

PHÂN LẬP ĐƯỢC VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG *SCHIZOCHYTRIUM* GIÀU DHA Ở VÙNG BIỂN HUYỆN ĐẢO PHÚ QUỐC

ĐẶNG ĐIỂM HỒNG, HOÀNG LAN ANH, NGÔ THỊ HOÀI THU

Viện Công nghệ sinh học

Trong số các loại vi tảo biển dị dưỡng sản sinh ra các axit béo không bão hòa đa nối đôi (polyunsaturated fatty acids - PUFAs) ω -3 cao, gồm có *Thraustochytrium aureum*, *Schizochytrium* spp., *Cryptocodinium cohnii*, *Ulkenia* spp., *Amphidinium carterae* và *Labyrinthula* spp.... thì vi tảo *Schizochytrium* có thể cho sản lượng DHA (docosahexaenoic acid, C22: 6n-3) cao nhất, đạt đến 138 mg/l/h [9]. Vì vậy, *Schizochytrium* hiện đang được quan tâm nghiên cứu, sử dụng để sản xuất thương mại DHA, làm thức ăn bổ sung cho người và động vật nuôi. Theo khoá phân loại của Porter (1990), *Schizochytrium* thuộc họ Thraustochytriidae (Thraustochytrids), lớp Labyrinthulea, ngành Heterokontophyta [8]. Các tế bào *Schizochytrium* có dạng hình cầu, có mạng lưới ngoại chất xuất phát từ bề mặt tế bào [3, 4, 7].

Cho đến nay, vi tảo *Schizochytrium* đã và đang được sản xuất công nghiệp ở một số nước trên thế giới. Một quy trình công nghệ nuôi trồng *Schizochytrium* đã được công ty Martek Biocience (Mỹ) thiết lập với hiệu suất 20g sinh khối tảo khô/l sau 48 giờ nuôi cấy và hàm lượng PUFAs ω -3 chiếm 10% sinh khối tế bào. Ở Nhật Bản, hiệu suất lên men của chủng *Schizochytrium limacinum* SR21 đạt 48,1 g trọng lượng khô (TLK)/l và 13,3 g DHA/l sau 4 ngày nuôi cấy [11].

Sau *Labyrinthula* [5], *Schizochytrium* là chi vi tảo biển dị dưỡng thứ hai thuộc họ Thraustochytriidae được phát hiện và phân lập ở Việt Nam, tại phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học. Từ các mẫu lá cây trôi dạt được thu từ vùng biển huyện đảo Phú Quốc, chúng tôi đã phát hiện, phân lập và nuôi cấy ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm 2 chủng vi tảo *Schizochytrium* có hàm lượng lipid tổng số

chiếm gần 38 - 41% TLK tế bào và DHA chiếm 38 - 45% lipid tổng số.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Mẫu vật: là những lá cây đước (*Rhizophora apiculata* Blume, thuộc họ Đước - Rhizophoraceae) đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bia rừng ngập mặn thuộc vùng biển huyện đảo Phú Quốc (gồm An Thới, Hàm Ninh, Gành Dầu), tỉnh Kiên Giang vào tháng 7/2006.

- Môi trường phân lập: môi trường cơ bản để phân lập vi tảo *Schizochytrium* được ký hiệu là GPYc. Môi trường có chứa glucoza (2 g/l), polypepton (1 g/l), cao nấm men (0,5 g/l), thạch (15 g/l), 50% pure salt-ASW (17,5 g/l) - nước biển nhân tạo có nồng độ tương đương 1,5% NaCl (Tropic Marine Aquarientechnik, Wartenberg, Germany) và chloramphenicol (50 mg/l).

- Môi trường nuôi lỏng: sau khi phân lập, *Schizochytrium* được nuôi cấy trên môi trường cơ bản M1, có thành phần như sau: glucoza (30 g/l), cao nấm men (10 g/l), ASW (17,5 g/l) trong bình tam giác 250 ml ở 28°C và lắc 200 vòng/phút, trong tối.

- Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu gồm có: kính hiển vi quang học Olympus CH02 (Nhật Bản), buồng đếm số lượng tế bào Burkerturk (Đức), cân phân tích Precisa XT2200A (Thụy Điển), tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, máy lắc IKA KS260 basic (Đức), máy soxhlet, máy sắc ký khí - lỏng GC - MS - HP - 6890, ghép nối với Mass Selective Detector Aglient 5973; cột HP - 5MS (0,25 cm \times 30 m \times 0,25 mm); khí mang He; thư viện phổ khối WILEY275.L và NIST 98.L.

Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.

2. Phương pháp

- Quy trình phân lập: vi tảo *Schizochytrium* được phân lập theo phương pháp của Yokochi và cs. (1998) [11] có sử dụng phấn thông (pine-pollen). Sau khi thu thập, các mẫu lá được rửa sạch bằng nước biển, cắt ba mảnh với kích thước 0,5 cm × 0,5 cm cho vào các ống nghiệm có chứa 5ml nước biển nhân tạo đã khử trùng và bổ xung phấn thông. Sau đó, các ống nghiệm được giữ ở 28°C trong tối. Sau 24 giờ, dùng que cấy platin thu lấy phấn thông nổi trên bề mặt nước và ria cấy trên đĩa petri chứa môi trường GPYc. Các đĩa này được đặt ở 28°C, trong tối. Sau 3-5 ngày, các đĩa này được quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus CH02 (Nhật Bản) với độ phóng đại 100 lần. Quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào *Schizochytrium* có dạng hình tròn, tập trung thành từng cụm bao quanh hạt phấn thông. Việc cấy chuyển trên môi trường GPYc nhiều lần cho phép thu được các khuẩn lạc *Schizochytrium* sạch vi khuẩn và nấm.

- Xác định tốc độ sinh trưởng bằng phương pháp đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm Burkner Turk và cân TLK (sấy ở 105°C, 2 giờ) ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau, trên môi

trường M1.

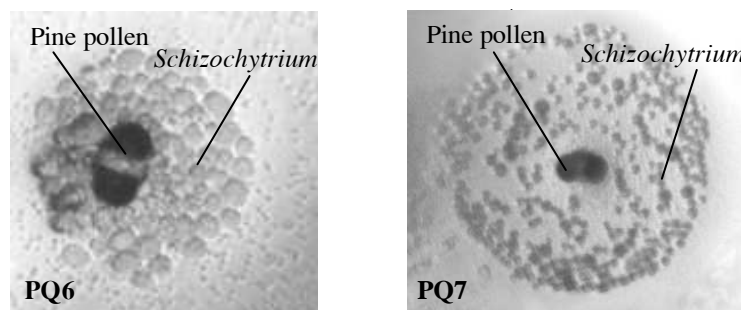
- Phân tích hàm lượng lipid tổng số bằng máy soxhlet theo Nguyễn Văn Mùi [6].

- Phân tích thành phần và hàm lượng PUFAs bằng phương pháp sắc ký khí lỏng (tại Viện Hoá học các hợp chất tự nhiên) theo Hoàng Lan Anh và cs., 2005 [5].

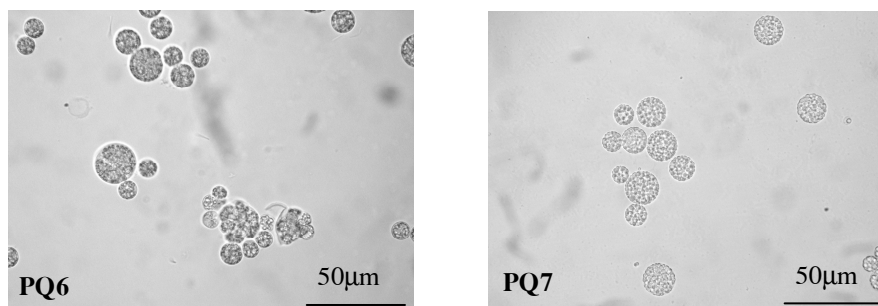
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập vi tảo *Schizochytrium*

Với 17 mẫu lá cây được có sống lá thu tại vùng rừng ngập mặn ven biển của huyện đảo Phú Quốc, chúng tôi đã phát hiện, phân lập và nuôi cấy ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm được 2 chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7. Hình 1 minh họa hình dạng khuẩn lạc của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* này (chụp trên kính hiển vi quang học Olympus CH02 ở độ phóng đại 1200 lần). Hình 1 cho thấy, các tế bào *Schizochytrium* bám xung quanh hạt phấn thông và cho phép nhận diện và phân lập *Schizochytrium* một cách dễ dàng hơn. 2 chủng *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 có tế bào dạng hình cầu được trình bày ở hình 2.



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường GPYc



Hình 2. Hình dạng tế bào của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường M1

2. Tốc độ sinh trưởng của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 trên môi trường M1

Tốc độ sinh trưởng của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 được nuôi cấy trên môi trường M1, được chỉ ra ở bảng 1 và hình 3.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, hai chủng PQ6 và PQ7 có tốc độ phát triển khác nhau. Chủng PQ6 có mật độ tế bào, TLK đạt cao nhất sau 5 ngày

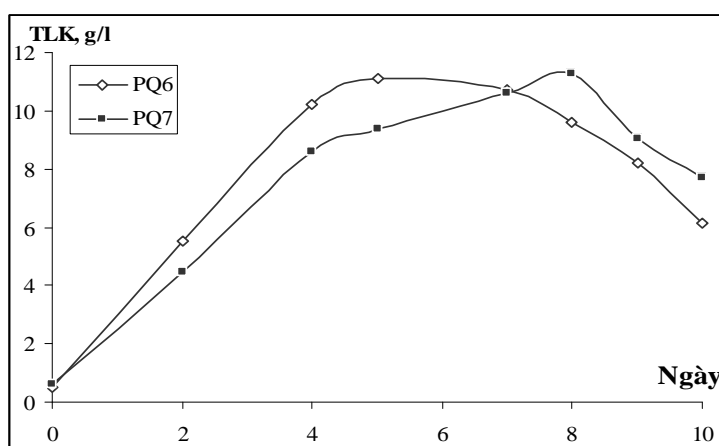
nuôi trồng trên môi trường M1 là 35,35 triệu tế bào/ml và 11,13 g TLK/l, tương ứng. Còn với chủng PQ7, mật độ và TLK đạt cao nhất sau 8 ngày nuôi cấy với các giá trị là 43,6 triệu tế bào/ml và 11,28 g TLK/l, tương ứng. TLK thu được của hai chủng nêu trên khác nhau không nhiều, song hàm lượng lipid lại tương đối khác nhau. Sau 5 ngày nuôi cấy, chủng PQ6 có hàm lượng lipid đạt 4,01 g/l, chiếm 38,67% TLK. Còn với chủng PQ7, sau 7 ngày nuôi cấy, các giá trị trên đạt 4,31 g/l và 40,59% TLK, tương ứng.

Bảng 1

Mật độ tế bào, trọng lượng khô (TLK) và hàm lượng lipid của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 trên môi trường M1

Chủng vi tảo	Ngày nuôi	Mật độ × 10 ⁶ tb/ml	TLK, (g/l)	Hàm lượng lipid, g/l	Hàm lượng lipid (%), g/gTLK
PQ6	0	0,24	0,05	-	-
	2	14,79	5,52	0,86	15,51
	4	23,60	10,21	2,25	21,99
	5	35,35	11,13	4,01	38,67
	7	26,50	10,72	3,72	33,36
	8	21,34	9,61	2,97	30,91
	9	19,42	8,21	2,31	28,14
	10	15,23	6,12	1,69	27,61
PQ7	0	0,22	0,05	-	-
	2	13,92	4,49	0,68	15,11
	4	21,40	8,59	1,74	20,23
	5	31,85	9,39	2,43	27,67
	7	33,65	10,63	4,31	40,59
	8	43,60	11,28	4,135	36,64
	9	21,47	9,05	2,29	25,31
	10	14,92	7,72	1,69	21,88

Ghi chú: (-). không xác định được do mật độ tế bào và sinh khối ban đầu thí nghiệm quá thấp.



Hình 3. Tốc độ sinh trưởng của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 trên môi trường M1

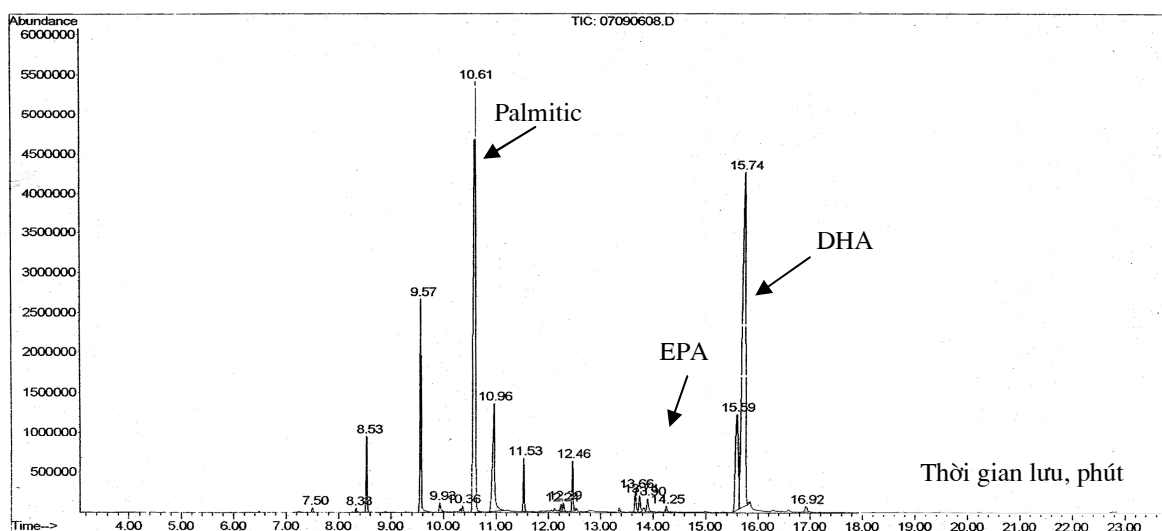
Trong thành phần lipid của vi tảo *Schizochytrium*, chúng tôi quan tâm đến hàm lượng PUFA, đặc biệt là DHA. Do vậy, thành phần axit béo bão hoà và không bão hoà (PUFAs) của chủng PQ6 (sau 5 ngày nuôi cấy)

và chủng PQ7 (sau 7 ngày nuôi cấy) đã được phân tích. Kết quả phân tích hàm lượng axit béo ở hai chủng PQ6 và PQ7 được chỉ ra ở bảng 2, hình 4 và 5.

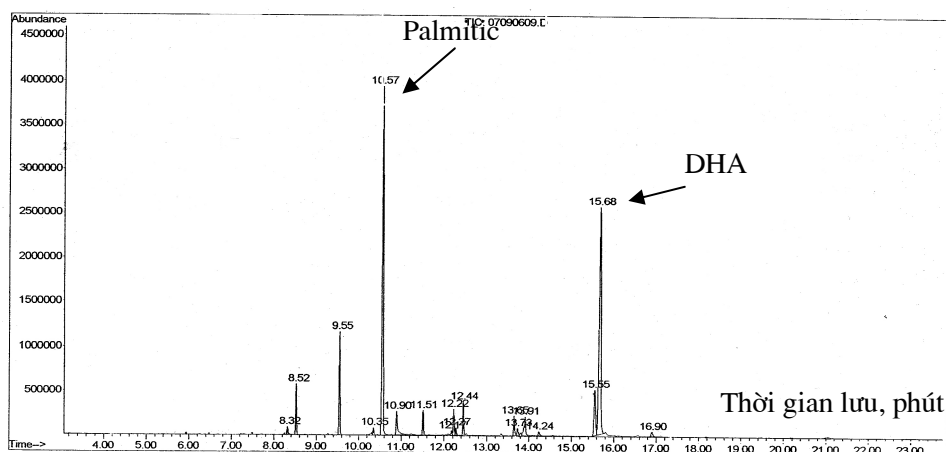
Bảng 2

Kết quả phân tích thành phần axit béo bão hoà và không bão hoà (PUFAs) của hai chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7

STT	Ký hiệu	Tên khoa học	Tên thường gọi	PQ6		PQ7	
				Thời gian lưu (Rt)	Hàm lượng (%)	Thời gian lưu (Rt)	Hàm lượng (%)
1	C14:0	Tetradecanoic axit	Myristic	8,54	2,5	8,52	3,48
2	C15:0	Pentadecanoic axit		9,57	8,41	9,55	7,39
3	C16:1(n-7)	9-Hexadecenoic axit	Palmitoleic	10,37	0,25	10,35	0,58
4	C16:0	Hexadecenoic axit	Palmitic	10,61	37,71	10,57	36,95
5	C17:0	Heptadecanoic axit	Margric	11,53	1,84	11,51	1,80
6	C18:2(n-6)	9,12-Octadecadienoic axit	Linolelaidic			12,17	0,33
7	C18:1(n-9)	Cis 9-Octadecenoic axit	Oleic	12,29	0,69	12,22	2,40
8	C18:0	Octadecenoic axit	Stearic	12,46	1,27	12,46	1,72
9	C20:4(n-6)	5,8,11,14-Eicosatetraenoic axit	Arachidonic AA	13,66	0,92		
10	C20:5(n-3)	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic axit	EPA	13,74	0,75		
11	C20:0	Eicosanoic axit	Arachidic	14,25	0,28	14,24	0,46
12	C22:6(n-3)	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic axit	DHA	15,74	43,52	15,74	38,07
13	Các loại khác				1,41		6,82
Tổng các axit béo bão hoà					52,46		51,8
Tổng các axit béo không bão hoà					46,13		41,38
Tổng số axit béo chiếm trên 90% lipid tổng số							



Hình 4. Phổ axit béo của chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ6 sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường M1



Hình 5. Phổ axit béo của chủng vi tảo *Schizochytrium* sp. PQ7 sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường M1

Kết quả thu được về thành phần axit béo của hai chủng PQ6 và PQ7 được chỉ ra ở bảng 2 đã cho thấy axit docosahexaenoic (DHA) và palmitic là những thành phần chính trong tổng số axit béo. Hàm lượng DHA của cả hai chủng PQ6 và PQ7 đạt rất cao, chiếm đến 43,52 và 38,07% trên tổng số hàm lượng axit béo, tương ứng. Hàm lượng axit palmitic đạt giá trị 37,71% và 36,95% trên tổng số axit béo đối với các chủng PQ6 và PQ7, tương ứng. Tổng số hàm lượng axit béo bão hoà và không bão hoà của hai chủng PQ6 và PQ7 chiếm 52,46 và 46,13%; 51,80 và 41,38% trên hàm lượng tổng số axit béo, tương ứng. Trong đó, ở cả hai chủng PQ6 và PQ7 đều có hàm lượng axit béo tổng số chiếm trên 90% tổng số lipit. Đặc biệt ở chủng PQ6, bên cạnh DHA, còn phát hiện thấy sự có mặt của EPA và AA, mặc dù, giá trị phần trăm của chúng trên tổng số axit béo thấp hơn rất nhiều so với hàm lượng của DHA (bảng 2). Đây chính là những đặc điểm ưu việt của chủng PQ6 về thành phần axit béo không bão hoà (PUFAs), cung cấp những dẫn liệu khoa học quan trọng cho việc lựa chọn chủng PQ6 để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về con đường sinh tổng hợp PUFAs là DHA, EPA ở đối tượng này, cũng như nuôi trồng chủng này với quy mô lớn để thu sinh khối giàu các axit béo không bão hoà đa nối đôi nêu trên làm thức ăn tươi sống và nhân tạo cho nuôi trồng thuỷ sản và làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi. Trên thế giới, các nghiên cứu về độc tính trường diễn và bán trường diễn của vi tảo giàu DHA *Schizochytrium* đã được tiến hành trên chuột và

thỏ nhằm kiểm chứng tính an toàn cũng như tác dụng của loại vi tảo biển này trước khi con người sử dụng [1, 2].

Từ kết quả chỉ ra ở hai bảng 1 và 2, chúng tôi tính toán được hàm lượng DHA đối với hai chủng PQ6 và PQ7 là 1,57 và 1,48 g/l, tương ứng. So với loại vi tảo biển mới *Labyrinthula* của Việt Nam vừa được công bố, các chủng vi tảo *Schizochytrium* được phân lập tại huyện đảo Phú Quốc có khả năng sinh tổng hợp DHA với hàm lượng cao gấp khoảng 10 lần. Như vậy, các chủng vi tảo biển dị dưỡng thuộc chi *Schizochytrium* là những đối tượng tiềm năng có khả năng sinh tổng hợp DHA rất cao so với tất cả các cơ thể vi tảo và vi sinh vật hiện nay ở Việt Nam [5].

Nếu so với chủng *Schizochytrium limacinum* SR21 của Nhật Bản [10, 11] - một chủng đã được chọn nuôi trồng để thương mại hóa sản phẩm DHA hiện nay, khi được nuôi trong các bình tam giác (tương tự như thí nghiệm của chúng tôi) lại có TLK và hàm lượng DHA cao hơn 3 và 2,7 lần (tính trên 1 lít), so với các chủng PQ6 và PQ7, tương ứng. Tuy nhiên, nếu tính hàm lượng DHA trên giá trị TLK (gr) thu được của 2 chủng PQ6 và PQ7 lại đạt 14,11% và 13,12% TLK, tương ứng, có giá trị cao hơn so với chủng *Schizochytrium limacinum* SR21 nói trên (11,67%).

Các số liệu được trình bày trên đây mới chỉ là những kết quả nghiên cứu bước đầu về hàm lượng DHA của 2 chủng vi tảo biển *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 mới được phân

lập tại huyện đảo Phú Quốc trên môi trường cơ bản M1 và là 2 chủng mới đối với Việt Nam. Ngoài ra, những kết quả sơ bộ thu được khi nuôi cấy chủng PQ6 trên hệ thống lên men 5 lít đã cho thấy hàm lượng lipit tổng số và DHA của chủng này đã tăng lên 2,3 và 3 lần, tương ứng, so với các số liệu thu được khi tiến hành thí nghiệm trên các bình tam giác 250 ml vừa được nêu ở trên.

III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được ở trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Với quy trình phân lập có cải tiến cho phù hợp với điều kiện của Việt Nam, lần đầu tiên, chúng tôi đã phân lập được ở Việt Nam loại vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium* giàu DHA từ lá cây đước trôi dạt ở vùng rừng ngập mặn ven biển của huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang.

2. Với hàm lượng DHA cao thu được từ hai chủng *Schizochytrium* sp. PQ6 và PQ7 đã phân lập là 1,57 và 1,48 g/l, tương ứng, trên môi trường M1, đã cho thấy các chủng vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium* này là đối tượng tiềm năng cần được tiếp tục nghiên cứu để nuôi trồng, thu sinh khối giàu các PUFAs như DHA làm thực phẩm chức năng cho người, làm thức ăn tươi sống và nhân tạo cho động vật nuôi và trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hammond B. G. et al.**, 2001: Regulatory Toxicology and Pharmacology, 33: 192-204, 205-217, 356-362.
2. **Hammond B. G. et al.**, 2002: Regulatory Toxicology and Pharmacology, 35: 255-265.
3. **Honda D. et al.**, 1998: Mycol. Res., 102(4): 439 - 448.
4. **Honda D. et al.**, 1999: J. Eukaryot Microbiol., 46(6): 637-647.
5. **Hoàng Lan Anh và cs.**, 2005: Tạp chí Công nghệ sinh học, 3(3): 1-7.
6. **Nguyễn Văn Mùi**, 2001: Thực hành hóa sinh học. Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội, 63-66.
7. **Porter D.**, 1990: Handbook of protoctista: 388 - 398. John and Bartlett, Boston.
8. **Raghukumar S.**, 2002: Europ. J. Protistol., 38: 127-145.
9. **Sijtsma L. and de Swaaf M. E.**, 2004: Appl. Microbiol. Biotechnol., 64: 146-153.
10. **Xiao Qiu.**, 2003: Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids., 68: 181-186.
11. **Yokochi T. et al.**, 1998: Appl. Microbiol. Biotechnol., 49: 72-79.

SUCCESSFUL ISOLATION OF *SCHIZOCHYTRIUM* - A NEW HETEROTROPHIC MARINE MICROALGA CONTAINING HIGH POLYUNSATURATED FATTY ACID - DHA FROM PHUQUOC DISTRICT COASTS

DANG DIEM HONG, HOANG LAN ANH, NGO THI HOAI THU

SUMMARY

Polyunsaturated fatty acids - PUFAs have known such as essential components of the cell membranes of various tissues and as precursors of the eicosanoids that are special importance in the brain and blood vessels, and are considered essential for pre - and post - natal brain and retinal development. In PUFAs ω -3, docosahexaenoic acid (DHA) is absolutely necessary for normal development of the fetus and baby. DHA has some positive effects on human diseases such as hypertension, arthritis, arteriosclerosis, depression and thrombosis. Therefore, DHA has contributed to many kind of worth product such as milk for pregnant woman and baby, drugs and functional food for human and animals. In this paper, for the first time, we succeeded in isolating of *Schizochytrium* sp. PQ6 and PQ7 - a new heterotrophic marine microalga, from Phu Quoc district coasts. The growth rate, dry weight, concentration of total lipid and the component of PUFAs in M1 media were analyzed in both strains. The DHA content of strains *Schizochytrium* sp. PQ6 and PQ7 are about 1.57 and 1.48 g/l, respectively. In comparison with other current marine microalgae in Vietnam, *Schizochytrium* sp. PQ6 and PQ7 have the highest concentration of PUFAs, especially content of DHA. That gives us new prospect for using these *Schizochytrium* as animal feed (e.g. for rotifer, krills, shrimp's larvae, etc.) and functional food for human.

Ngày nhận bài: 4-1-2007