

LỰA CHỌN ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY THÍCH HỢP CHO SINH TRƯỞNG CỦA VI TẢO LỤC *Chlamydomonas reinhardtii* TÁI TỔ HỢP TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Đặng Diễm Hồng^{1*}, Lưu Thị Tâm¹, Lê Thị Thơm^{1,2}, Hoàng Thị Lan Anh¹,
Ngô Thị Hoài Thu¹, Hà Thị Thu¹, Nguyễn Minh Hương¹, Đồng Văn Quyền¹

¹Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST, Việt Nam

TÓM TẮT: Vi tảo lục *Chlamydomonas reinhardtii* là một sinh vật mô hình cho các nghiên cứu về cơ chế phản ứng của cơ thể đối với thay đổi của điều kiện môi trường sống, quang hợp cũng như sự phát sinh của lục lạp, và có thể được biến đổi gen để sản xuất protein có giá trị cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu về việc lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng đột biến mất thành tế bào *C. reinhardtii* (503-chủng đối chứng) và chủng tái tổ hợp 503-2 biểu hiện protein VP28 của virus gây bệnh đốm trắng (WSSV- White Spot Syndrome Virus) ở bình tam giác 250 mL. Điều kiện nuôi thích hợp cho sinh trưởng của cả chủng đối chứng và tái tổ hợp là môi trường TAP, nhiệt độ 25°C, pH = 7, cường độ ánh sáng 2 klux, nguồn C-Trisbase, N-nitrate và độ mặn 50–100 mM. Tại điều kiện nuôi thích hợp, mật độ tế bào cực đại của chủng đối chứng và tái tổ hợp lần lượt là $3,20 \pm 0,08 \times 10^6$ và $2,96 \pm 0,17 \times 10^6$ TB/mL sau 3 và 7 ngày nuôi. Sự có mặt của gen *vp28* trong chủng tái tổ hợp được duy trì ổn định qua các cấp độ nuôi. Kết quả nghiên cứu này sẽ là cơ sở khoa học cho việc nhân nuôi chủng tảo *C. reinhardtii* tái tổ hợp nhằm thu được sinh khối tảo biểu hiện mạnh protein bề mặt VP28 của WSSV để tạo vắc xin phòng bệnh đốm trắng ở tôm qua đường ăn.

Từ khóa: *Chlamydomonas reinhardtii*, chủng tái tổ hợp, protein VP28, môi trường TAP, virus gây bệnh đốm trắng.

MỞ ĐẦU

Chlamydomonas reinhardtii thuộc giới Plantae, ngành Chlorophyta, lớp Chlorophyceae, bộ Chlamydomonadales, họ Chlamydomonadaceae, chi *Chlamydomonas*. Các loài thuộc chi này có tế bào dạng đơn bào với hai roi ở phía trước và thành tế bào rất khác biệt. Tế bào có một lục lạp lớn được bao quanh bởi một hoặc nhiều pyrenoids và một điểm mắt để tiếp nhận ánh sáng. Tảo này với đặc điểm sinh học nổi bật là có chứa các kênh ion được kích hoạt trực tiếp bởi ánh sáng và thành tế bào của chúng chỉ có glycoprotein, polysaccharide, mà không có cellulose. Các roi có cấu trúc roi điển hình sắp xếp theo kiểu 9 + 2 của các sợi thành phần được bắt nguồn từ 1 hạt cơ bản (Harris, 2001). Mặc dù có đến 459 loài với 9 nhóm hình thái chủ yếu khác nhau đã được công bố (Kuin et al., 2000) nhưng loài *C. reinhardtii* được sử dụng nhiều nhất cho nghiên cứu do chúng có khả năng vừa sống theo kiểu quang tự dưỡng cũng như dị dưỡng với acetate là nguồn carbon duy nhất (Harris et al., 2001).

C. reinhardtii là loài vi tảo giàu dinh dưỡng với hàm lượng protein, carbohydrate và lipid lần lượt chiếm 3–48%, 17%, 21–51% sinh khối khô. Ngoài ra, loại vi tảo này còn giàu sắc tố, vitamin, các axit béo không bão hòa đa nối đôi (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) nên chúng đã được sử dụng làm thức ăn cho ấu trùng và hậu ấu trùng nhuyễn thể, động vật phù du nước ngọt, luân trùng nước mặn và *Artemia* (Yang et al., 2012). Ngoài ra, *C. reinhardtii* còn được sử dụng trong sản xuất diesel sinh học (Yang et al., 2012), nguyên liệu cho sản xuất dược phẩm, sản xuất hydro quang sinh học (Geier et al., 2012), sàng lọc thuốc chống ung thư (Maucourt et al., 2002), sản xuất RNA sợi đôi kháng lại virus gây bệnh trên tôm (Shomchai et al., 2016); là sinh vật mô hình cho nghiên cứu các quá trình cơ bản như quang hợp, nguồn gốc phát sinh lục lạp... (Doron et al., 2016). Đây là loại tảo có nhân điển hình duy nhất đã được biến đổi gen để sản xuất protein có giá trị cao (Mayfield et al., 2007).

VP28 là protein vỏ của virus gây bệnh đốm trắng. Protein này có khối lượng phân tử 27,5 kDa với một vùng xuyên màng giả định ở đầu N, 5 vị trí N-glycosyl hóa và 2 vị trí O-glycosyl hóa protein, đóng vai trò chủ đạo giúp virus gắn đặc hiệu lên tế bào tôm được xem là bước khởi đầu cho quá trình lây nhiễm của virus (Yi et al., 2004). Do có tính kháng nguyên cao và khả năng kích thích hệ thống miễn dịch của tôm nên VP28 là protein được lựa chọn để tạo kháng thể chẩn đoán WSSV cũng như tạo vắc xin giúp tôm phòng bệnh đốm trắng (Rout et al., 2007; Li et al., 2010). Protein VP28 tái tổ hợp (rVP28) đã được nghiên cứu biểu hiện ở nhiều hệ thống khác nhau như *E. coli*, nấm men, baculovirus (Witteveldt et al., 2004; Jha & Xu, 2005; Hou et al., 2011) và sử dụng để tạo kit chẩn đoán hay vắc xin phòng WSSV. Tuy nhiên, các hệ thống này đều bộc lộ những hạn chế nhất định như protein thường biểu hiện ở dạng thể vùi hoặc khả năng tạo đáp ứng miễn dịch yếu.

Hiện nay, một hướng nghiên cứu mới đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu để thay thế và khắc phục những hạn chế của các hệ thống biểu hiện trên, đó là sử dụng hệ thống vi tảo lục *C. reinhardtii*. Vi tảo *C. reinhardtii* đã được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ chứng nhận là an toàn “Generally Regarding As Safe (GRAS)”. *C. reinhardtii* hiện được sử dụng như một nhà máy sản xuất các protein sinh được tái tổ hợp, kháng thể, vắc xin tái tổ hợp như vắc xin phòng bệnh sốt rét, phòng virus lở mồm long móng, tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*, virus cúm lợn và papillomavirus ở người (Rosales-Mendosas et al., 2015). Protein tái tổ hợp biểu hiện trong lạp thể của *C. reinhardtii* đạt hiệu suất biểu hiện rất cao, khoảng 3–4% tổng protein tan và còn cao hơn nữa trong một số điều kiện đặc biệt. Để sản xuất ở quy mô công nghiệp, sử dụng các hệ thống photobioreactor (PBRs) để nuôi trồng *C. reinhardtii* có thể đạt đến sản lượng 1–2 gr sinh khối khô/ lít. Protein tái tổ hợp biểu hiện trong *C. reinhardtii* được bảo vệ bởi thành tế bào vi tảo, do đó hạn chế được sự phân hủy nhanh chóng bởi dịch tiêu hóa dạ dày, đồng thời cũng giúp cho protein vẫn giữ được đặc tính kháng nguyên trong trường hợp sấy khô sinh khối. Đây là những ưu điểm quan trọng cho thấy tiềm năng ứng dụng của hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp trên loài vi tảo lục này theo định

hướng sản xuất vắc xin đường ăn cho tôm (Rosales-Mendoza et al., 2015).

Cho đến nay, ở Việt Nam chưa có một công bố nào liên quan đến nuôi trồng vi tảo lục *C. reinhardtii*. Để nuôi trồng được loài vi tảo này (chúng đối chứng và tái tổ hợp), cần tìm được các điều kiện nuôi trồng thích hợp cho tảo sinh trưởng và phát triển để đạt mục tiêu tạo được chế phẩm miễn dịch phòng bệnh đốm trắng theo đường ăn từ chủng vi tảo lục *C. reinhardtii* tái tổ hợp biểu hiện protein VP28 của virus WSSV ở Việt Nam. Bài báo trình bày các kết quả nghiên cứu bước đầu về ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng, nhiệt độ, pH, cường độ ánh sáng, nguồn carbon, nitơ và nồng độ muối khác nhau lên sinh trưởng của chủng *C. reinhardtii* đối chứng và tái tổ hợp trong điều kiện phòng thí nghiệm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng tảo và điều kiện nuôi cấy

Chlamydomonas reinhardtii chủng 503, chủng đột biến mất thành tế bào có nguồn gốc từ NIES (National Institute of Environmental Studies, Nhật Bản) được ký hiệu là chủng đối chứng. Chủng tái tổ hợp được tạo ra bằng cách chuyển gen mã hóa cho protein VP28 vào chủng đối chứng 503 và được ký hiệu là *C. reinhardtii* 503-2 do Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Các chủng này thuộc bộ sưu tập giống vi tảo của Phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các môi trường được sử dụng trong nuôi cấy chủng tảo *C. reinhardtii* 503 và 503-2 được bổ sung thêm 50 µg/mL ampicillin và 50 µg/mL ampicillin + 5 µg/mL Zeocin, tương ứng. Môi trường dinh dưỡng TAP có thành phần (dựa trên thành phần môi trường TAP cải tiến của Gorman & Levine, 1965) (mg/L): Tris base-2420, NH₄Cl-0,4, MgSO₄. 7H₂O-205, CaCl₂-50, KNO₃-400, NaCl-400, K₂HPO₄. 7H₂O-108, KH₂PO₄-56, Na₂EDTA-50, ZnSO₄. 7H₂O-22, H₃BO₃-11, MnCl₂. 4 H₂O-5, FeSO₄. 7H₂O-5, CoCl₂. 6H₂O-1,6, (NH₄)₅Mo₇O₂₄. 4H₂O-1,1. Thành phần môi trường NAPK, C, B3N, HS, CA được mô tả lần lượt theo công bố của Harris (1989), Đặng Diễm Hồng và nnk., (2010), Bischoff & Bold (1963), Sueoka (1960), Ichimura & Watanabe, (1974);

Môi trường HNS là môi trường HS nhưng loại bỏ thành phần nitơ.

Xác định sự có mặt của gen *vp28* trong các chủng tảo

DNA tổng số của các chủng *C. reinhardtii* 503 và 503-2 được tách theo quy trình của ZR Plant/Seed DNA Mini Prep Kit (Zymo Research Corporation, CA, USA). Gen *vp28* mã hóa cho protein VP28 được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số với cặp mồi đặc hiệu F-VP28: 5'-GCA TAT GGA TCT TTC TTT CAC TCT TTC G-3' (28 nu) và R-VP28: 5'-GCT CGA GCT CGG TCT CAG TGC CAG AG-3' (26 nu). Kích thước đoạn gen được khuếch đại theo tính toán lý thuyết là 615 bp. Phản ứng PCR được thực hiện với 50 µL hỗn hợp phản ứng chứa 25 µL dream hot start PRC, 2,5 µL primer F-VP28 (10 pM), 2,5 µL primer R-VP28 (10 pM), 3 µL DNA khuôn, 17 µL nước khử ion vô trùng. Chu trình nhiệt: 95°C-5', 40 X (95°C-30'', 57°C-30'', 72°C-1') và 72°C-5'. Chạy điện di để kiểm tra sản phẩm PCR trên gel 1,0% agarose.

Xác định sinh trưởng của tảo

Sinh trưởng của tảo được xác định thông qua mật độ tế bào (MĐTB) bằng buồng đếm Burker-Turk (Đức) (Dang et al., 2011)

Xác định tốc độ sinh trưởng đặc trưng

Tốc độ sinh trưởng đặc trưng của quần thể tảo sẽ được xác định theo công thức sau (Guillard & Sieracki, 2005).

$$\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (t_1 - t_0)$$

Trong đó, μ là tốc độ sinh trưởng đặc trưng của quần thể tảo có đơn vị (/ngày); N_1 là MĐTB tại thời điểm t_1 , N_0 là MĐTB tại thời điểm t_0 .

Tối ưu các điều kiện nuôi cấy chủng 503 và 503-2

Để xác định được điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng 503 và 503-2 trong bình tam giác 250 mL, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của 7 môi trường dinh dưỡng (TAP, NAPK, C, CA, B3N, HS và HNS); dải nhiệt độ (15, 20, 25, 30°C và 35°C), pH (từ 3, 5, 7, 9 và 11), dải cường độ ánh sáng (2, 5, 7, 10 và 15 klux), các nguồn C khác nhau (Tris-base, Acetate, Na₂-glycerophosphate và NaHCO₃), các nguồn nitơ khác nhau (TAP - nitơ hỗn hợp,

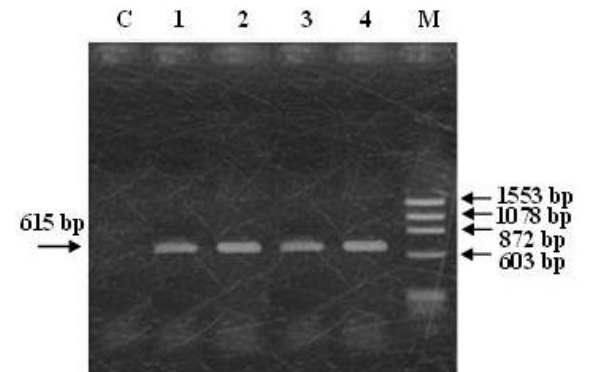
NO₃⁻, NH₄⁺ và urea) và dải độ mặn thích hợp (50, 100, 200, 300 và 400 mM), thí nghiệm được tiến hành 10–18 ngày; 3–4 ngày/lần lấy mẫu để xác định sinh trưởng của tảo.

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA ở mức ý nghĩa $p \leq 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự ổn định gen mã hóa protein VP28 của chủng tái tổ hợp 503-2 ở các cấp độ nuôi khác nhau

Chủng tái tổ hợp *C. reinhardtii* 503-2 đã được nhân nuôi ở các cấp độ nuôi khác nhau từ bình tam giác 250, 500 và 1000 mL trong 18 ngày và kiểm tra sự có mặt của gen *vp28* trong sinh khối tảo thu được. Kết quả nghiên cứu thu được ở hình 1 cho thấy, sinh khối chủng 503-2 ở cả 4 cấp độ nuôi đều thấy xuất hiện băng kích thước xấp xỉ 600 bp (tương ứng với kích thước lý thuyết của gen *vp28*) trong khi chủng 503 không có băng này. Điều này cho thấy gen *vp28* chèn trong hệ gen của chủng tái tổ hợp 503-2 vẫn được duy trì ổn định qua các cấp độ nuôi từ 250 đến 1000 mL. Chính vì vậy, chủng này đã được sử dụng cho các thí nghiệm lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp để nhân sinh khối chủng tái tổ hợp có chứa gen *vp28* để biểu hiện protein tái tổ hợp.



Hình 1. Nhân đoạn gen mã hóa cho protein VP28 ở *C. reinhardtii*

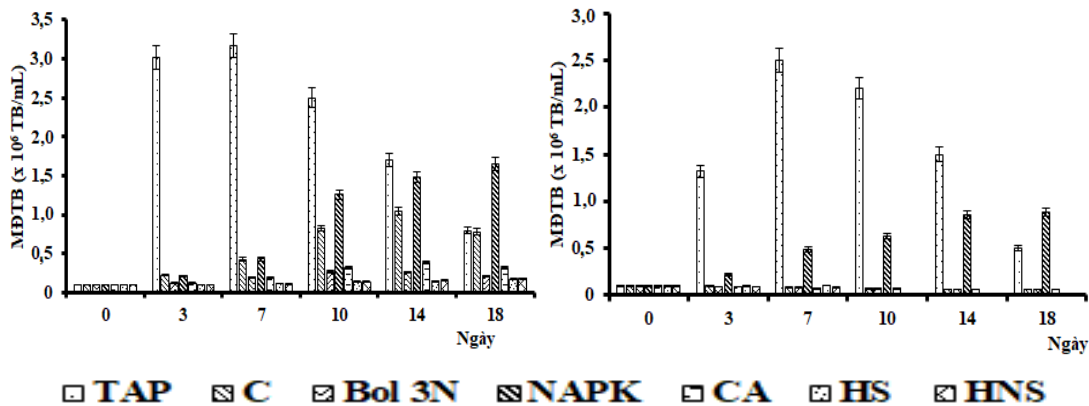
C-C. reinhardtii chủng 503, Sản phẩm PCR của gen *vp28* từ sinh khối chủng *C. reinhardtii* 503-2 nuôi ở bình tam giác 100 mL(1), bình 250 mL(2), bình 500 mL(3), bình 1000 mL(4) và M là Marker ϕ X174Hae III digest

Lựa chọn môi trường dinh dưỡng thích hợp để nuôi tảo *C. reinhardtii*

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của 7 môi trường dinh dưỡng lên sinh trưởng của chủng đối chứng (503) và tái tổ hợp (503-2) đánh giá bằng MĐTB được trình bày ở hình 2.

Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy, TAP là môi trường dinh dưỡng tốt nhất cho sinh trưởng của cả 2 chủng đối chứng và tái tổ hợp, với MĐTB cực đại đạt giá trị lần lượt là $3,17 \pm 0,01 \times 10^6$ và $2,5 \pm 0,07 \times 10^6$ tế bào/mL sau 3 và 7 ngày nuôi, tương ứng. Sau môi trường TAP, MĐTB của tảo giảm dần ở môi trường nuôi tương ứng là NAPK, C, Bol 3N, CA, HS và HNS. Đặc biệt, đối với chủng tái tổ hợp, tảo bị chết hoàn toàn ở môi trường dinh dưỡng HS và HNS sau 10 ngày nuôi cấy. Môi trường NAPK

có MĐTB tăng chậm nhưng vẫn giữ được trạng thái tảo tốt. Chính vì vậy, nếu cần giữ chủng, nên chọn môi trường NAPK để duy trì tảo được lâu dài, còn môi trường TAP có thể được sử dụng trong các thí nghiệm thu sinh khối cần MĐTB cao trong một khoảng thời gian ngắn. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$) về MĐTB giữa môi trường TAP với 6 môi trường nuôi còn lại. Thời gian tảo đạt MĐTB cực đại ở chủng đối chứng ngắn hơn so với chủng tái tổ hợp. Hơn nữa, tốc độ sinh trưởng đặc trưng (μ /ngày) của cả 2 chủng tảo *C. reinhardtii* ở môi trường dinh dưỡng TAP cũng đạt giá trị cao nhất so với 6 môi trường còn lại. Chủng đối chứng 503 có tốc độ sinh trưởng đặc trưng μ cao hơn chủng tái tổ hợp, tương ứng 1,15/ngày so với 0,46/ngày.



Hình 2. Thay đổi MĐTB của chủng đối chứng 503 (a) và chủng tái tổ hợp 503-2 (b) ở các môi trường dinh dưỡng khác nhau

Vì vậy, môi trường TAP được chọn là môi trường nuôi cơ bản cho các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp cho sinh trưởng của tảo *C. reinhardtii*

Sau khi lựa chọn được môi trường dinh dưỡng thích hợp để nuôi tảo *C. reinhardtii* chủng đối chứng và tái tổ hợp, ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, cường độ ánh sáng, pH, độ mặn, nguồn nitơ và carbon lên sinh trưởng được tiếp tục nghiên cứu nhằm tìm ra các điều kiện nuôi tối ưu. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở hình 3-8.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

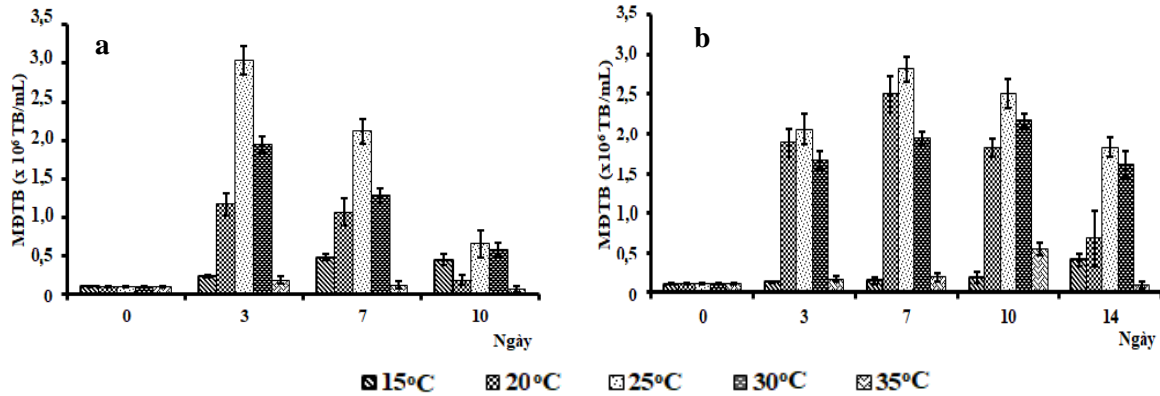
Nhiệt độ ảnh hưởng tới các quá trình chuyển hóa trong tế bào thông qua việc ảnh hưởng đến

sự lưu thông của màng, sự khuếch tán của các phân tử và đặc biệt ảnh hưởng đến các phản ứng sinh hóa thông qua kiểm soát động học của enzyme (Raven & Geider 1988; Davison, 1991). Kết quả thu được về ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh trưởng của chủng đối chứng và tái tổ hợp (hình 3) đã cho thấy chủng 503 sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ 25°C, với MĐTB đạt cao nhất là $3,04 \pm 0,12 \times 10^6$ TB/mL sau 3 ngày nuôi (hình 3a).

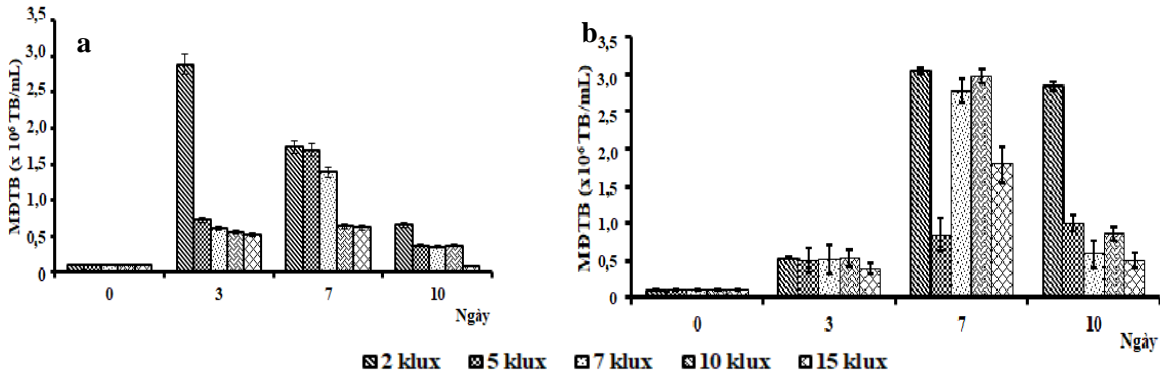
Ở nhiệt độ trên, tế bào tảo giữ được trạng thái sinh dưỡng, màu xanh và có khả năng chuyển động. Có sự sai khác đáng kể giữa MĐTB ở nhiệt độ 25°C và các nhiệt độ còn lại ($p < 0,05$). Ở nhiệt độ 20 và 30°C, tảo này sinh trưởng chậm hơn với MĐTB cực đại chỉ đạt tương ứng là $1,17 \pm 0,15 \times 10^6$ và $1,94 \pm 0,09 \times$

10^6 TB/mL sau 3 ngày nuôi. Sau 7 ngày nuôi, MĐTB ở tất cả các nhiệt độ đều có xu hướng giảm đáng kể do tế bào bị tan. Điều này có thể do ở nhiệt độ trên tối ưu, tốc độ tăng trưởng của tảo đột ngột giảm do giảm tổng hợp protein (Renaud et al., 2002). Trong khi đó, chủng 503-

2 có khả năng sinh trưởng tốt trong dải nhiệt độ 20–30°C và đạt giá trị MĐTB cao nhất là $2,82 \pm 0,16 \times 10^6$ TB/mL ở nhiệt độ 25°C sau 7 ngày nuôi (hình 3b). Không có sự khác biệt có ý nghĩa về MĐTB giữa nhiệt độ 20 và 25°C ($p > 0,05$).



Hình 3. Thay đổi MĐTB của chủng đối chứng 503 (a) và chủng tái tổ hợp 503-2 (b) ở nhiệt độ khác nhau



Hình 4. Thay đổi MĐTB của chủng đối chứng 503 (a) và chủng tái tổ hợp 503-2 (b) ở cường độ chiếu sáng khác nhau

Như vậy, nhiệt độ 25°C thích hợp nhất cho sinh trưởng của cả 2 chủng 503 và 503-2. Kết quả thu được hoàn toàn tương đồng với công bố của Haris (1989), Vitová et al. (2011) về nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng của vi tảo *C. reinhardtii* là 20–25°C. Hơn nữa, ở nhiệt độ tối ưu, tảo *C. reinhardtii* duy trì trạng thái tế bào sinh dưỡng cao, đây là giai đoạn tảo phân chia tế bào dẫn đến gia tăng MĐTB nhanh chóng.

Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng

Ánh sáng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới sinh trưởng của tảo và rất khó để kiểm soát. Kết quả ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên sinh trưởng của chủng đối chứng và tái tổ hợp được trình bày ở hình 4. Nhìn chung, trong

dải cường độ ánh sáng 2–15 klux được thử nghiệm, cường độ sáng 2 klux là tối ưu nhất cho sinh trưởng của cả 2 chủng 503 và 503-2 với MĐTB cực đại đạt lần lượt là $3,12 \pm 0,29 \times 10^6$ và $3,04 \pm 0,22 \times 10^6$ TB/mL sau 3 và 7 ngày nuôi, tương ứng. Ở cường độ sáng 5, 7 và 10 klux, cả hai chủng tảo đều sinh trưởng chậm hơn và không có sự sai khác nhiều về MĐTB giữa các cường độ ánh sáng này ($p > 0,05$).

Kết quả thu được cũng tương tự với công bố của Chae et al. (2014) về cường độ ánh sáng tối ưu cho sinh trưởng của tảo *C. reinhardtii* là 2,38 klux. Ở cường độ ánh sáng cao hơn (4,66 klux) và thấp hơn (1,33 klux) thì tốc độ sinh trưởng của tảo này đều bị ức chế. Tuy nhiên,

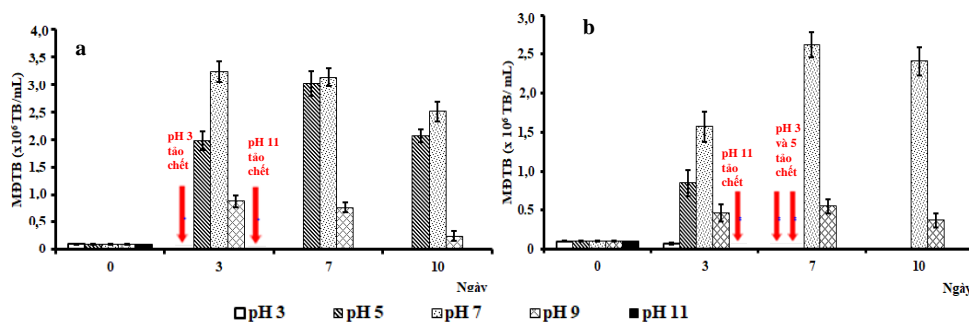
công bố của Lehr et al. (2012) khi nuôi cấy quang tự dưỡng tảo *C. reinhardtii* Strm6 trong hệ thống kín (PBR) có thể tích 2 lít trong môi trường TAP không bổ sung acetate, nhiệt độ 25°C, có sục 5% khí CO₂ với tốc độ dòng khí là 30 mL/phút đã cho thấy ở cường độ sáng 0–200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (tương đương 0–10 klux), sinh trưởng của tảo tăng mạnh khi cường độ ánh sáng tăng; ở ngưỡng 200–1700 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (tương đương 10–34 klux), sinh trưởng của tảo tăng nhẹ khi tăng cường độ chiếu sáng. Cường độ chiếu sáng vượt ngưỡng 1.700 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (34 klux), sinh trưởng của tảo giảm rất mạnh do quá trình quang ức chế đã xảy ra. Sự khác nhau này có thể do đặc điểm di truyền của các chủng tảo sử dụng cho nghiên cứu là khác nhau.

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi

pH môi trường ảnh hưởng đến khả năng hòa tan và hấp thụ các chất dinh dưỡng của tế bào. Do vậy, pH là một trong những yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng tới sinh trưởng của tảo. Trong thí nghiệm này, 2 chủng tảo được nuôi trong môi trường có giá trị pH thay đổi từ 3, 5, 7, 9 và 11. Kết quả chỉ ra ở hình 5a đã cho thấy pH môi

trường nuôi dao động 5–7 (nghiêng về tính axit) là thích hợp nhất cho sinh trưởng của chủng đối chứng 503, với giá trị MĐTB và tốc độ sinh trưởng đặc trưng (μ) đạt cao nhất là $3,24 \pm 0,23 \times 10^6$ TB/mL và 1,18/ngày, tương ứng. Đối với chủng tái tổ hợp 503-2, pH môi trường trung tính (pH = 7) là thích hợp nhất cho sinh trưởng của chủng này, với MĐTB cực đại và tốc độ sinh trưởng đặc trưng đạt lần lượt là $2,62 \pm 0,28 \times 10^6$ TB/mL và 0,46/ngày (hình 5b). Ở ngưỡng pH < 5 và pH > 9, sinh trưởng của cả 2 chủng này đều bị ức chế mạnh và tảo bị chết ngay sau 1 ngày nuôi.

Kết quả thu được cũng tương tự với công bố của Messerli et al., (2005) cho rằng pH 6,5–8 là phù hợp cho sinh trưởng của tảo *C. reinhardtii*. Hơn nữa, Moroney & Tolbert (1985) đã xác định rằng pH < 6,95 giúp việc sử dụng CO₂ cho quang hợp ở tảo *C. reinhardtii* được hiệu quả hơn. Ở môi trường có pH quá axit hoặc quá kiềm sẽ ảnh hưởng xấu đến sự hấp thụ dinh dưỡng (Gensemer et al., 1993) hoặc gây ra độc tính kim loại (Anderson & Morel, 1978), từ đó ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng và phát triển của tảo.



Hình 5. Thay đổi MĐTB của chủng đối chứng 503 (a) và chủng tái tổ hợp 503-2 (b) ở pH môi trường nuôi khác nhau

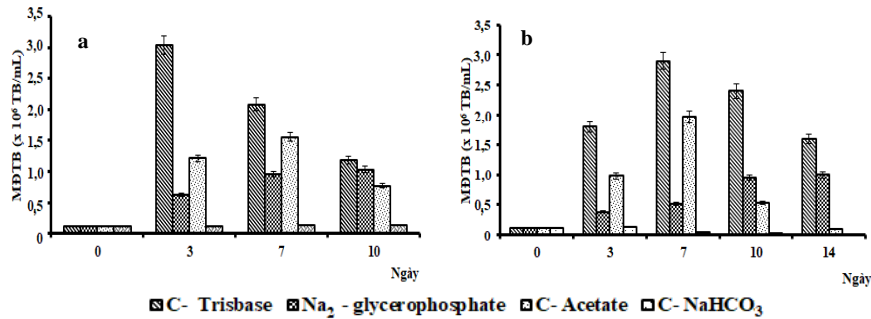
Ảnh hưởng của nguồn carbon

Carbon chiếm khoảng 50% sinh khối khô tế bào (Becker, 1994) và là chất dinh dưỡng thiết yếu nhất cho sự phát triển của vi tảo. Nguyên tử carbon là thành phần cấu tạo của tất cả các phân tử hữu cơ và khung carbon là cốt lõi của tất cả các chất chuyển hóa trong tế bào. Đã có công bố cho thấy *C. reinhardtii* có khả năng sinh trưởng theo kiểu quang tự dưỡng và tạp dưỡng, do chúng có khả năng sử dụng được cả nguồn carbon vô cơ hoặc hữu cơ. Chính vì vậy, trong thí nghiệm ảnh hưởng của nguồn carbon, chúng tôi sử dụng 4 nguồn carbon khác nhau là

Trisbase, acetate, NaHCO₃ và Na₂-glycerophosphate để nuôi cả 2 chủng tảo (hình 6). Kết quả nghiên cứu trình bày ở hình 6 đã cho thấy sinh trưởng của cả 2 chủng đối chứng và tái tổ hợp đều đạt cao nhất ở nguồn C-Trisbase (nguồn carbon được sử dụng trong môi trường TAP chuẩn) với giá trị MĐTB cực đại đạt $3,04 \pm 0,12 \times 10^6$ và $2,9 \pm 0,12 \times 10^6$ TB/ml sau 3 và 7 ngày nuôi, lần lượt. MĐTB giảm dần ở các công thức có nguồn carbon là acetate, Na₂-glycerophosphate và NaHCO₃, tương ứng. Ở công thức có nguồn C-NaHCO₃, tảo hầu như không sinh trưởng và chết sau 7 ngày nuôi.

Điều này có thể do bổ sung nguồn C-NaHCO₃ làm tăng pH của môi trường nuôi về ngưỡng

bazơ, trong khi đó, sinh trưởng thích hợp của tảo này ở môi trường pH trung tính.



Hình 6. Thay đổi MĐTB của chủng đối chứng 503 (a) và chủng tái tổ hợp 503-2 (b) ở các nguồn carbon khác nhau

Kết quả thu được về nguồn carbon thích hợp cho sinh trưởng của 2 chủng 503 và 503-2 trong thí nghiệm của chúng tôi có sai khác so với công bố của Taghavi & Robinson (2016) khi nuôi tảo *C. reinhardtii* CC125 (chủng hoang dại) và CW15 (đột biến thành tế bào) trên môi trường Tris phosphate (TP) rắn và lỏng có bổ sung nguồn carbon khác nhau như acetate, glycerol (nồng độ từ 10–100 mM) hoặc methanol (nồng độ từ 0,01–718 mM). Trong 3 nguồn carbon được sử dụng, nguồn acetate (10 và 35 mM) cho tốc độ tăng trưởng cao hơn so với hai nguồn carbon còn lại và các nồng độ khác. Cả hai chủng này có tốc độ tăng trưởng cao nhất ở nồng độ acetate 35 mM và glycerol 10 mM. Sự sai khác này có thể do đặc điểm di truyền của từng chủng tảo thí nghiệm. Chính vì vậy, đối với chủng 503 và 503-2 vẫn giữ nguyên nguồn carbon trong môi trường TAP cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nitơ là một trong những chất dinh dưỡng chính trong quá trình trao đổi chất của vi tảo. Đây là thành phần thiết yếu của tất cả các protein trong tế bào, các axit nucleic và sắc tố chlorophyll. Nitơ có thể chiếm từ 1 đến 20% sinh khối khô (Richmond, 2004), tùy thuộc vào nguồn cung cấp và hiệu quả sử dụng của từng nguồn nitơ khác nhau. Tảo *C. reinhardtii* không tích lũy các hợp chất nitơ nội bào (Harris, 2009). Vì vậy, nitơ phải được cung cấp sẵn trong môi trường nuôi để cho tảo sinh trưởng và phát triển. *C. reinhardtii* có thể hấp thu được một số nguồn nitơ khác nhau như nitrate, nitrite, urea hoặc ammonium (Harris, 1989). Chính vì vậy, trong

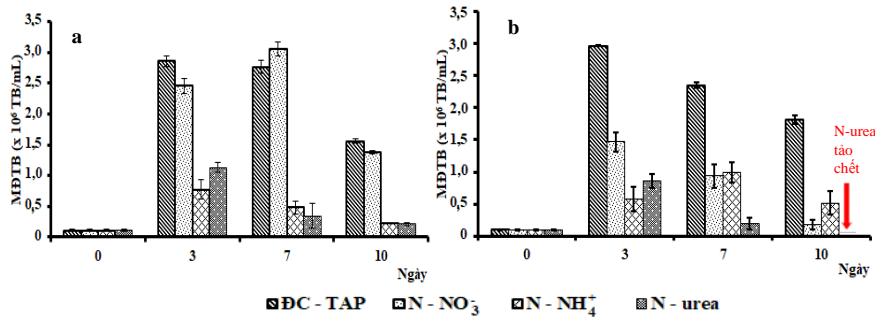
thí nghiệm ảnh hưởng của nitơ, 3 nguồn nitơ chính là N-Nitrate; N-Amonium và N-Urea đã được sử dụng cho nuôi tảo *C. reinhardtii*. Kết quả nghiên cứu chỉ ra trên hình 7a đã cho thấy chủng 503 sinh trưởng tốt nhất ở nguồn nitơ là nitrate với MĐTB cực đại đạt $3,06 \pm 0,12 \times 10^6$ TB/mL sau 7 ngày nuôi. Dịch tảo ở công thức này vẫn có màu xanh đặc trưng, các tế bào còn nguyên vẹn sau 10 ngày theo dõi. Ở công thức nguồn nitơ còn lại, sinh trưởng của chủng 503 có xu hướng giống nhau: Sinh trưởng của tảo tốt nhất trong khoảng 3 ngày đầu, sau đó tảo bị tàn nhanh, dịch tảo chuyển sang màu xanh vàng, tế bào tan; MĐTB ở các công thức này đều bị giảm nhanh. Vì vậy, nguồn N-NO₃ được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo cho chủng đối chứng 503.

Trong khi đó, chủng 503-2 lại có sinh trưởng tốt nhất ở nguồn nitơ hỗn hợp (nguồn nitrate và amonium đã có trong môi trường TAP chuẩn), với giá trị MĐTB cực đại đạt là $2,96 \pm 0,12 \times 10^6$ TB/mL sau 7 ngày nuôi. Tiếp theo là công thức N-Amonium, với giá trị MĐTB cực đại là $1,94 \pm 0,08 \times 10^6$ TB/mL. Công thức nguồn N-NO₃ tảo sinh trưởng chậm hơn, 1 số tế bào tảo bị tan. Công thức N-Urea tảo chỉ duy trì màu xanh đặc trưng được 3 ngày, sau đó dịch tảo chuyển sang màu xanh vàng và tế bào tan hoàn toàn ở ngày thứ 10 sau nuôi (hình 7b). Vì vậy, đối với chủng 503-2 nguồn nitơ có sẵn trong môi trường TAP được chọn cho các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

Nguồn nitơ thích hợp cho sinh trưởng của tảo *C. reinhardtii* phụ thuộc nhiều vào chủng tảo. Theo công bố của Florencio & Vega (1983) cho thấy nguồn nitơ ưu tiên cho sinh trưởng của

tảo *C. reinhardtii* là nguồn N-Amonium (NH_4^+) do quá trình đồng hoá ammonium đòi hỏi ít năng lượng hơn so với các nguồn nitơ phổ biến khác như nitrate và nitrite (Grossmann, 2000). Nitrate và nitrite cần được khử chuyển đổi sang dạng ammonium, quá trình này đòi hỏi năng

lượng, do vậy, sự phát triển của tảo trên nguồn nitrate xảy ra chậm hơn so với ammonium. Hơn nữa, một số chủng tảo như *C. reinhardtii* 137c không có hoạt tính nitrate reductase (Nichols et al., 1978). Vì vậy, chúng không thể sử dụng nguồn N-nitrate để tăng trưởng được.

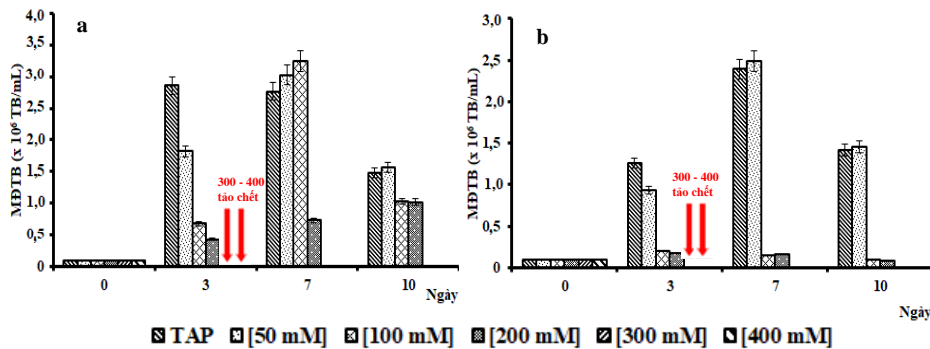


Hình 7. Thay đổi MĐTB của chủng đối chứng 503 (a) và tái tổ hợp 503-2 (b) ở các nguồn nitơ khác nhau

Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Kết quả thu được về ảnh hưởng của nồng độ muối lên sinh trưởng của 2 chủng tảo nghiên cứu được trình bày ở hình 8. Sau 10 ngày nuôi, sinh trưởng của chủng 503 tốt nhất ở nồng độ muối là 100 mM (MĐTB đạt $3,25 \pm 0,08 \times 10^6$ TB/mL), tiếp theo là 50 mM ($3,03 \pm 0,18 \times 10^6$ TB/mL) sau 7 ngày (hình 8a). Dịch tảo ở 2 công thức này có màu xanh đặc trưng, tế bào còn nguyên vẹn. Ở nồng độ muối là 200 mM tảo sinh trưởng phát triển chậm. Ở nồng độ muối là 300 mM và 400 mM, tảo bị chết sau 3 ngày nuôi.

Chủng tái tổ hợp 503-2, rất nhạy cảm với các điều kiện nuôi nên sinh trưởng rất chậm trong môi trường có các nồng độ muối được nghiên cứu. Sau 10 ngày nuôi cây, sinh trưởng của chủng tảo này tốt nhất ở nồng độ muối là 50 mM, với giá trị MĐTB đạt là $2,49 \pm 0,05 \times 10^6$ TB/mL sau 7 ngày nuôi cây (hình 8b). Ở nồng độ muối này, tế bào tảo có màu xanh đặc trưng và còn nguyên vẹn. Ở các nồng độ muối cao hơn sinh trưởng của tảo bị giảm dần. Ở công thức có nồng độ muối là 300 mM và 400 mM thì tảo chết sau 3 ngày nuôi.



Hình 8. Thay đổi MĐTB của chủng đối chứng 503 (a) và chủng tái tổ hợp 503-2 (b) ở các nồng độ muối khác nhau

Công bố của Reynoso & de Gamboa (1982) đã cho thấy khi tăng nồng độ muối NaCl (0,085 M, tương đương 4,96 g NaCl/L) đã làm giảm 48% MĐTB của chủng *Chlamydomonas*. Tăng trưởng của tảo gần như bị ức chế hoàn toàn ở

nồng độ $\text{NaCl} \geq 8$ g/L. Trong khi đó, Salama et al. (2014) công bố chủng tảo *C. mexicana* có khả năng sinh trưởng trong nước thải sinh hoạt của thành phố ở các độ mặn khác nhau lên đến 400 mmol NaCl trong 10 ngày. Kết quả nghiên

cứu đã cho thấy *C. mexicana* có tốc độ tăng trưởng cao hơn ở ngưỡng 100 và 200 mM NaCl. Như vậy, sự thích ứng với nồng độ muối ở tảo *Chlamydomonas* phụ thuộc vào đặc tính di truyền của từng chủng thí nghiệm. Trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi, đối với chủng 503 và 503-2 nên bổ sung thêm muối ở nồng độ 50-100 mM cho các thí nghiệm tiếp theo.

KẾT LUẬN

Các kết quả trong nghiên cứu này cho thấy gen *vp28* trong hệ gen của chủng tái tổ hợp *C. reinhardtii* 503-2 vẫn được duy trì ổn định qua các cấp độ nuôi khác nhau. Điều kiện thích hợp cho sinh trưởng của 2 chủng đối chứng và tái tổ hợp *C. reinhardtii* 503 và 503-2 là: môi trường TAP, nhiệt độ 25°C, cường độ ánh sáng 2 klux, pH = 7, nguồn carbon là Trisbase, nguồn nitơ là nitrate hoặc nitơ hỗn hợp trong môi trường TAP, nồng độ muối 50–100 mM. Dưới điều kiện nuôi thích hợp, mật độ tế bào cực đại của chủng đối chứng và tái tổ hợp đạt lần lượt là $3,25 \pm 0,08 \times 10^6$ và $2,96 \pm 0,17 \times 10^6$ TB/ mL sau 3 và 7 ngày nuôi.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu tạo chủng vi tảo *Chlamydomonas reinhardtii* biểu hiện protein VP28 của virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) ở tôm để làm thức ăn phòng bệnh đốm trắng” thuộc chương trình Công nghệ sinh học trong nông nghiệp-thủy sản, Bộ NNPTNT năm 2017–2019. Đề tài có sử dụng một số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anderson D. M., Morel F. M. M., 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 283–295.
- Becker E. W., 1994. *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 301p.
- Bischoff H. W., Bold H. C., 1963. *Phycological Studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species*. University of Texas Publication, 6318: 68.
- Chae J., Jegal S. H., Keraiff T., Sepehri K., 2014. Effect of light intensity on *Chlamydomonas reinhardtii* growth rate. *The Expedition*, 4.
- Dang D. H., Hoang T. L. A., Ngo T. H. T., 2011. Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6 isolated from Phu Quoc Island, Kien Giang province, Viet Nam. *J. Phycol.*, 47(4): 944–954.
- Davison I. R., 1991. Environmental effects on algal photosynthesis-temperature. *J. Phycol.*, 27(1): 2–8.
- Doron L., Segal N., Shapira M., 2016. Transgene expression in microalgae - from tools to applications. *Front Plant Sci.*, 7: 505.
- Florencio F. J., Vega J. M., 1983. Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 158: 288–293.
- Geier S. C., Huyer S., Praebst K., Husmann M., Walter C., Buchholz R., 2012. Outdoor cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* for photobiological hydrogen production. *J. Appl. Phycol.*, 24: 319–327.
- Gensemer R.W., Smith R. E. H., Duthie H. C., 1993. Comparative effects of pH and aluminum on silica limited growth and nutrient uptake in *Asterionella ralfsii* var. Americana (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 29(1): 36–44.
- Gorman D. S., Levine R. P., 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 54(6): 1665–1669.
- Grossman A., 2000. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist*, 151(3): 201–224.
- Guillard R. R., Sieracki M. S., 2005. Counting cells in cultures with the light microscope. In: Andersen RA (ed). *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, London, 239–252.
- Harris E. H., 1989. *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic Press Inc, San Diego, 780p.
- Harris E. H., 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Plant Mol. Biol.*, 52: 363–406.
- Harris E. H., 2009. *The Chlamydomonas sourcebook (second edition)*. Introduction to

- Chlamydomonas* and its laboratory use, vol 1. Academic Press, San Diego.
- Hou C. L., Cao Y., Xie R. H., Wang Y. Z., Du H. H., 2011. Characterization and diagnostic use of a monoclonal antibody for VP28 envelope protein of white spot syndrome virus. *Virologica Sinica*, 26(4): 260–266.
- Đặng Diễm Hồng, Đinh Đức Hoàng, Nguyễn Thị Thủy, Hoàng Thị Lan Anh, 2010. Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi trồng vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin. *Tạp chí Sinh học*, 32(2): 43–53.
- Ichimura T., Watanabe M., 1974. The *Closterium calosporum* complex from the Ryukyu Islands - variation and taxonomical problems. *Mem. Natn. Sci. Mus. Tokyo*, 7: 89–102.
- Jha R. K., Xu Z. R., 2005. Production of recombinant enveloped structural proteins from the Chinese WSSV isolate. *Indian J. Clin. Biochem.*, 20(2): 136–141.
- Lehr F., Morweiser M., Sastre R. R., Kruse O., Posten C., 2012. Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics. *J. Biotechnol.*, 162: 89–96.
- Li X., Liu Q. H., Hou L., Huang J., 2010. Effect of VP28 DNA vaccine on white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*, 18(6): 1035–1044.
- Kuin H., Koerten H., Ghijsen W. E., Munnik T., van den Ende H., Musgrave A., 2000. *Chlamydomonas* contains calcium stores that are mobilized when phospholipase C is activated. *Planta*, 210: 286–94.
- Maucourt K., Agarwal M., Rene B., Femandjian S., 2002. Use of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants for anticancer drug screening. *Biochem. Pharmacol.*, 64 (7): 1125–1131.
- Mayfield S., Manuell A., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D., Muto M., Marin N. J., 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18(2): 126–133.
- Messerli M. A., Zettler L. A. A., Zettler E., Jung S. K., Smith P. J. S., Sogin M. L., 2005. Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *J. Exp. Biol.*, 208, 2569–2579.
- Moroney J. V., Tolbert N. E., 1985. Inorganic carbon uptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 77: 253–260.
- Nichols G. L., Shehata S. A. M., Syrett P. J., 1978. Nitrate reductase deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemical characteristics. *J. Gen. Microbiol.*, 108: 79–88.
- Raven J. A., Geider R.J., 1988. Temperature and algal growth. *New. Phytol.*, 110: 441–461.
- Renaud S. M., Thinh L. V., Lambrinidis G., Parry D. L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211: 195–214.
- Reynoso G., de Gamboa B., 1982. Salt tolerance in the freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*: effect of proline and taurine. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 73: 95–99.
- Richmond A. (ed) (2004). Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology., 1st edn. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Rout N., Kumar S., Jaganmohan S., Murugan V., 2007. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine*, 25(15): 2778–2786.
- Rosales-Mendoza S., Govea-Alonso D. O. 2015. The potential of plants for the production and delivery of human papillomavirus vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 14(7): 1031–1041
- Salama E. S., Abou-Shanaba R. A., Kim J. R., Lee S., Kim S. H., Oh S. E., Kim H. C., Roh H. S., Jeon B. H., 2014. The effects of salinity on the growth and biochemical properties of *Chlamydomonas mexicana* GU732420 cultivated in municipal wastewater. *J. Environ. Technol.*, 35(12): 1491–1498.
- Shomchai P., Jitrakorn S., Thitamadee S., Meetam M., Saksmerprome V., 2016. Use of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for production of double-stranded RNA

- against shrimp virus. *Aquacult. Rep.*, 3: 178–183.
- Sueoka N., 1960. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 46(1): 83–91.
- Taghavi N., Robinson G., 2016. Improving the optimum yield and growth of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and CW15 using various carbon sources and growth regimes. *Afr. J. Biotechnol.*, 15(23): 1083–1100.
- Witteveldt J., Cifuentes C. C., Vlak J. M., van Hulten M. C., 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J. Virol.*, 78(4): 2057–2061.
- Vitová M., Bisova K., Hlavova M., Kawano S., Zachleder V., Cizkova M., 2011. *Chlamydomonas reinhardtii*: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by temperature. *Planta*, 234: 599–608.
- Yang X., Liu P., Hao Z., Shi J., Zhang S., 2012. Microalgal strains for biofuel. *Bioresources*, 7(1): 686–695.
- Yi G., Wang Z., Qi Y., Yao L., Qian J., Hu L., 2004. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 37(6): 726–734.

THE SELECTION OF APPROPRIATE CULTURAL CONDITIONS FOR GROWTH OF RECOMBINANT GREEN MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii* IN LABORATORY CONDITION

Dang Diem Hong^{1*}, Luu Thi Tam¹, Le Thi Thom^{1,2}, Hoang Thi Lan Anh¹,
Ngo Thi Hoai Thu¹, Ha Thi Thu¹, Nguyen Minh Huong¹, Dong Van Quyen¹

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

SUMMARY

The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a model organism for studying mechanism of the body in response to changes in environmental conditions, photosynthesis as well as chloroplast biogenesis and can be modified to produce high value proteins. In this study, we present results on the selection of cultural conditions for the growth of cell wall - deficient mutant *C. reinhardtii* (503 strain-control) and recombinant 503-2 strain expressing VP28 protein of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in 250 ml flasks. Suitable conditions for the growth of both control and recombinant strains were TAP medium, temperature of 25°C, pH = 7, light intensity of 2 klux, C source - Trisbase, N source - nitrate and salinity of 50–100 mM. In these conditions, maximum cell density of the control and recombinant strains was $3.20 \pm 0.08 \times 10^6$ and $2.96 \pm 0.17 \times 10^6$ cells/ mL after 3 and 7 days of cultivation, respectively. The presence of *vp28* gene in the recombinant microalgal strain was stably maintained at all levels of culture. The results of this paper will be a scientific basis for culturing the recombinant *C. reinhardtii* to obtain algal biomass which had high expression of surface VP28 protein of WSSV's envelope for edible vaccine production vaccine by feeding in order to prevent white spot disease of shrimp.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, recombinant protein, TAP medium, *vp28* gene, WSSV.

Citation: Dang Diem Hong, Luu Thi Tam, Le Thi Thom, Hoang Thi Lan Anh, Ngo Thi Hoai Thu, Ha Thi Thu, Nguyen Minh Huong, Dong Van Quyen, 2018. The selection of appropriate cultural conditions for growth of recombinant green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in laboratory condition. *Tap chi Sinh hoc* 40(2): 204–214. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.11070>.

*Corresponding author email: ddhong60vn@yahoo.com

Received 11 January 2018, accepted 30 June 2018