

Khảo sát khả năng tạo Beta-carotene của chủng vi tảo *Dunaliella* phân lập ở Việt Nam

- Huỳnh Hiệp Hùng
- Lê Thị Thanh Loan
- Nguyễn Thị Mỹ Lan
- Lê Thị Mỹ Phước
- Phạm Thành Hồ

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 30 tháng 9 năm 2013)

TÓM TẮT:

Beta-carotene là một sắc tố tự nhiên có khả năng chống oxy hoá rất cao. Nó còn là tiền chất của Vitamin A, thúc đẩy và cải thiện hệ miễn dịch. Hiện nay, chủng tảo *Dunaliella* được xem là nguồn sản xuất β -carotene tự nhiên tốt nhất do có chứa tỉ lệ cao đồng phân 9-cis- β -carotene, được chứng minh là có hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn nhiều đồng phân all-trans- β -carotene. Trong khi đó, β -carotene tổng hợp chỉ chứa đồng phân all-trans- β -carotene. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên chủng tảo *Dunaliella* sp. phân lập ở ruộng muối Việt Nam nhằm tìm kiếm chủng tảo có khả năng nuôi cấy trên quy mô công nghiệp

ở Việt Nam và tận dụng bờ biển tự nhiên trải dài của nước ta. Mục tiêu của nghiên cứu là tiến hành khảo sát các điều kiện nuôi cấy (điều kiện stress) của chủng tảo *Dunaliella* sp. phân lập được, nhằm tăng sinh khối và khả năng tổng hợp β -carotene. Kết quả thu được cho thấy mật độ tế bào tốt nhất là $2,7 \times 10^6$ tế bào/ml và năng suất thu sinh khối khô đạt được khoảng 0,321g/l với nồng độ muối 2M. Ngoài ra, khi nuôi tảo ở các điều kiện nồng độ muối cao hay thiếu hụt nguồn nitrogen có thể kích thích tăng sự tích lũy β -carotene trong tế bào và đạt hàm lượng β -carotene khoảng 9% sinh khối khô ở NaCl 3M.

Từ khóa: *Beta-carotene*, *Dunaliella*, nồng độ muối, thiếu hụt nitrogen, sinh khối khô.

MỞ ĐẦU

Beta-carotene là đồng phân quan trọng của carotenoid, thuộc nhóm các sắc tố hữu cơ tự nhiên. Nó có thể chuyển hoá thành vitamin A trong cơ thể và được xem là tiền thân tốt nhất của vitamin A trong các loại carotenoid. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã phát hiện ra nhiều lợi ích khác từ β -carotene, ví dụ như đặc tính chống oxy

hóa, kích thích tế bào miễn dịch, phối hợp với các chất chống oxi hoá khác như vitamin C và E để giảm các nguy cơ nhiễm trùng, làm chậm quá trình lão hoá giảm tác hại của ánh sáng mặt trời, cũng như giảm nguy cơ một số bệnh về tim mạch và ngừa một số bệnh ung thư, [4, 5, 8].

Beta-carotene có nhiều dạng đồng phân nhưng các loại β -carotene tổng hợp chỉ chứa các đồng phân all-*trans*- β -carotene. Trong khi đó đồng phân 9-*cis* lại là thành phần chống oxy hoá chủ yếu của β -carotene và nó chỉ có trong β -carotene tự nhiên, thường thấy trong các loại trái cây và rau quả có màu vàng và xanh đậm như cà rốt, gấc, bí ngô, khoai lang, rau ngót... chiếm khoảng 0,001 - 0,01% sinh khối khô (SKK); trong các cơ quan động vật như gan cá, trứng,... Một số loài vi sinh vật như nấm sợi *Blakeslea*, nấm men *Rhodotorula* cũng chứa hàm lượng đáng kể β -carotene 0,05-0,2% SKK. Ở vi tảo, β -carotene thường chiếm khoảng 0,1% SKK, tuy nhiên, ở một số loài, nó có thể chiếm tới 5% SKK (*Amphidinium carterae*), hoặc thậm chí tới 10% SKK (*Dunaliella salina*) [2, 7, 8].

Milko (1963) đã đề cập đến khả năng tạo ra lượng lớn β -carotene ở *Dunaliella* sp. Sau đó, nhiều nhà khoa học như Ben-Amotz và Avron (1983), Borowitzka (1988) đã chứng minh *Dunaliella* sinh ra nhiều β -carotene để làm chất bảo vệ cho bộ máy quang hợp dưới các điều kiện môi trường bất lợi. Các yếu tố môi trường như cường độ ánh sáng cao, điều kiện dinh dưỡng giới hạn, nồng độ muối cao và nhiệt độ cao đều tác động đến các quang thụ quan cảm nhận ánh sáng hay kênh vận chuyển, làm giảm tính ổn định của chúng, qua đó làm tăng các stress oxy hoá và nồng độ oxy đơn bội. Các stress này có thể làm cho sự tăng trưởng của *Dunaliella* bị giảm nhưng lại tăng cường sự tích lũy carotenoid [3]. Từ đó, các nhà khoa học nhận thấy *Dunaliella* chính là nguồn nguyên liệu chứa β -carotene tự nhiên tốt nhất với các đồng phân 9-*cis* (chiếm 41%), all-*trans* (42%), 15-*cis* (10%) và đồng phân khác (7%). Chính vì vậy, từ đầu những năm 1960, người ta đã bắt đầu sản xuất *Dunaliella* để thu β -carotene tự nhiên, và đến cuối những năm 1980, việc nuôi trồng *Dunaliella salina* trên quy mô công nghiệp cũng đã bắt đầu được triển khai tại

Australia, Israel, Hoa Kỳ, Trung Quốc, Kuwait, Iran ... [3, 6, 10].

Nhu cầu sử dụng β -carotene trên thế giới ngày càng cao nhưng nguồn cung cấp β -carotene chủ yếu là từ tổng hợp hóa học (chiếm 84,8%), trong khi đó β -carotene ly trích từ tảo chỉ chiếm 8,5% và từ thực vật chiếm 6,7%. Do đó, việc sản xuất β -carotene từ vi tảo *Dunaliella* là một hướng đi mới đầy tiềm năng và có khả năng ứng dụng cao, mở rộng khả năng cung ứng nguồn β -carotene có hoạt tính tốt, đồng thời tận dụng dải bờ biển dài của nước ta cho việc nuôi trồng loài vi tảo biển này.

Chúng tôi tiến hành xác định một số điều kiện môi trường ảnh hưởng đến sự tăng trưởng, tích lũy β -carotene của chủng vi tảo *Dunaliella* sp. phân lập từ ruộng muối Việt Nam nhằm xác định một số điều kiện nuôi cấy phù hợp chủng tảo này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng tảo *Dunaliella* sp. đã được phân lập từ các ruộng muối ở công ty nước khoáng Vĩnh Hảo, Bình Thuận do Bộ môn Công nghệ sinh học thực vật và Chuyển hóa sinh học thực hiện và Bộ môn Sinh thái – Sinh học tiến hóa định danh theo hình thái. Hai bộ môn thuộc Khoa Sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Phương pháp

Nuôi cấy và quan sát hình thái

Môi trường nuôi cấy có các thành phần gồm: KH_2PO_4 0,035 g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4,5 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/l, NaHCO_3 1 g/l, Tris 1 g/l, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,3 μg , EDTA 1,86 μg .

Tảo được hoạt hóa trong các ống nghiệm chứa 10 ml môi trường. Sau đó, nhân giống trong 200 ml môi trường nuôi cấy để tiến hành các khảo sát tiếp theo.

Dùng đường tương quan tuyến tính giữa $\text{OD}_{660\text{nm}}$ và mật độ tế bào tảo *Dunaliella* sp. Mật

độ tế bào được xác định bằng buồng đếm hồng cầu.

Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến sự tăng trưởng và tích lũy β -carotene ở tảo *Dunaliella* sp

Tảo *Dunaliella* sp. được tiến hành khảo sát ở 2 loại điều kiện được các nhà khoa học cho là có ảnh hưởng nhiều đến sự tích lũy β -carotene là nồng độ NaCl và nguồn nitrogen [6]. Trong đó, nguồn nitrogen sử dụng trong môi trường này là KNO_3 nên loại muối này được dùng trong bước khảo sát.

Ở đây chúng tôi sử dụng 5 nồng độ NaCl là 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 M và 5 hàm lượng KNO_3 trong môi trường là 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 và 1,25 g/l.

Sinh trưởng của tảo được xác định thông qua giá trị mật độ quang được đo ở bước sóng 660nm ($\text{OD}_{660\text{nm}}$); hàm lượng β -carotene trong sinh khối tảo được xác định theo công bố của Shaish (1992) [1, 9].

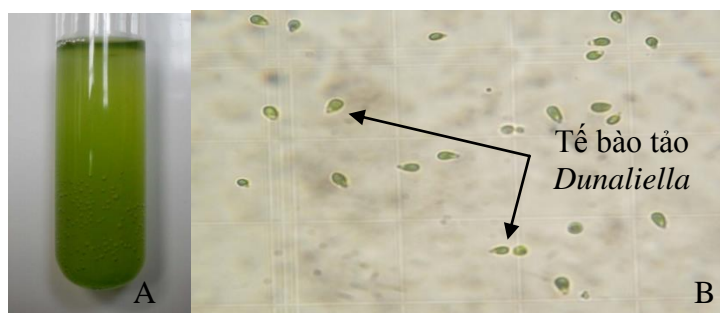
Khảo sát lượng β -carotene tích lũy

Lấy 1 ml dung dịch tảo, ly tâm 4000 vòng trong 5 phút, thu cặn. Hòa tan cặn với 3 ml dung dịch ethanol: hexane (2: 1 v/v). Thêm 2 ml nước và 4 ml hexane, vortex, sau đó ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút. Thu lớp dịch hexane chứa sắc tố (lớp bên trên), đem đo ở $\text{OD}_{450\text{nm}}$. Hàm lượng β -carotene có trong 1 ml mẫu phân tích được xác định theo công thức: $\text{OD}_{450\text{nm}} \times 25,2$. Xác định hàm lượng β -carotene sau từng khoảng thời gian 3 ngày nuôi cấy [9].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nuôi cấy và quan sát hình thái

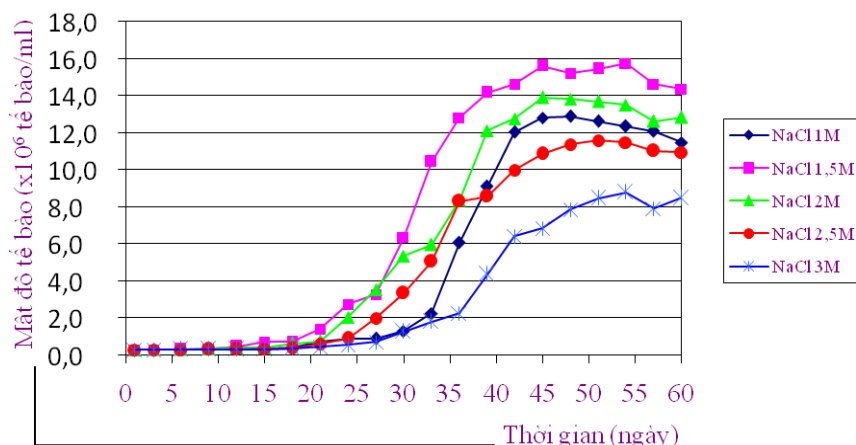
Tảo có xu hướng bám vào thành ống nghiệm do quá trình quang hưởng động. Quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy chủng tảo *Dunaliella* sp. này có đặc điểm là: dạng đơn bào, nhỏ, di động nhanh, có màu xanh lục, hình tròn, hình trứng hay hình oval, có hai lông roi dài bằng nhau, đầu có lông roi thường nhỏ hơn đầu còn lại (Hình 1). Tảo nuôi ở môi trường nuôi cấy có nồng độ muối 1,5 M và nồng độ KNO_3 1 g/l. Hiệu suất thu sinh khối khô trung bình đạt 0,32 g/l.



Hình 1. Dung dịch tảo hoạt hóa (hình A) và hình thái tế bào *Dunaliella* sp. trong buồng đếm hồng cầu quan sát dưới kính hiển vi (400x) (hình B)

Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sự tăng trưởng và tích lũy β -carotene của tảo *Dunaliella* sp.

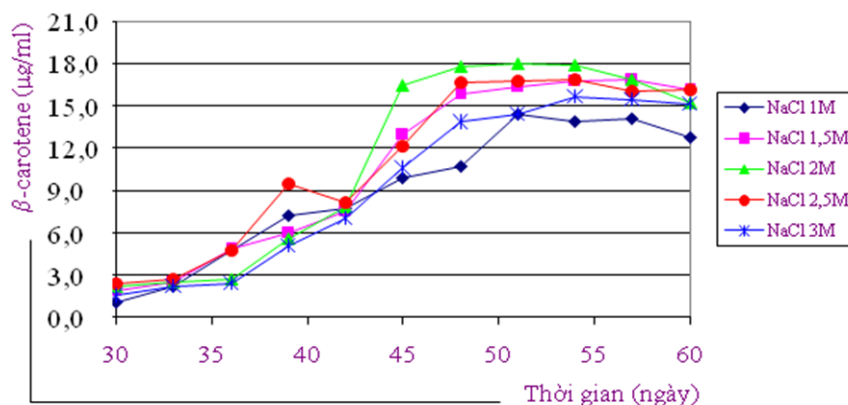
Tảo được nuôi trong 60 ngày, tiến hành xác định mật độ tế bào và hàm lượng β -carotene tích lũy đạt được (Hình 2,3 và 4).



Hình 2. Đồ thị biểu diễn mật độ tế bào *Dunaliella* sp. theo thời gian với các nồng độ muối khác nhau

Chủng tảo *Dunaliella* sp. tăng trưởng vào pha log ở ngày 25 rồi ổn định ở ngày 45 với mật độ tế bào cao nhất đạt $15,7 \times 10^6$ tế bào/ml ở nồng

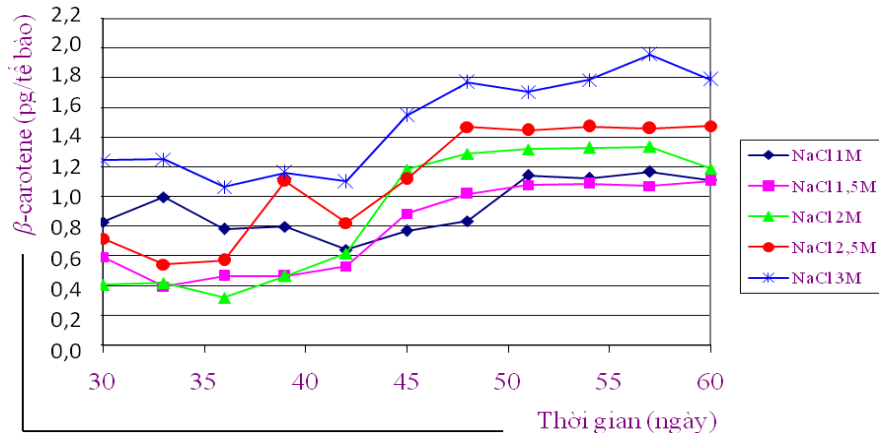
độ muối là 1,5 M; tiếp theo là nồng độ NaCl 2 M và thấp nhất ở NaCl 3 M.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ muối đến sự tích lũy β -carotene trong dung dịch tảo

Đối với sự tích lũy β -carotene trong sinh khối tảo thì nồng độ NaCl tốt nhất là 2 M với lượng β -carotene thu được là 18 $\mu\text{g/ml}$ (Hình 4). Tuy nhiên, ở nồng độ NaCl 3 M dù mật độ tế bào đạt thấp nhất nhưng hàm lượng β -carotene đạt được không khác nhau nhiều so với ở nồng độ 2 M và 1,5 M. Từ đó có thể suy ra rằng khi gia tăng nồng độ muối sẽ làm tăng sự tích lũy β -carotene trong tế bào tảo *Dunaliella* sp. Điều này được

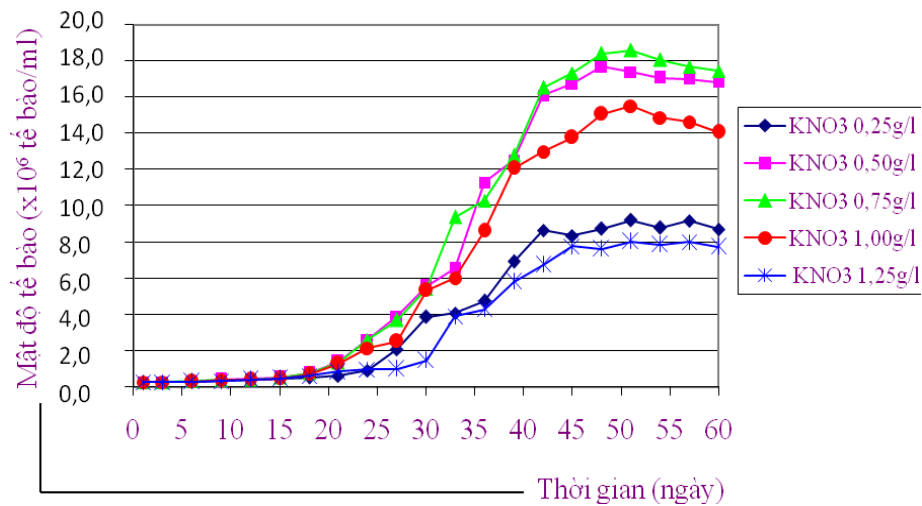
chứng minh rõ hơn ở hình 4 với lượng β -carotene tích lũy trong tế bào tảo đạt cao nhất ở NaCl 3 M đạt 1,9 $\mu\text{g/tế bào}$ và thấp nhất ở nồng độ NaCl 1 M và 1,5 M. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Çelekli A. (2006) và Zhu. Y.H. (2008), nồng độ NaCl tốt nhất cho tăng trưởng là 2M còn để tích lũy β -carotene là 3M (hàm lượng β -carotene đạt được khoảng 25 $\mu\text{g/ml}$).



Hình 4. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ muối đến sự tích lũy β -carotene trong tế bào tảo

Ảnh hưởng của nồng độ nitrogen đến sự tăng trưởng và tích lũy β -carotene của tảo *Dunaliella* sp.

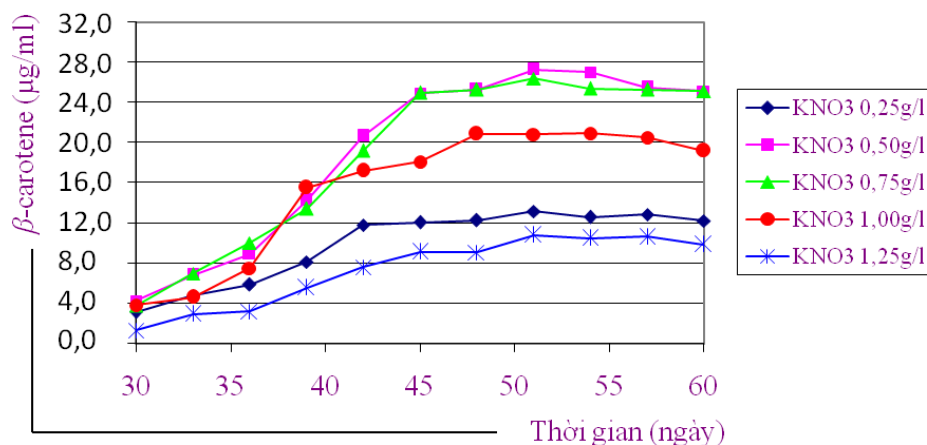
Tiến hành xác định mật độ tế bào và hàm lượng β -carotene tích lũy của tảo trong 60 ngày nuôi cấy. Kết quả đạt được thể hiện trên Hình 5, 6 và 7.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mật độ tế bào tảo *Dunaliella* sp. theo thời gian với các nồng độ KNO_3 khác nhau

Chủng tảo *Dunaliella* sp. tăng trưởng vào pha log ở ngày 25 rồi đi vào pha ổn định ở ngày 45 với mật độ tế bào cao nhất đạt $18,5 \times 10^6$ tế

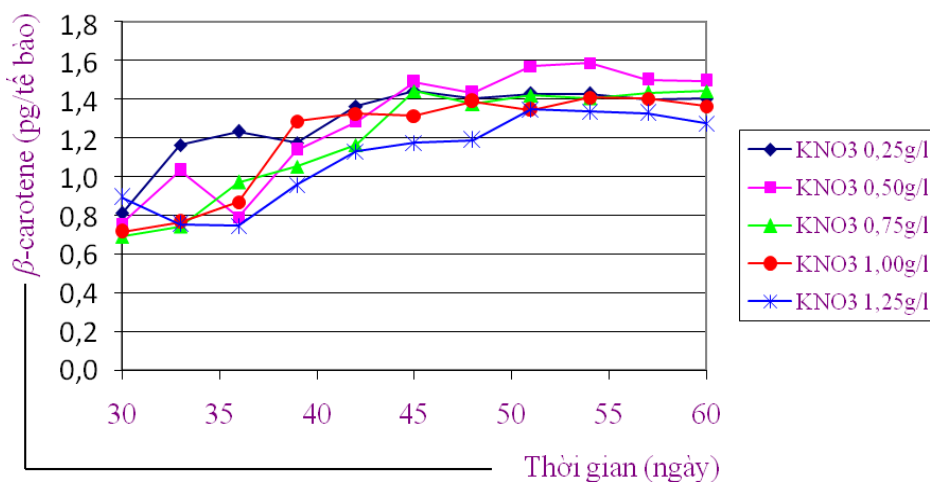
bào/ml ở nồng độ KNO_3 là 0,5 và 0,75 g/l và thấp nhất ở KNO_3 0,25 và 1,25 g/l.



Hình 6. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ KNO₃ đến sự tích lũy β -carotene trong dung dịch tảo

Đối với sự tích lũy β -carotene trong dịch tảo thì nồng độ KNO₃ tốt nhất là 0,5 và 0,75g/l với lượng β -carotene đạt là 27,2 μ g/ml và thấp nhất ở KNO₃ 0,25 và 1,25g/l. Như vậy, có thể thấy rằng có sự tương quan giữa mật độ tế bào và sự tích lũy β -carotene trong dung dịch tảo; tảo tăng trưởng càng tốt thì lượng β -carotene tích lũy trong dịch tảo càng cao và ngược lại. Điều này phù hợp với kết quả Hình 7 khi mà sự tích lũy β -

carotene trong tế bào tảo *Dunaliella* sp. có sự chênh lệch với nhau ít ở các nồng độ KNO₃. Trong đó, sự tích lũy β -carotene của tảo cao nhất ở nồng độ KNO₃ 0,5g/l đạt 1,58pg/tế bào. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Çelekli A. (2006) và Prieto A. (2010) với nồng độ muối nitrate khoảng 0,45 g/l (hàm lượng β -carotene đạt được khoảng 30 μ g/ml).



Hình 7. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ KNO₃ đến sự tích lũy β -carotene trong tế bào tảo

KẾT LUẬN

Chủng tảo *Dunaliella* sp. phân lập được có thời gian tăng trưởng khoảng 55 ngày. Pha log bắt đầu từ ngày thứ 25. Hàm lượng β -carotene tối đa đạt được ở pha ổn định nên thời điểm thu sinh khối tảo và β -carotene tốt nhất ở ngày 45. Điều kiện nuôi tảo thu sinh khối tối ưu là nồng độ NaCl 1,5 M và KNO₃ 0,5 g/l.

Kết quả cho thấy điều kiện stress gia tăng nồng độ NaCl trong môi trường nuôi sẽ kích thích tích lũy β -carotene trong tế bào tảo nhưng lại giảm sự tăng trưởng tế bào, còn nồng độ nitrate lại ít ảnh hưởng. Hàm lượng β -carotene

trong sinh khối khô tối đa đạt được là với nồng độ NaCl 3 M là 9%; còn với nồng độ KNO₃ 0,5 g/l là 8,3%.

Tuy nhiên, các điều kiện stress này sẽ làm giảm lượng β -carotene thu được trong dịch nuôi tảo mà đây chính là hiệu quả thu nhận β -carotene thực tế, khi nuôi cấy chủng *Dunaliella* này nên điều kiện môi trường nuôi cấy để thu β -carotene được đề xuất là nồng độ NaCl 2 M và KNO₃ 0,5 g/l với lượng β -carotene đạt được tương ứng khoảng 18 và 27,5 μ g/ml.

Investigation of beta-carotene production from microalgae *Dunaliella* isolated in Vietnam

- Huynh Hiep Hung
- Nguyen Thi My Lan
- Le Thi My Phuoc
- Pham Thanh Ho

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Beta-carotene is known as one of nature's most powerful antioxidants. It is also a major pro-vitamin A nutrient, and simulative effects on the immune system. Nowadays, the microalga Dunaliella is the best commercial source of natural β -carotene since it has a mixture composed mainly of 9-cis isomer which is evident is a better antioxidant than the all-trans isomer. In addition, synthetic β -carotene only

contains the all-trans isomer, natural (all-trans) beta-carotene is found together with other carotenoids. In this study, we chose the microalga Dunaliella sp. which is isolated at salter in Vietnam since it could grow more easily in this climate. Therefore, it has a great potential for large-scale culture in Vietnam coast. The research aims at investigating the optimization of cultural conditions and stresses depth for

cell growth and β -carotene production of this alga. The obtained results showed that the highest cell density was attained at 2M salt concentration with 2.7×10^6 cell/ml and productivity of dry biomass was 0.321g/l.

Furthermore, β -carotene content increased to 9% of dry biomass under high salinities (NaCl 3M) or nitrogen starvation of cultural condition.

Keywords: Beta-carotene, *Dunaliella*, dry mass, nitrogen starvation, salt concentration.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Çelekli, G. Donmer, Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp., *Journal of Microbiological Methods*, 22, 183-189 (2006).
- [2]. M. Garcia-Gonzalez, J. C. Monreno, F. J. Florencio, M. G. Guerreo, Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor, *Journal of Biotechnology*, 115, 81-90 (2005).
- [3]. T. A. Hosseini, M. Shariati, *Dunaliella* biotechnology: methods and applications, *Journal of Applied Microbiology*, 107, 14-35 (2009).
- [4]. D. M. M. Kleinegriss, M. A. Van Es, M. Janssen, W. A. Brandebnurg, R. H. Wijffels, Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 22, 645-649 (2010).
- [5]. J. T. Landrum, Carotenoids: Physical, chemical and biological functions and properties, CRC Press (2010).
- [6]. Michael a. Borowitzka, The mass culture of *Dunaliella salina*, Algal Biotechnology Laboratory, Murdoch University (2002).
- [7]. Oren A., Review: A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005, *Saline Systems* (2005).
- [8]. Y. I. Posudin, N. P. Massjuk G. G., Liliskaya, Photomovement of *Dunaliella* Teod., Vieweg Teubner Verlag, 23-83 (2010).
- [9]. Prieto A., Canavate J.P., Garcia-Gonzalez M., Assessment of carotenoids production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes, *Journal of Biotechnology*, 151, 180-185 (2010).
- [10]. Z. H. Ye, J. G. Jiang, G. H. Wu, Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects, *Biotechnology Advances*, 26, 953-959 (2008).