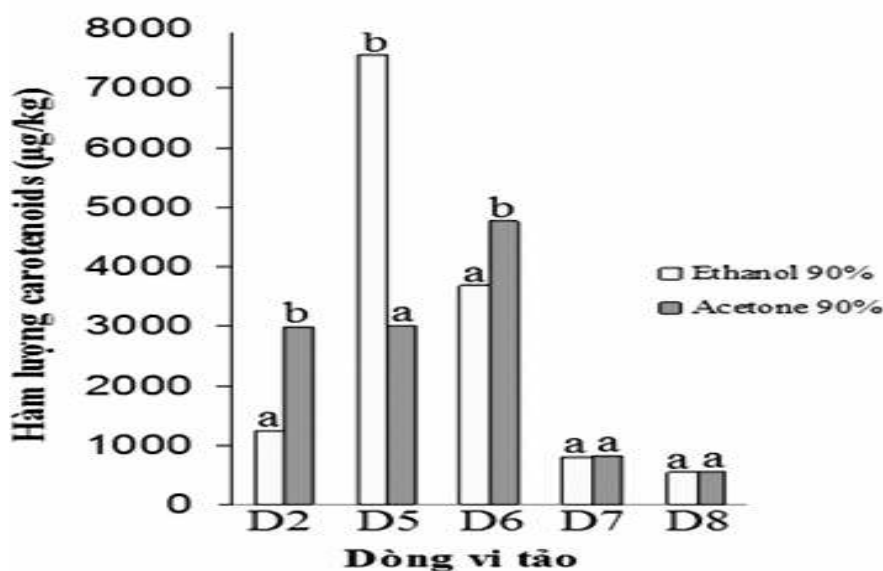
D2, D7 và D8. Những dòng có hàm lượng carotenoid cao là những dòng có màu sắc khuôn lặc đặc trưng (vàng, vàng cam, hồng), còn những dòng có hàm lượng carotenoid thấp

hơn thì khuẩn lạc có màu trắng sữa hoặc trắng đục. Như vậy có thể cho thấy được màu sắc khuẩn lạc cũng đã nói lên được khả năng sản sinh ra sắc tố carotenoid của bản thân mỗi dòng vi tảo. Khi trích bằng dung môi ethanol 90%, hàm lượng sắc tố carotenoid tổng số của dòng D5 là cao nhất là 7569 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), kể đến là dòng D6 với 3670 ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

So với chủng *Thraustochytrium* sp. TN22 dị dưỡng đã được Hoàng Thị Lan Anh et al. (2010) phân lập từ đầm ngập mặn Thị Nại - Bình Định chứa hàm lượng carotenoid là 5216 $\mu\text{g}/\text{kg}$ trọng lượng khô và là đối tượng tiềm năng trong ứng dụng nuôi trồng thủy sản, thì dòng vi tảo D5 đã được phân lập trong nghiên

cứu này chứa hàm lượng cao hơn.

Khi chiết bằng dung môi ethanol 90%, dòng D5 có hàm lượng carotenoid cao nhất là 7569 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), nhưng khi chiết bằng dung môi acetone 90% thì hàm lượng lại rất thấp, 3017 ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Các dòng vi tảo đã phân lập đều có sự khác nhau đáng kể về hàm lượng carotenoid tổng số giữa hai loại dung môi dùng để chiết xuất (Hình 3). Điều này đúng với tính chất của sắc tố carotenoid, cho thấy mỗi loại carotenoid có khả năng hòa tan trong mỗi loại dung môi hữu cơ khác nhau và trong mỗi loại dung môi hòa tan khác nhau, khả năng hấp thụ ánh sáng tối đa cũng khác nhau với cùng một loại carotenoid (Zur et al., 2000).



Hình 3. Khả năng chiết carotenoids giữa dung môi ethanol 90% và acetone 90%

4. Kết luận và đề xuất

4.1 Kết luận

Đề tài phân lập được năm dòng vi tảo từ các mẫu lá và nước thuộc vùng biển Cà Mau. Các dòng vi tảo đã phân lập được nuôi, nhân và thu sinh khối để xác định hàm lượng

carotenoid. Hàm lượng carotenoid giữa các dòng vi tảo phân lập được có sự khác biệt đáng kể. Những dòng mà khuẩn lạc có màu sắc đặc trưng (hồng, vàng, vàng cam) thì có hàm lượng carotenoid cao và ngược lại. Dòng D5 có hàm lượng carotenoid cao nhất 7.569 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và dòng D8 có hàm lượng thấp nhất 539 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

4.2 Đề xuất

Cải tiến điều kiện nuôi cấy để gia tăng sinh khối cho các dòng vi tảo đã phân lập.

Phân lập thêm những dòng vi tảo dị dưỡng ở những địa điểm, tỉnh thành khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bremer, G., 2000. Isolation and culture of Thraustochytrids. In: K. Hyde and S. Pointing (eds) *Marine mycology - a practical approach*. Fungal Diversity Press, Hong Kong. pp: 49-61.
2. Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25. pp: 294-306.
3. Goldstein and Belsky, 1964. *Schizochytrium*. In: Costello, M.J.; Bouchet, P.; Boxshall, G.; Arvantidis, C.; Appeltans, W. 2012. European Register of Marine Species.
4. 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). tr: 459-465.
5. Ratledge, C., 1993. Single cell oils have they a biotechnological future. *Trends Biotechnol*; 11: 278 - 284.
6. Zur, Y., A.A. Gitelson, O.B. Chivkunova, and M.N. Merzlyak, 2000. The spectral contribution of carotenoids to light absorption and reflectance in green leaves. *Papers in Natural Resources*. pp: 272.

Ngày nhận bài: 22/6/2018

Ngày gửi phản biện: 23/6/2018