

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG VI TẢO BIỂN *DUNALIELLA TERTIOLECTA* NY PHÂN LẬP TỪ NƯỚC BIỂN CỦA ĐẢO NAM YẾT THUỘC QUẦN ĐẢO TRƯỜNG SA, VIỆT NAM

NGUYỄN CẨM HÀ ⁽¹⁾, LÊ THỊ THƠM ⁽¹⁾, LƯU THỊ TÂM ⁽¹⁾, NGÔ THỊ HOÀI THU ⁽¹⁾, HOÀNG
THỊ MINH HIỀN ⁽¹⁾, NGUYỄN TRỌNG DÂN ⁽³⁾, VŨ THỊ LOAN ⁽³⁾, ĐẶNG DIỄM HỒNG ^(1,2)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dunaliella là một chi vi tảo lục đơn bào thuộc ngành Chlorophyta, bộ Volvocales, họ Polyblepharidaceae, hình thái tế bào khác biệt so với các loài vi tảo lục khác do có glycoprotein trên màng tế bào nhưng thiếu thành tế bào. *Dunaliella* có thể tích lũy nhiều hợp chất có giá trị như protein, axit béo và các sắc tố như xanthophylls (zeaxanthin, lutein, α - và β -cryptoxanthin, violaxanthin và echinenon) và caroten (α -caroten, all-trans β -caroten, 9-cis β - caroten, 15-cis β -caroten và lycopene), đã và đang được ứng dụng trong ngành y dược, công nghiệp thực phẩm, làm chất phụ gia, chất bổ sung, thuốc nhuộm, hoặc làm thức ăn gia súc [1]. Trong y học, hiệu quả của *Dunaliella* giảm nguy cơ bệnh tim mạch, tiểu đường, viêm gan B, hen suyễn và ung thư, cũng như tác dụng điều hòa miễn dịch và kháng viêm đã được công bố [1]. Loài vi tảo biển *D. tertiolecta* có tốc độ sinh trưởng và hiệu suất sản xuất dầu cao (lên đến 37% sinh khối khô - SKK) và do thiếu thành tế bào nên rất thuận lợi cho việc khai thác các sản phẩm từ tảo và áp dụng thao tác kỹ thuật di truyền [2]. *D. tertiolecta* có thể sinh trưởng ở cường độ ánh sáng cao (từ 100 đến 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) và tích lũy một lượng lớn beta-caroten nhưng lại không ảnh hưởng đến thành phần axit béo [2, 3] và gần đây nó được xem là đối tượng tiềm năng cho sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ mới [4]. Tuy vậy, năng suất sinh khối tảo cũng như thành phần sinh hoá và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học quý của *D. tertiolecta* có thể bị thay đổi dưới điều kiện môi trường khác nhau như môi trường dinh dưỡng, nhiệt độ, ánh sáng, độ mặn... [5]. Do vậy, việc tìm ra điều kiện nuôi thích hợp để tảo đạt năng suất cao, chất lượng tốt trong thời gian ngắn nhất nhằm chủ động cung cấp đủ nguyên liệu cho các ứng dụng nêu trên là rất cần thiết. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các đặc điểm sinh học và lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng *Dunaliella* sp. NY được phân lập từ nước biển của đảo Nam Yết, thuộc quần đảo Trường Sa, tỉnh Khánh Hoà, Việt Nam (tháng 5-6 năm 2021), cho nuôi sinh khối tảo đạt năng suất cao, làm nguyên liệu cho khai thác các hợp chất sinh học quý phục vụ trong ngành y dược.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Khu vực nghiên cứu và địa điểm thu mẫu

Các mẫu nước biển được thu vào tháng 5-6 năm 2021 bằng lưới vớt thực vật phù du có kích thước lỗ 25 μm tại vùng biển đảo Nam Yết (tọa độ 10°10'45"N-114°22'00"E), thuộc quần đảo Trường Sa, Việt Nam. Các mẫu nước biển được đựng trong chai nhựa (có đá khô) giữ trong tối trước khi đưa về Phòng thí nghiệm để phân lập mẫu *Dunaliella* sp..

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập *Dunaliella* sp.: Sử dụng phương pháp hút 1 tế bào bằng micropipet và cấy trải liên tiếp trên môi trường Walne thạch đĩa (agar 1,5%) có bổ sung hỗn hợp kháng sinh (ampicillin: 250 mg/L; gentamicin: 50 mg/L; streptomycin: 50 mg/L) [6]. Chủng *Dunaliella* sp. phân lập thành công ở dòng thuần, sạch được lưu giữ ở ống nghiệm và bình tam giác 250 mL dưới điều kiện: môi trường Walne lỏng, 28°C-32°C, cường độ chiếu sáng 30-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ s quang chu kỳ sáng: tối là 12:12 h và nuôi tĩnh (lắc bằng tay lúc 8 và 14 giờ hàng ngày).

2.2.2. Xác định sinh trưởng của tảo: Sinh trưởng của chủng *Dunaliella* sp. NY được đánh giá thông qua mật độ tế bào (MDTB) được đếm bằng buồng đếm hồng cầu Burkner - Turk (Đức) [6].

2.2.3. Phương pháp chụp ảnh hình thái: Hình thái tế bào *Dunaliella* sp. NY được quan sát, chụp ảnh hình thái dưới kính hiển vi quang học Olympus CX21 (Nhật Bản) với độ phóng đại 400 và 1.200 lần.

2.2.4. Định danh bằng sinh học phân tử: Ngoài phân loại dựa trên đặc điểm hình thái, chủng *Dunaliella* sp. NY được định tên khoa học bằng phương pháp đọc và so sánh trình tự nucleotid của vùng gen ITS1-5,8S - ITS2 rRNA. Cặp mồi đặc hiệu ITS1F: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3' và ITS4R: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' [7] được sử dụng cho nhân vùng gen ITS1-5,8S - ITS2 rRNA của mẫu *Dunaliella* sp. NY với kích thước dự kiến là 650 bp Trình tự vùng gen ITS1-5,8S - ITS2 rRNA của loài *Chlamydomonas reinhardtii* chủng CC-620 (JX839533.1) được sử dụng làm nhóm ngoại trong xây dựng cây phát sinh chủng loại [8, 9]. Các chương trình Standard Nucleotide BLAST, blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), nucleotide collection (nr/nt) database và ClustalX (1.81), MEGA X software được sử dụng cho phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại [10].

2.2.5. Phân tích thành phần lipid và axit béo, protein, carbohydrate: Hàm lượng lipid được xác định theo phương pháp Bligh and Dyer (1959) [11], có cải tiến phù hợp với điều kiện của Việt Nam [6]. Thành phần và hàm lượng các axit béo của chủng NY được xác định bằng phương pháp LFOD-TST-8444 (GC-FID) do SGS Vietnam Ltd. Company thực hiện. Hàm lượng protein xác định theo tài liệu [12], carbohydrate theo [13].

2.2.6. Lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng *Dunaliella tertiolecta* NY: Ba môi trường dinh dưỡng (Walne, F/2 và Erdcheiber - Erd) có thành phần như công bố [6]. MĐTB ban đầu ($0,5 \times 10^6$; 1×10^6 ; $1,5 \times 10^6$; 2×10^6 và 3×10^6 tế bào (TB)/mL), nhiệt độ (15, 25, 30, 37 và 45°C), cường độ ánh sáng (60; 100; 140; 200, 300 và 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0 và 11,0), nồng độ muối (10, 20, 30, 40, 50 và 60‰) được sử dụng cho thí nghiệm lựa chọn điều kiện nuôi của chủng NY ở bình tam giác 250 mL (chứa 150 mL dịch tảo/bình). Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần, theo dõi trong 15 ngày. Cứ 3-5 ngày/lần lấy 20 mL mẫu để xác định sinh trưởng của chủng NY.

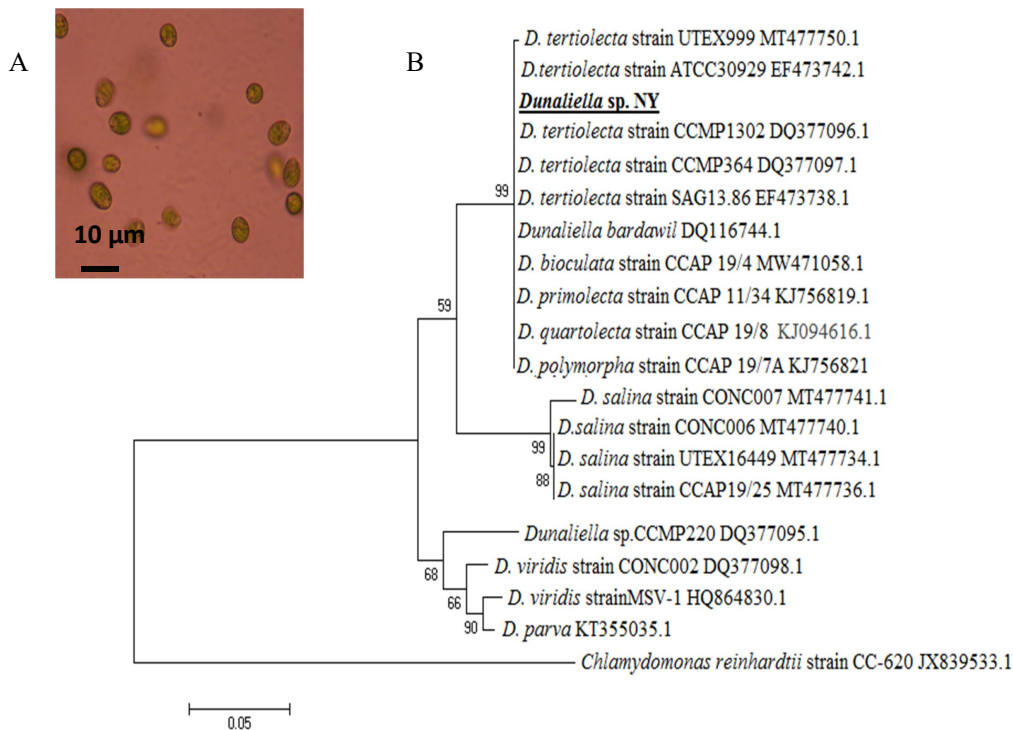
2.2.7. Nuôi sinh khối *Dunaliella tertiolecta* NY ở các quy mô khác nhau: Sử dụng điều kiện nuôi thích hợp lựa chọn được từ nuôi trong bình tam giác 250 mL cho nuôi cấy sinh khối chủng NY trong hệ thống nuôi hở (HTNH, ở bình nhựa 10 L), hệ thống nuôi kín (HTNK) 20, 50 và 100 L (với thể tích nuôi thực tế lần lượt là 26, 70 và 120 L) trong 15 ngày, dịch tảo được sục khí 24/24 h (với tốc độ sục khí là 0,25 L/phút). Mẫu được lấy 3-5 ngày/lần để xác định các thông số như MĐTB hoặc phân tích hàm lượng lipid, protein, carbohydrat.

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

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Định tên khoa học chủng vi tảo biển *Dunaliella* sp. NY

Tế bào của chủng NY có dạng hình giọt lệ, đơn bào, màu xanh, kích thước tế bào $8,4 \pm 1,0 \mu\text{m}$ chiều dài và $4,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ chiều rộng, có khả năng chuyển động nhờ hai roi, có 2 roi ở đỉnh tế bào với chiều dài gần gấp đôi chiều dài thân (hình 1A). Dựa trên khoá phân loại của Teodoresco (1905) [14] về chi *Dunaliella* và các đặc điểm hình thái tế bào, sơ bộ chủng NY được xác định thuộc về loài *Dunaliella tertiolecta* và chủng được ký hiệu là *D. tertiolecta* NY.



Hình 1. Hình thái tế bào *D. tertiolecta* NY dưới kính hiển vi quang học. Thanh thước có kích thước 10 μm (A). Cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Dunaliella* dựa trên trình tự vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 rRNA đã được công bố trên GenBank (B)

Trong nghiên cứu này, trình tự vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Chlamydomonas reinhardtii* chủng CC-620 (JX839533.1) được sử dụng làm nhóm ngoại đối với chi *Dunaliella* [15]. 21 trình tự vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của các loài khác nhau thuộc chi *Dunaliella* đã được so sánh bằng phần mềm BLAST và xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 1B). Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 rRNA của chủng *Dunaliella* sp. NY được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu ITS1F và ITS4R thu được có kích thước 650 bp, có độ tương đồng đạt 99,2% với loài *D. tertiolecta* ATCC30929 (có mã số đăng ký EF473742.1 trên Genbank). Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái, tỷ lệ phân trăm tương đồng và phân bố trên cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Dunaliella*, có thể kết luận chủng NY thuộc về loài *Dunaliella tertiolecta*. Trình tự vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 rRNA của *D. tertiolecta* NY đã được đăng ký trên Genebank với mã số được cấp là OM101011.

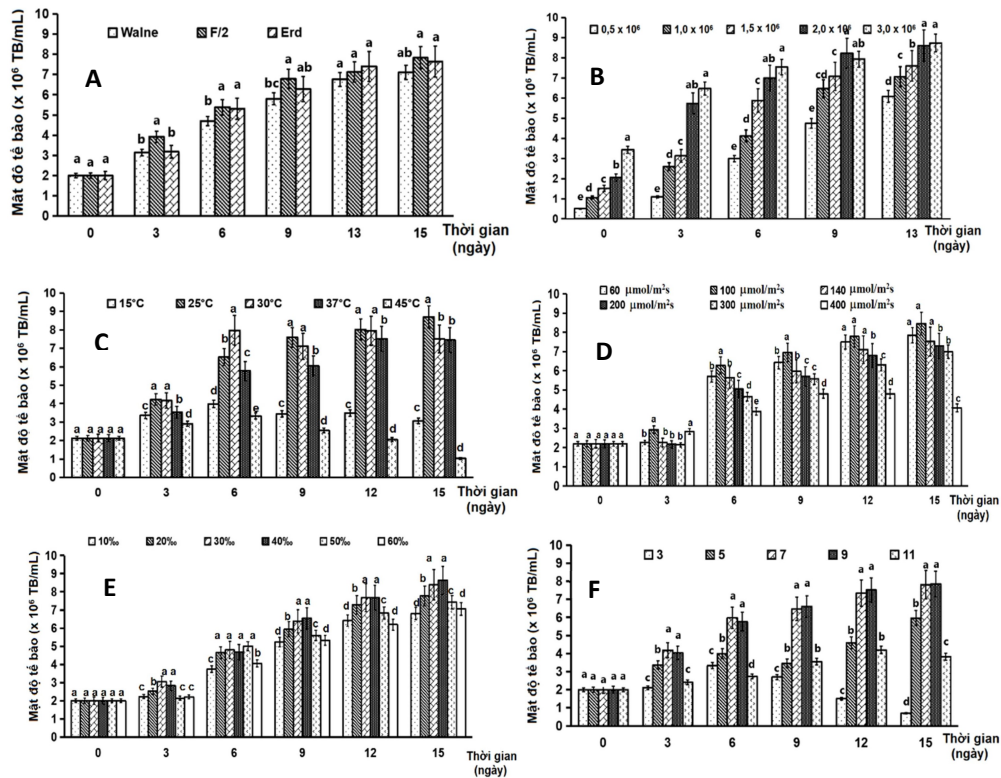
3.2. Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng *D. tertiolecta* NY trong bình tam giác 250 mL

Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng: Chủng *D. tertiolecta* NY sinh trưởng tốt trong cả 3 môi trường nuôi Walne, F/2 và Erdcheiber - Erd đạt MĐTB tương ứng là $7,82 \pm 1,65$; $7,64 \pm 1,06$ và $7,10 \pm 1,15 \times 10^6$ TB/mL, không có sự khác biệt đáng kể về hình thái và MĐTB giữa các môi trường nuôi cấy khác nhau (hình 2A). Môi trường Erd giàu dinh dưỡng nhất so với 2 môi trường nuôi còn lại nhưng việc pha môi trường Erd rất khó thực hiện và thành phần dinh dưỡng thường không ổn định (do thành phần dịch chiết đất không xác định được) khi sử dụng cho nuôi cấy trên quy mô lớn. Mặc dù sinh trưởng của chủng NY trong môi trường Walne có thấp hơn so với hai môi trường còn lại nhưng môi trường này có giá thành thấp, dễ pha môi trường cũng như dễ bổ sung vào hệ thống nuôi trên quy mô lớn nên môi trường này đã được chọn cho các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng MĐTB gieo ban đầu: Kết quả trình bày ở hình 2B cho thấy sinh trưởng của chủng NY phụ thuộc lớn vào MĐTB gieo ban đầu. MĐTB gieo ban đầu là 3×10^6 TB/mL cho sinh trưởng của tảo đạt cao nhất là $8,60 \times 10^6$ TB/mL sau 13 ngày nuôi so với các công thức còn lại, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$). Tuy nhiên, không có sự khác biệt về ảnh hưởng của MĐTB ban đầu 2×10^6 và 3×10^6 TB/mL lên sinh trưởng của chủng NY sau 13 ngày nuôi ($p > 0,05$). Do vậy, để tiết kiệm giống tảo gieo ban đầu chúng tôi lựa chọn MĐTB gieo ban đầu 2×10^6 TB/mL được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: Chủng NY sinh trưởng tốt nhất ở 25°C, tiếp theo ở 30°C và 37°C, thấp nhất ở 15 và 45°C sau 15 ngày nuôi cấy (hình 2C). Ở nhiệt độ 25°C, MĐTB đạt cao nhất là $8,42 \times 10^6$ TB/mL, cao hơn so với ở các nhiệt độ khác, sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$). Tuy nhiên, sự sai khác không có ý nghĩa thống kê sinh học giữa nhiệt độ 30°C và 25°C ($p > 0,05$) tại thời điểm 12 ngày. Như vậy, để có thể phù hợp với điều kiện khí hậu của Việt Nam, giảm chi phí sản xuất sinh khối, nhiệt độ 30°C được lựa chọn cho việc nuôi thu sinh khối chủng NY ở quy mô lớn.

Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng: Sau 15 ngày nuôi cấy, sinh trưởng của chủng NY đạt MĐTB cao nhất $8,46 \times 10^6$ TB/mL ở cường độ ánh sáng $100 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ (hình 2D). Sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học về sinh trưởng của chủng NY ở $100 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ so với 200, 300 và $400 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ sau 15 ngày nuôi ($p < 0,05$). Tuy nhiên, không có sự sai khác giữa cường độ chiếu sáng 60, 100 và $140 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ ($p > 0,05$). Như vậy, cường độ ánh sáng thích hợp cho sinh trưởng của chủng NY ở điều kiện phòng thí nghiệm là $100 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Tuy nhiên, để tiết kiệm năng lượng, cường độ chiếu sáng $60 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Sinh trưởng của vi tảo biển *D. tertiolecta* NY dưới các điều kiện nuôi khác nhau: A: Môi trường dinh dưỡng; B: MĐTB ban đầu; C: Nhiệt độ; D: Cường độ chiếu sáng; E: Nồng độ muối; F: pH môi trường. Các chữ số a, b, c, d, e tại cùng một thời điểm chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$)

Ảnh hưởng của nồng độ muối: Ảnh hưởng của môi trường có nồng độ muối khác nhau (từ 10 đến 60‰) lên sinh trưởng của chủng NY được trình bày ở hình 2E. Chủng NY đã thể hiện khả năng thích nghi với dải nồng độ muối rất rộng. Sau 15 ngày nuôi, chủng NY sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ muối 40‰, tiếp theo là 30‰; 20‰, 50‰, 60‰ và thấp nhất ở 10‰ với MĐTB tương ứng là $8,63 \times 10^6$; $8,39 \times 10^6$; $7,77 \times 10^6$; $7,43 \times 10^6$; $7,06 \times 10^6$ và $6,80 \times 10^6$ tế bào/mL. Sự khác nhau về sinh trưởng của chủng NY ở nồng độ muối 30‰ và 40‰ là không có ý nghĩa thống

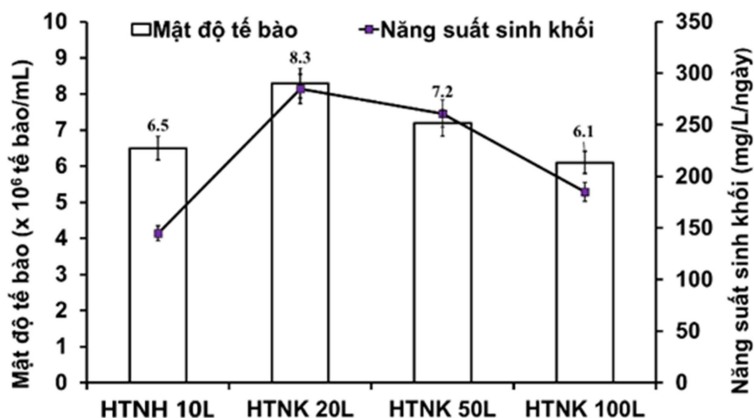
kê sinh học ($p > 0,05$). Tuy nhiên, ở nồng độ muối $<20\%$ và $>50\%$, sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$) so với các nồng độ muối còn lại. Kết quả này hoàn toàn tương đồng với nồng độ muối tại vùng biển đảo Namyt - nơi thu mẫu tảo, có nồng độ muối dao động từ 35 - 40‰. Như vậy, nồng độ muối tối ưu cho sinh trưởng của chủng NY là 30 - 40‰.

Ảnh hưởng của pH: Không có sự khác biệt về ảnh hưởng của pH từ 7 đến 9 lên sinh trưởng của chủng NY ($p > 0,05$) và khoảng pH tối ưu cho sinh trưởng là 7 - 9 (hình 2F). Tuy nhiên, pH >10 và pH <5 đã ảnh hưởng lên sinh trưởng của chủng này. Trong môi trường có độ axit cao (pH 3) hoặc độ kiềm cao (pH 11), chủng NY không thích nghi được nên sinh trưởng của chúng đã bị ức chế và giảm sinh trưởng sau 15 ngày nuôi. pH thích hợp cho sinh trưởng của chủng NY là pH 7 đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo (phù hợp với pH nước biển nơi thu mẫu) và môi trường pha. Do đó, không phải điều chỉnh pH khi nhân nuôi sinh khối ở quy mô lớn.

Như vậy, các điều kiện thích hợp cho nuôi chủng NY (môi trường Walne, mật độ tế bào gieo ban đầu là 2×10^6 tế bào/mL, nhiệt độ 30°C , cường độ ánh sáng 60 - 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$, nồng độ muối là 30-40‰, pH môi trường là 7) đã không có sự khác biệt so với các thông số lý hoá tại vùng biển đảo Namyt, nơi phân lập chủng này cho thấy các đặc điểm sinh học của chủng tảo NY gốc vẫn được duy trì ổn định sau một thời gian phân lập, lưu giữ và bảo quản giống. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với công bố trên thế giới về chủng tảo *Dunaliella* của Hamed và cộng sự [16] có điều kiện nuôi tối ưu cho sinh trưởng với nhiệt độ $21-40^\circ\text{C}$, pH 7-9, nồng độ muối 25-35‰, cường độ ánh sáng là 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

3.3. Nuôi trồng chủng *D. tertiolecta* NY ở các quy mô khác nhau

Trên cơ sở lựa chọn được điều kiện nuôi thích hợp cho sự phát triển của chủng NY ở bình tam giác 250 mL nêu trên, việc nuôi chủng này ở quy mô lớn hơn, từ HTNH 10 L đến các HTNK dạng ống có dung tích 20, 50 L và 100 L cũng đã được tiến hành (hình 3). Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy MĐTB của chủng NY phụ thuộc vào hệ thống nuôi và giá trị MĐTB đạt được trong HTNK cao hơn HTNH ở cùng thời điểm nuôi cấy. MĐTB đạt cực đại là $8,30 \times 10^6$ TB/mL sau 15 ngày nuôi cấy trong HTNK 20 L. Không có sự khác biệt về thời gian tế bào đạt cực đại giữa các cấp độ nuôi khác nhau. Năng suất sinh khối tảo tươi cũng đạt cao nhất ở HTNK 20 L (285 mg/L/ngày). Sinh trưởng tảo đạt được trong nghiên cứu này cao hơn so với công bố của Chagas và cộng sự [17] đối với chủng *D. tertiolecta* (BE 003) được nuôi trong HTNK dạng tấm phẳng có năng suất sinh khối tảo đạt tối đa là 180 ± 10 mg/L/ngày. Điều này có thể do sự khác biệt về đặc điểm di truyền của chủng tảo được lựa chọn và điều kiện nuôi cấy khác nhau. Do vậy, kết quả trong nghiên cứu này của chúng tôi đã cung cấp các cơ sở khoa học cho việc cần phải tiếp tục hoàn thiện nhân nuôi sinh khối chủng *D. tertiolecta* NY trên quy mô lớn để đạt năng suất cao nhằm cung cấp sinh khối cho tách chiết các chất có hoạt tính sinh học ở Việt Nam trong thời gian tới.



Hình 3. Sinh trưởng của chủng *D. tertiolecta* NY ở các cấp độ nuôi khác nhau

3.4. Thành phần dinh dưỡng và axit béo trong sinh khối của chủng NY được ở hệ thống nuôi kín 100 L

Mặc dù ở HTNK 20 L có năng suất sinh khối tảo cao hơn so với HTNK 100 L nhưng với mục tiêu cung cấp đủ sinh khối cho tách chiết các hợp chất thứ cấp thì cần nuôi tảo trong các hệ thống có dung tích lớn. Chính vì vậy, chúng lựa chọn HTNK 100 L để nhân nuôi lấy sinh khối cho phân tích thành phần dinh dưỡng, axit béo trong sinh khối thu được.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy trong sinh khối chủng NY có hàm lượng lipid, protein và carbohydrate cao, chứa chủ yếu các axit béo không bão hòa đa nổi bật như axit gamma - linolenic (C18: 3 ω -6; $5,07 \pm 0,59\%$ so với axit béo tổng số - TFA), axit alpha - linolenic (ALA, C18: 3 ω -3, $61,79 \pm 1,98\%$ so với TFA) và axit stearidonic (SDA; C18 : 4 ω -3, $1,59 \pm 0,65\%$ so với TFA). Các axit béo nêu trên có hoạt tính sinh học trong phòng và điều trị một số bệnh, làm nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe [1, 2, 6]. Tuy nhiên, thành phần hoặc cấu trúc axit béo cũng có thể thay đổi tùy thuộc vào điều kiện vật lý (ánh sáng, nhiệt độ...) và hoá học (các hợp chất trong môi trường nuôi). Kutluk [4] đã chỉ ra rằng, trong thành phần axit béo của *D. tertiolecta* (% so với TFA): C17:0 (8,6), C18:1 (17,8), C18:2 (25,3), C18:3 (9,4), C20:0 (30,2), C20: 1 (8,7) chiếm ưu thế và các axit béo này đã được chứng minh tiềm năng ứng dụng tốt trong cuộc sống [18]. Thành phần axit béo của chủng NY trong nghiên cứu này cũng có thành phần tương tự với công bố [4] nhưng hàm lượng C18:3 cao gấp 6,57 lần. Hơn nữa, trong thành phần axit béo của chủng NY còn xuất hiện EPA đạt $2,25 \pm 0,09\%$ so với TFA. Điều này cho thấy sinh khối của chủng NY là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học cao.

Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng và hàm lượng các axit béo của chủng *D. tertiolecta* NY nuôi trong hệ thống nuôi kín 100 L

Acid béo	Tên khoa học	Tên thường gọi	Hàm lượng axit béo (% so với TFA)
C16:0	Axit hexadecanoic	Palmitic	12,78 ± 0,16
C16:1 (ω-7)	Axit 9-hexadecanoic	Palmitoleic	0,23 ± 0,02
C16:1 (ω-9)	Axit 11- hexadecanoic	Palmitoleic	0,35 ± 0,01
C17:0	Axit heptadecanoic	Margric	2,71 ± 0,02
C17:1 (ω-7)	Axit 10- heptadecenoic	-	3,23 ± 0,12
C18:1 (ω-9)	Axit 9-octadecenoic	Oleic	6,59 ± 0,04
C18:2ω-6-c	cis-9, cis-12-octadecadienoic acid	Linoleic	2,68 ± 0,09
C18:3 (ω-6)	γ-Linolenic acid	-	5,07 ± 0,59
C18:3 (ω-3)	α-Linolenic acid	ALA	61,79 ± 1,98
C18:4 (ω-3)	Axit 9, 12, 15, 17 - octadecatrienoic	SDA	1,59 ± 0,05
C20:0	Axit eicosanoic	-	0,41 ± 0,04
C20:4 (ω-6)	Axit 5, 8, 11, 4 - eicosatetraenoic	Arachidonic	0,28 ± 0,17
C20:5 (ω-3)	Axit 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA	2,25 ± 0,09
Acid béo không bão hoà			84,06 ± 3,16
Acid béo bão hoà			15,90 ± 0,22
Lipit (% SKK)			7,12 ± 1,01
Protein (% SKK)			50,05 ± 1,32
Cacbohydrat (% SKK)			3,23 ± 1,15

Phân tích thành phần dinh dưỡng của chủng NY (bảng 1) cho thấy chủng này có hàm lượng lipid, protein và cacbohydrat đạt 7,12±1,01; 50,05±1,32 và 3,23±1,15 % SKK, tương ứng. Kết quả này tương đương với công bố của Sui và cộng sự [19], Ahmed và cộng sự [20] về hàm lượng protein của *Dunaliella* đạt 57 - 80% SKK, hàm lượng cacbohydrat và lipid cũng thay đổi theo điều kiện nuôi cấy.

4. KẾT LUẬN

Đã định danh tên khoa học được chủng *Dunaliella* sp. NY phân lập được tại vùng biển của đảo Namyt thuộc quần đảo Trường Sa, Việt Nam (thu mẫu tháng 5-6/2021) thuộc về loài *Dunaliella tertiolecta* NY dựa trên các đặc điểm hình thái của tế bào và so sánh trình tự vùng gen rRNA ITS1-5.8S-ITS2. Trình tự vùng gen ITS1-5.8S-ITS2 rRNA của *D. tertiolecta* NY đã được đăng ký trên Genbank với mã số được cấp là OM101011. Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy chủng NY là môi trường Walne, mật độ tế bào gieo ban đầu là 2×10^6 tế bào/mL, nhiệt độ 30°C, cường độ ánh sáng 60 -100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$, nồng độ muối là 30-40‰, pH môi trường là 7. Chủng này có khả năng sinh trưởng tốt ở quy mô phòng thí nghiệm với mật độ tế bào đạt cao nhất là $8,63 \times 10^6$ tế bào/mL sau 15 ngày nuôi cấy và quy mô pilot đạt năng suất sinh khối cao là 285 mg/L/ngày khi nuôi trồng trong hệ thống nuôi kín 20 L. Sinh khối tảo này giàu các axit béo không bão hòa đa nối đôi như C18:3 ω -6; C18:3 ω -3 và C18:4 ω -3, có tiềm năng cho khai thác các chất có hoạt tính sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Da Silva M. R. O. B., Moura Y. A. S., Converti A., Porto A. L. F., Marques A. D. A. V. M., Bzerra R. P., *Assessment of the potential of Dunaliella microalgae for different biotechnological applications, A systematic review*, 2021, **58**:102396.
2. Safie S. R. B., Ng Y. K., Yao L., Lee Y. K., *Growth bottlenecks of microalga Dunaliella tertiolecta in response to an up-shift in light intensity*, European Journal of Phycology, 2018, **53**(4):509-519.
3. Tang H., Abunasser N., Garcia M., Chen M., Simon N. G. K. Y., Salley S. O., *Potential of microalgae oil from Dunaliella tertiolecta as a feedstock for biodiesel*, Applied Energy, 2011, **88**(10):3324-3330.
4. Kutluk T., *Lipid productivity of marine microalgae Dunaliella tertiolecta in Marmara seawater and Johnson's media with different salinities and evaluation as a raw material source for biofuel production*, Journal of advanced research in natural and applied sciences, 2021, **7**(2):266-273.
5. Chen H., Qiu T., Rong J., He C., Wang Q., *Microalgal biofuel revisited: an informatics-based analysis of developments to date and future prospects*, Applied Energy, 2015, **155**:585-598.
6. Đặng Diễm Hồng, *Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam*, Bộ sách chuyên khảo Tài nguyên thiên nhiên và môi trường Việt Nam, NXB. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 2019, tr. 155, 162, 165, 234.
7. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, Academic Press, Inc., New York, N.Y, 1990, p. 315-322.

8. Liu Z., Zhang F., Chen F., *High throughput screening of CO₂-tolerating microalgae using GasPak bags*, Aquatic Biosystems, 2013, **9**(1):23.
9. Haddad R., Alemzadeh E., Ahmadi A. R., Hosseini R., Moezzi M., *Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf*, Iran J. Microbiol., 2014, **6**(6):437-442.
10. Hoàng Thị Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu, Đặng Diễm Hồng, *Định tên một số chủng vi tảo biển phân lập từ vùng biển Hải Phòng và Nha Trang dựa trên hình thái tế bào và phân tích 18S rRNA*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2010, **8**(3):387-396.
11. Bligh E. G., Dyer W. J., *A rapid method for total lipid extraction and purification*, Can. J. Biochem. Physiol., 1959, **37**(8):911-917.
12. Bradford M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem., 1976, **72**(1-2):248-254.
13. Sun L., Ren L., Zhuang X., Ji X., Yan J., Huang H., *Differential effects of nutrient limitations on biochemical constituents and docosahexaenoic acid production of Schizochytrium sp.*, Bioresour. Technol., 2014, **159**:199-206.
14. Teodoresco E. C., *Organisation et développement du Dunaliella, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée*, Beihefte zum Botanischen Centralblatt, 1905, **18**(1):215-232.
15. Hejazi M. A., Barzegari A., Hosseinzadeh N. G., Hejazi M. S., *Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga Dunaliella*, Saline Systems, 2010, **6**(1):1-11.
16. Hamed I., Ak B., Isik O., Uslu L., *The effects of salinity and temperature on the growth of Dunaliella sp. isolated from the salt lake (Tuz Golu), Turkey*, Turkish journal of fisheries and aquatic sciences., 2017, **17**(7):1367-1372.
17. Chagas A. L., Rios A. O., Jarenkow A., Marcílio N. R., Ayub M. A., Rech R., *Production of carotenoids and lipids by Dunaliella tertiolecta using CO₂ from beer fermentation*, Process Biochemistry, 2015, **50**(6):981-988.
18. Hopkins T. C., Graham E. J. S., Schuler A. J., *Biomass and lipid productivity of Dunaliella tertiolecta in a produced water-based medium over a range of salinities*, Journal of applied phycology, 2019, **31**(6):3349-3358.
19. Sui Y., Vlaeminck S. E., *Effects of Salinity, pH and Growth Phase on the Protein Productivity by Dunaliella salina*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology., 2019, **94**(4):1032-1040.
20. Ahmed R. A., He M., Aftab R. A., Zheng S., Nagi M., Bakri R., Wang C., *Bioenergy application of Dunaliella salina SA 134 grown at various salinity levels for lipid production*, Scientific Reports, 2017, **7**(1):1-10.

SUMMARY

STUDY ON THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MARINE MICROALGA OF *DUNALIELLA TERTIOLECTA* NY ISOLATED FROM THE SEA WATER OF NAMYIT ISLAND BELONGING TO SPRATLY ISLANDS, VIETNAM

Marine microalgae are an important source of raw materials for the extraction of highly bioactive substances for humans and domestic animals. In this study, the biological characteristics and the ability to grow biomass of green marine microalga of *Dunaliella tertiolecta* NY isolated from seawater of Namyit Island belonging to Spratly Islands, Vietnam (in May-June, 2021) was presented. Scientific name of the strain *Dunaliella tertiolecta* NY based on morphological characteristics and analysis of the sequence of rDNA ITS1-5.8S-ITS2 region was identified (with accession number of this gene region of this strain was supplied on the GenBank is OM101011). At the best conditions for the growth (i.e. Walne medium, initial cell density of 2.0×10^6 cells/mL, growth temperature of 30°C , light intensity of 60 - 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, pH 7, salinity of 30-40‰), highest NY strain cell density of 8.63×10^6 cells/mL was obtained after 15 days of culture. The microalga *D. tertiolecta* NY was also successfully cultured on a pilot scale in the plastic bottles 10 L and closed photobioreactors 20 - 100 L resulting in a high biomass productivity of 285 mg/L/day and a biomass rich in polyunsaturated fatty acids such as gamma - linolenic acid (C18:3 ω -6; 5.07 ± 0.59 % of total fatty acid - TFA), alpha - linolenic acid (ALA, C18:3 ω -3, 61.79 ± 1.98 % of TFA) and stearidonic acid (SDA; C18: 4 ω -3, 1.59 ± 0.65 % of TFA) qualified for the extraction of value bioactive compounds.

Keywords: *Dunaliella tertiolecta* NY, polyunsaturated fatty acids, Namyit Island, biological activity, Spratly Islands, biomass, microalgae, axit béo không bão hòa đa nối đôi, đảo Nam Yết, hoạt tính sinh học, Quần đảo Trường Sa, sinh khối, vi tảo.

Nhận bài ngày 11 tháng 8 năm 2022

Phản biện xong ngày 29 tháng 8 năm 2022

Hoàn thiện ngày 06 tháng 9 năm 2022

⁽¹⁾ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁽²⁾ Học viện Khoa học và công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁽³⁾ Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Liên hệ: **GS. TS. Đặng Diễm Hồng**

Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại: 091 534 3660. Email: ddhong60vn@yahoo.com