



Bài báo nghiên cứu

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, SINH LÝ VÀ SINH HÓA LÀ CÁC MARKER QUAN TRỌNG CHO CHỌN LỌC CÁC CHỦNG VI TẢO LỤC NƯỚC NGỌT CÓ HÀM LƯỢNG CAROTENOID VÀ LIPID CAO

Võ Hồng Trung*, Đỗ Anh Thu, Nguyễn Thị Hồng Phúc, Trần Đình Phương

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Võ Hồng Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Ngày nhận bài: 02-6-2020; ngày nhận bài sửa: 23-10-2020; ngày duyệt đăng: 25-12-2020

TÓM TẮT

Vi tảo lục là những vi sinh vật quang hợp có khả năng tổng hợp các chất hữu cơ thiết yếu như carotenoid, lipid, chất chống oxy hóa để duy trì sự sống trên Trái Đất. Quá trình chọn lọc các chủng vi tảo lục có khả năng tích lũy carotenoid, lipid cao được thực hiện trên các chủng vi tảo lục phân lập từ các mẫu nước thu thập ở Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa. Kết quả cho thấy, có 4 chủng vi tảo lục PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) có khả năng tích lũy carotenoid, lipid cao với tế bào có kích thước lớn, màu vàng hoặc cam, tăng trưởng thấp và ổn định, hàm lượng carotenoid và lipid cao; các chủng PQ 1.4, PQ 1.2, PQ 6.1(1) không có khả năng tích lũy carotenoid, lipid với tế bào có kích thước nhỏ, màu xanh, tăng trưởng cao, hàm lượng carotenoid và lipid thấp khi nuôi cấy dưới cạn kiệt dinh dưỡng và ức chế cường độ ánh sáng cao.

Từ khóa: carotenoid; vi tảo lục; lipid

1. Giới thiệu

Trong các ngành tảo, tảo lục (Chlorophyta) là một ngành lớn, phong phú về thành phần loài và đa dạng về cấu trúc hình thái. Hiện đã biết 500 chi với khoảng 8000 loài. Tảo lục (Chlorophyta) có diệp lục tố a, b và hình thành tinh bột trong lục lạp thường gắn với pyrenoid. Tảo lục chủ yếu ở nước ngọt (khoảng 90%), trong khi đó ở nước mặn chiếm khoảng 10% (Lee, 2018). Vi tảo, một nhóm lớn và đa dạng các sinh vật tự dưỡng và dị dưỡng, có tiềm năng lớn để sản xuất lượng lớn các sản phẩm có giá trị cho nhiều ngành công nghiệp. Vi tảo sử dụng năng lượng mặt trời, chất dinh dưỡng và carbon dioxide (CO₂) để sản xuất protein, tinh bột, lipid và các phân tử sinh học khác. Sinh khối vi tảo sử dụng làm nguồn nhiên liệu thay thế, các sản phẩm có giá trị bao gồm các hợp chất hoạt tính sinh học cho sức khỏe và dinh dưỡng của con người (omega-3), dược phẩm, mỹ phẩm và thức ăn chăn nuôi. Các sản phẩm bổ sung có giá trị bao gồm carotenoid; phycobiliprotein; vitamin C, E và biotin; acid béo (linolenic, arachidonic...); và protein tái tổ hợp (Dixon, & Wilken, 2018).

Cite this article as: Vo Hong Trung, Do Anh Thu, Nguyen Thi Hong Phuc, & Tran Dinh Phuong (2020). The morphological, physiological and biochemical characteristics are important markers for selection of freshwater green microalgae with high carotenoid and lipid contents. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 17(12), 2157-2172.

Vi tảo có thể sản xuất một lượng lớn các chất chống oxy hóa và các sắc tố (carotenoid gồm fucoxanthin, lutein, β -carotene, astaxanthin và phycobilliprotein), LC-PUFA, protein (các acid amin thiết yếu như methionine, threonine và tryptophan), hợp chất phenolic, hợp chất sulfate và vitamin với ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, nông nghiệp và các ngành công nghiệp dược phẩm (Markou, & Nerantzis, 2013), (Munir, Sharif, Naz, & Manzoor, 2013).

Ngoài ra, vi tảo còn có khả năng tích lũy một hàm lượng lipid tổng cao có khả năng cung cấp nguồn dầu thực phẩm cho ngành công nghiệp thực phẩm. Sinh tổng hợp acid béo và triacylglycerol (TAG) ở vi tảo được nghiên cứu rất hạn chế so với thực vật bậc cao. Dựa trên sự tương đồng về trình tự gen và một số đặc điểm sinh hóa chung của enzyme từ vi tảo và thực vật bậc cao có liên quan đến chuyển hóa lipid. Vì vậy, các con đường sinh tổng hợp acid béo và TAG ở vi tảo tương tự như ở thực vật bậc cao (Hu et al., 2008).

Vi tảo lục chứa diệp lục tố a và b, cũng như các phân tử carotenoid bao gồm β -carotene và các loại xanthophyll khác nhau như astaxanthin, canthaxanthin, lutein, zeaxanthin. Vi tảo có thể tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp bao gồm những chất có hoạt tính sinh học như chất chống oxy hóa, độc tố (Barkia, Saari, & Manning, 2019). Các chủng vi tảo lục có giá trị sinh học cao gồm khả năng tích lũy hàm lượng β -carotene (*Dunaliella salina*, *Haematococcus*), Astaxanthin (*Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofigiensis*, *Chlorococcum*) có hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm và chống ung thư; Eicosapentaenoic acid (EPA), Docosahexaenoic acid (DHA) (*Tetraselmis* sp.) có hoạt tính kháng viêm và tạo thành mạch máu (Talero et al., 2015).

Việt Nam là nước nhiệt đới, không chỉ có bờ biển dài mà còn có nhiều ao, hồ, sông, suối. Do đó sự đa dạng sinh học vi tảo, đặc biệt tảo lục là rất phong phú. Khả năng chọn lọc và phân lập các chủng tảo có hoạt tính sinh học là rất lớn. Nghiên cứu nhằm mục đích chọn lọc sơ bộ các vi tảo lục đơn bào có hoạt tính sinh học như chứa hàm lượng carotenoid và lipid cao dựa trên các marker hình thái, sinh lí và sinh hóa.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Các chủng vi tảo lục và môi trường nuôi cấy

Bảy chủng vi tảo lục PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2), PQ 1.4, PQ 1.2, PQ 6.1(1) phân lập từ các mẫu nước thu thập ở Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang được sử dụng để thực hiện các thí nghiệm. Các chủng vi tảo được nuôi cấy trên môi trường BBM, pH = 6,6 (Andersen, 2005).

2.2. Các phương pháp phân tích

2.2.1. Quan sát hình thái tế bào

Hình thái tế bào vi tảo được quan sát bằng kính hiển vi quang học (400x) sau các ngày nuôi cấy.

2.2.2. Phân tích tăng trưởng

Lấy 100 μ L dịch nuôi tảo và cố định bằng dung dịch Lugol (5% iốt và 10% kali iodua). Mật độ tế bào được xác định bằng cách đếm số lượng tế bào trực tiếp 2 hoặc 3 ngày một lần, sử dụng kính hiển vi quang học (40x), bằng buồng đếm hồng cầu sâu 0,1 mm (Neubauer

Haemocytometer). Hút 10 μ L dịch nuôi cấy bơm vào buồng đếm hồng cầu. Đếm tế bào vi tảo trong 25 ô ở khối vuông giữa có diện tích 1 mm² (Guillard, & Sieracki, 2005).

Mật độ tế bào trong 1 mL được tính theo công thức Guillard và Sieracki (Guillard, & Sieracki, 2005).

$$D = \frac{n}{i} \cdot 10^4 \times \text{hệ số pha loãng}$$

n: tổng số tế bào đếm được

i: số lần đếm tế bào

D: mật độ tế bào (tế bào/mL)

2.2.3. Xác định hàm lượng carotenoid

Lấy 1 mL dịch nuôi vi tảo li tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút, hòa tan cồn với 1 mL HCl 4M. Sau đó, đun ở bếp cách thủy 70°C trong 2 phút (Sarada, Vidhyavathi, Usha, & Ravishankar, 2006; Dong, Huang, Zhang, Wang, & Liu, 2014). Chiết với 3 mL Ethanol: Hexan 2:1 (v/v). Thêm 4 mL hexan vào hỗn hợp, lắc mạnh trong 5 phút, sau đó li tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lớp hexan tách ra nằm ở phía trên và độ hấp thụ của nó được đo ở bước sóng 450nm (Shaish, Ben-Amotz, & Avron, 1992).

Hàm lượng carotene tổng được xác định theo công thức:

$$\text{Carotene } (\mu\text{g/mL}) = A_{450} \times 25,2$$

Trong đó: A₄₅₀: độ hấp thụ tại bước sóng 450nm

2.2.4. Xác định hàm lượng lipid tổng bằng phương pháp Sulfo-phospho-vanillin

Thuốc thử Phosphovanillin: hòa tan 0,06 g vanillin trong 2 mL ethanol nguyên chất, thêm 8 mL nước cất và lắc kỹ. Sau đó, thêm 50 mL acid phosphoric đậm đặc vào tạo thành hỗn hợp và bảo quản trong tối cho quá trình phân tích. Thuốc thử phospho-vanillin nên được chuẩn bị ngay khi phân tích mẫu để đảm bảo thuốc thử hoạt động tốt (Mishra et al., 2014), (Jaeyeon Park, Hae Jin Jeong, Eun Young Yoon, & Moon, 2016).

Lấy 1 mL dịch nuôi cấy li tâm ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần cặn tế bào được li trích với 2 mL acid sulfuric đậm đặc (98%), sau đó đun ở bếp cách thủy 100°C trong 10 phút, làm lạnh trong trong bể nước đá. Bổ sung 5mL thuốc thử phospho-vanillin, hỗn hợp ủ ở 37°C trong 15 phút và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm (Mishra et al., 2014), (Jaeyeon Park et al., 2016).

Đường chuẩn lipid: dầu cải thương mại (sản phẩm của Công ty Cổ phần Dầu thực vật Tường An) trong cloroform (nồng độ 1 mg/mL), nồng độ lipid chuẩn (10-150 μ g) được thực hiện trong các ống nghiệm sạch có nắp. Ủ các ống nghiệm ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút để làm bay hơi chloroform. Thêm 2 mL acid sulfuric đậm đặc, sau đó đun trên bếp cách thủy 100°C trong 10 phút, làm lạnh trong bể nước đá. Bổ sung 5 mL thuốc thử Phosphovanillin, hỗn hợp được ủ ở 37°C và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm. Xác định hàm lượng lipid tổng theo phương trình $y = 0,005x - 0,0531$, R² = 0,9929.

2.3. Phương pháp chọn lọc

Bảy chủng vi tảo lục PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2), PQ 1.4, PQ 1.2, PQ 6.1(1) được sử dụng để tiến hành chọn lọc dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lí và sinh hóa thông qua các nghiệm thức nuôi cấy kiệt dinh dưỡng và ức chế cường độ ánh sáng cao

2.3.1. Chọn lọc các chủng vi tảo bằng cách nuôi đến khi cạn kiệt dinh dưỡng

Vi tảo lục nuôi cấy trên môi trường BBM đạt phase tăng trưởng sau 7-10 ngày được sử dụng để bố trí các thí nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện trong bình tam giác 250 mL với 150 mL môi trường (môi trường BBM mới và dịch tảo nuôi cấy vi tảo), mật độ tế bào ban đầu là $1,0 \times 10^6$ tế bào/mL đối với các chủng PQ 1.4, PQ 1.2, PQ 6.1(1) và $0,05 \times 10^6$ tế bào/mL đối với các chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.2(1), PQ 3.2(2).

Điều kiện nuôi cấy: cường độ ánh sáng $50 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng: tối = 12 : 12 giờ, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Mẫu được lắc 2-3 lần trong ngày để đảm bảo ánh sáng tới các tế bào tảo là như nhau.

Quan sát hình thái tế bào, xác định mật độ tế bào, phân tích hàm lượng carotenoid và lipid của vi tảo sau mỗi 3 ngày nuôi cấy.

2.3.2. Chọn lọc các chủng vi tảo bằng cách ức chế cường độ ánh sáng cao

Thí nghiệm được thực hiện với 7 chủng vi tảo lục trên môi trường BBM gồm 2 giai đoạn:

Giai đoạn nuôi cấy tăng trưởng: vi tảo được nuôi trong bình tam giác 250 mL với 150 mL môi trường BBM (môi trường BBM mới và dịch tảo nuôi cấy vi tảo), mật độ tế bào ban đầu là $0,07 \times 10^6$ tế bào/mL, cường độ ánh sáng $50 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng: tối = 12: 12 giờ, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Mẫu được lắc 2-3 lần trong ngày để đảm bảo ánh sáng tới các tế bào tảo là như nhau.

Giai đoạn ức chế: sau 12 ngày nuôi cấy, vi tảo được chuyển qua điều kiện cường độ ánh sáng $200 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng: tối = 12: 12 giờ, nhiệt độ $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Mẫu được lắc 2-3 lần trong ngày để đảm bảo ánh sáng tới các tế bào tảo là như nhau.

Quan sát hình thái tế bào, xác định mật độ tế bào, phân tích hàm lượng carotenoid và lipid của vi tảo sau mỗi 2 ngày nuôi cấy.

2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft office Excel 2010 và phân tích one way ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với sai số ý nghĩa $p < 0,05$. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình (Mean) $\pm$ Sai số chuẩn (SE).

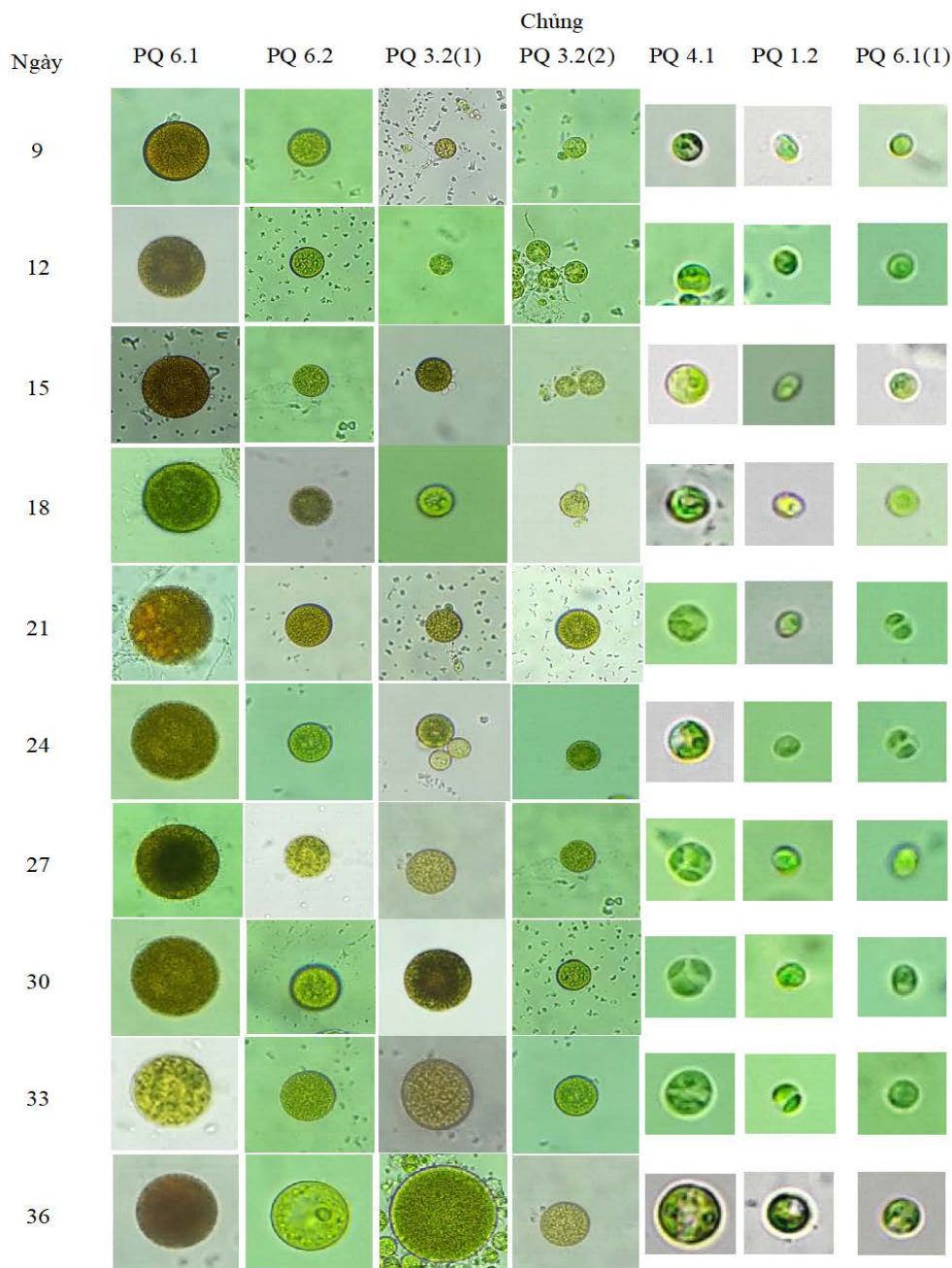
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Chọn lọc bằng cách nuôi đến khi cạn kiệt dinh dưỡng

3.1.1. Hình thái tế bào

Hình 3.1 thể hiện sự thay đổi hình thái tế bào các chủng vi tảo lục được nuôi cấy đến cạn kiệt dinh dưỡng trên môi trường BBM. Tế bào của các chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) có dạng hình cầu, chuyển vàng/cam, kích thước tế bào lớn và thành dày. Trong khi đó, tế bào các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) có hình cầu, màu xanh, kích thước tế bào nhỏ và thành tế bào mỏng. Kết quả này cho thấy các chủng vi tảo PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) thuộc nhóm có khả năng tích lũy carotenoid và lipid, các chủng vi tảo PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) thuộc nhóm không có khả năng tích lũy carotenoid và lipid trong điều kiện dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy cạn kiệt.

Trong điều kiện nuôi cấy kéo dài nguồn dinh dưỡng trong môi trường trở nên cạn kiệt dinh dưỡng, đặc biệt dinh dưỡng đa lượng nitơ và phosphor bị giới hạn ảnh hưởng lên hình thái, kích thước tế bào. Điều kiện giới hạn nitơ cũng như đói nitơ ảnh hưởng lên hình thái và sinh hóa tế bào *Scenedesmus* sp. CCNM1077. Kích thước tế bào ở điều kiện bình thường là 4,5 μm tăng lên khoảng 5,3 μm , chiều rộng giảm từ 3,36 xuống 2,44 μm trong điều kiện đói nitơ. Hàm lượng diệp lục tố *a* và diệp lục tố *b* giảm và carotenoid tăng. Vì vậy màu sắc dịch nuôi cấy chuyển từ xanh sang màu vàng sau 9 ngày ức chế (Pancha et al., 2014).

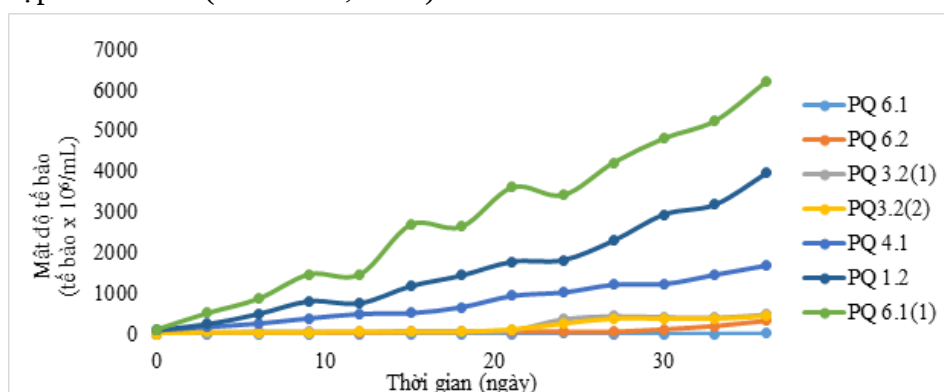


Hình 3.1. Hình thái tế bào của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng

3.1.2. Sự tăng trưởng

Hình 3.2 cho thấy, sự tăng trưởng của các chủng vi tảo lục được nuôi cấy đến cạn kiệt dinh dưỡng. Mật độ tế bào của các chủng vi tảo lục tăng dần trong suốt quá trình nuôi cấy, tuy nhiên chủng vi tảo PQ 6.1 mật độ tế bào thấp và không có sự khác biệt giữa các ngày ($p \geq 0,05$). Mật độ tế bào các chủng vi tảo có màu vàng/cam, kích thước lớn (PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2)) thấp hơn so với các chủng vi tảo có màu xanh, kích thước nhỏ (PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1)) ($p \leq 0,05$).

Các loài vi tảo là nguồn tài nguyên tiềm năng của nhiên liệu sinh học và các chất chuyển hóa có giá trị cao, và sự sản xuất của chúng lại phụ thuộc vào tăng trưởng. Các thông số tăng trưởng có thể được sàng lọc để lựa chọn các loài vi tảo mới tổng hợp các hợp chất quan tâm. Các sinh vật tự dưỡng và dị dưỡng đều đã chứng minh có tiềm năng, cụ thể là khả năng sản xuất lipid cũng như các chất có giá trị (đặc biệt carotenoid) dưới các điều kiện ức chế lí hóa khác nhau lên vi tảo (Minhas, Hodgson, Barrow, & Adholeya, 2016). Theo Tran và cộng sự (2014), trong điều kiện ức chế độ muối cao (4,0 M) các chủng vi tảo *Dunaliella salina* có khả năng tích lũy carotenoid cao có mật độ tế bào thấp, ổn định, tế bào chuyển sang vàng/cam, kích thước lớn, tín hiệu lipid trên tế bào cao hơn so với các chủng không có khả năng tổng hợp carotenoid (Tran et al., 2014).



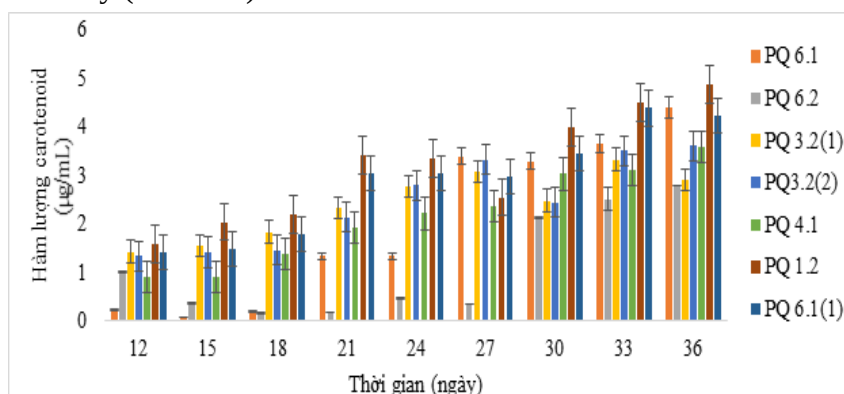
Hình 3.2. Sự tăng trưởng của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng

3.1.3. Hàm lượng carotenoid

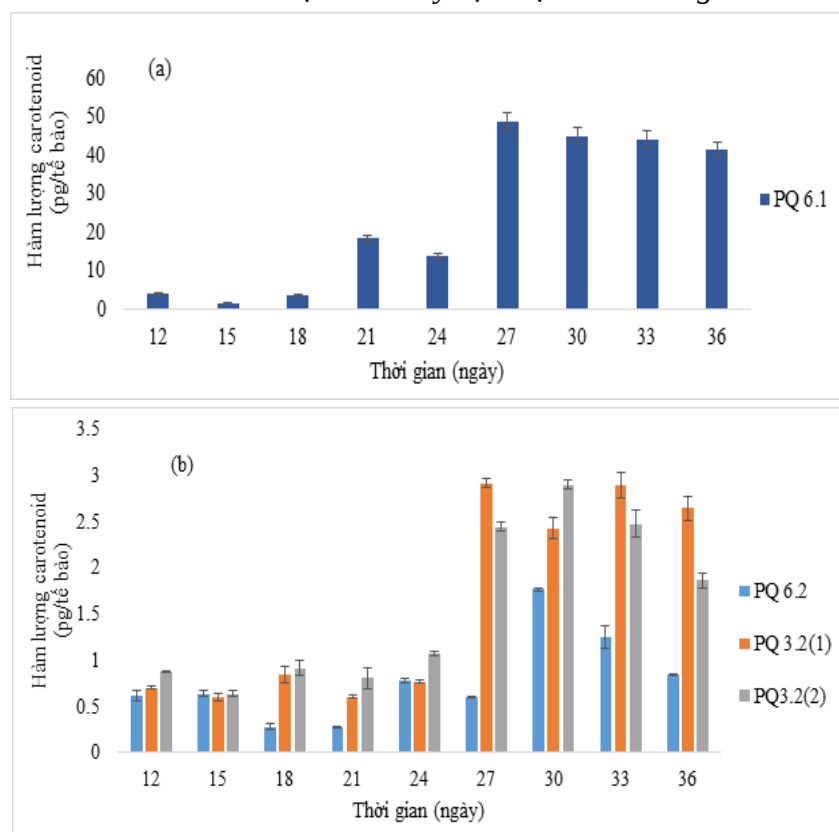
Hàm lượng carotenoid trên đơn vị thể tích ($\mu\text{g/mL}$) của các chủng vi tảo lục tăng dần trong quá trình nuôi cấy (Hình 3.3). Tuy nhiên, hàm lượng carotenoid trên đơn vị tế bào của các chủng vi tảo lục có sự khác biệt khá rõ rệt. Chủng PQ 6.1 có hàm lượng carotenoid cao sau 27 ngày nuôi cấy (48,480 pg/tế bào) cao hơn gấp khoảng 16 lần so với các chủng PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2), (0,600 pg/tế bào, 2,443 pg/tế bào và 2,914 pg/tế bào) và gấp khoảng 250 lần so với các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) (0,194 pg/tế bào, 0,110 pg/tế bào, 0,070 pg/tế bào) (Hình 3.4).

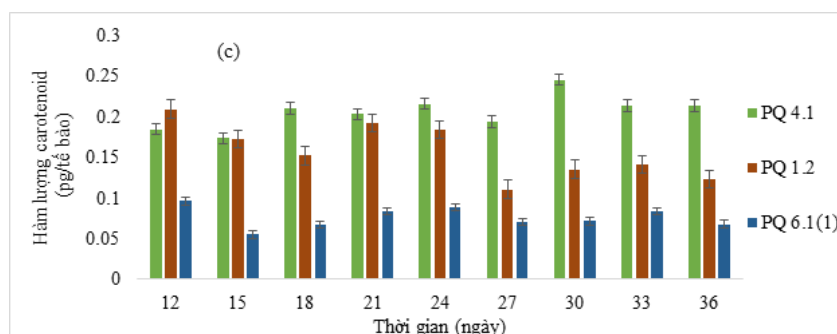
Sự tổng hợp carotenoid của vi tảo ảnh hưởng chủ yếu bởi các yếu tố như cường độ ánh sáng, nhiệt độ, độ muối và giới hạn dinh dưỡng (Martín-Juárez, Markou, Muylaert, Lorenzo-Hernando, & Bolado, 2017). Vi tảo đã gây ra sự chú ý lớn như là nguồn lipid và carotenoid

bền vững. Sự tích lũy carotenoid và lipid có thể được kích thích bởi các điều kiện ức chế như giới hạn dinh dưỡng hoặc tiếp xúc với các điều kiện vật lý bất lợi. Tuy nhiên, các điều kiện bất lợi này thường ảnh hưởng xấu đến sự tăng trưởng của vi tảo và gây tổn thương oxy hóa cho tế bào có thể làm giảm năng suất của các sản phẩm mong muốn (Sun, Ren, Zhao, Ji, & Huang, 2018). Như vậy, các chủng vi tảo lục PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) thuộc nhóm có hàm lượng carotenoid cao thể hiện tế bào có màu vàng và các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) thuộc nhóm có hàm lượng carotenoid thấp thể hiện tế bào có màu xanh sau 27 ngày nuôi cấy (Hình 3.1).



Hình 3.3. Hàm lượng carotenoid trên đơn vị thể tích của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng





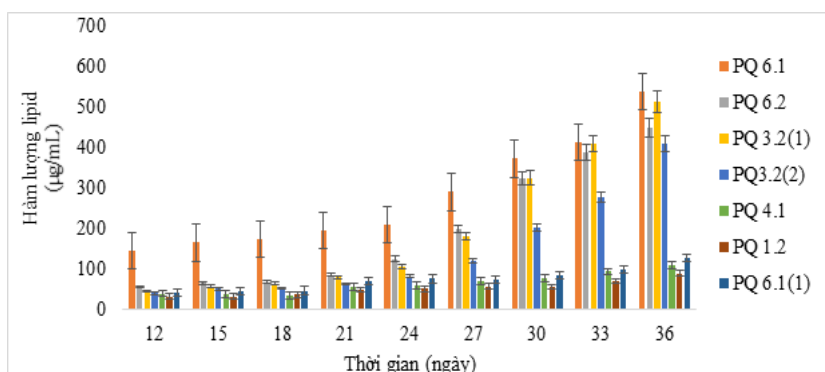
Hình 3.4. Hàm lượng carotenoid trên đơn vị tế bào của các chủng vi tảo lục (a) PQ 6.1; (b) PQ 6.2, PQ 3.2(1), PQ 3.2(2); (c) PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) dưới điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng

3.1.4. Hàm lượng lipid

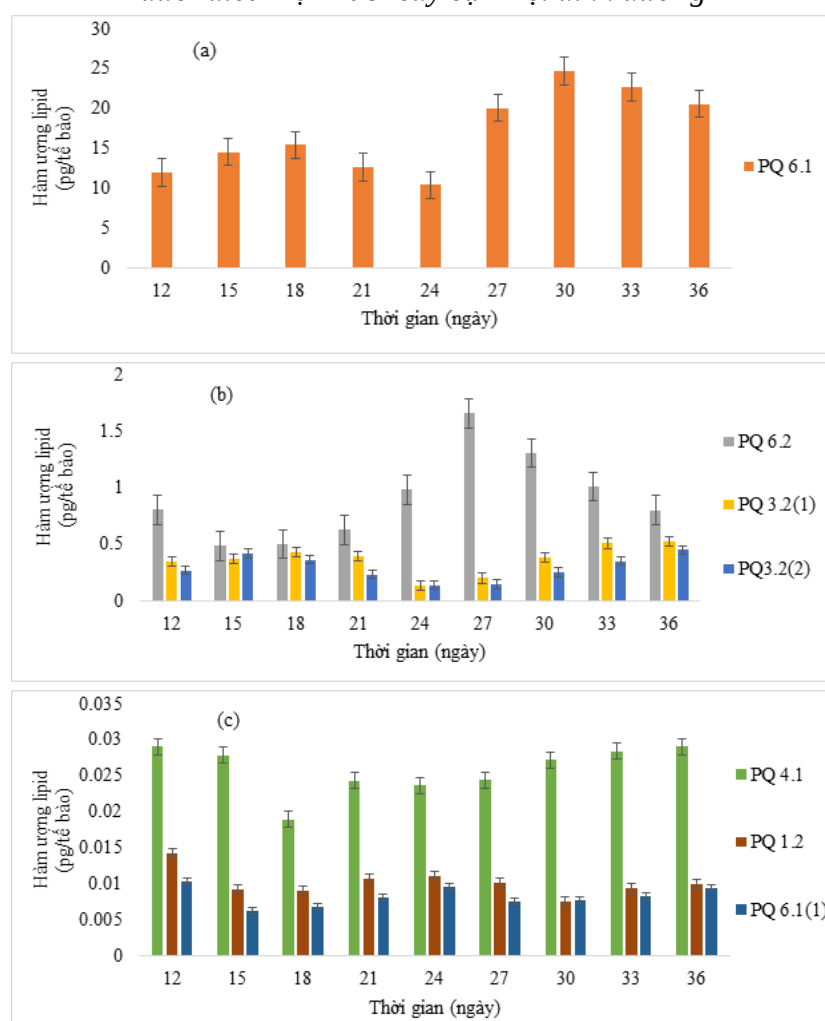
Hàm lượng lipid trên đơn vị thể tích ($\mu\text{g/mL}$) của các chủng vi tảo lục tăng dần theo thời gian nuôi cấy, trong đó các chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) có hàm lượng lipid cao hơn các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) sau 27 ngày nuôi cấy (Hình 3.5). Ngoài ra, hàm lượng lipid trên tế bào (pg/tế bào) của chủng PQ 6.1 (20,000 pg/tế bào ngày 27) cao hơn khoảng 30 lần so với các chủng PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) (1,657 pg/tế bào, 0,143 pg/tế bào, 0,197 pg/tế bào ngày 27) và gấp khoảng 819 lần so với các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) (0,024 pg/tế bào, 0,010 pg/tế bào, 0,008 pg/tế bào ngày 27) (Hình 3.6).

Trong tất cả các dinh dưỡng đa lượng trong môi trường, nitơ chiếm khoảng 1-10% trọng lượng khô của vi tảo, là chất dinh dưỡng quan trọng nhất ảnh hưởng lên sự tăng trưởng và tích lũy lipid ở các loài tảo khác nhau. Sự tích lũy lipid tăng gấp đôi trong điều kiện đói nitơ ở *Neochloris oleoabundans* và *Nannochloropsis* sp. Tương tự phosphor chiếm ít hơn 1% ($\sim 0,03$ - $0,06\%$) sinh khối tảo, là yếu tố thiết yếu cho sự tăng trưởng và phát triển ổn định của vi tảo. Thiếu phosphor trong môi trường dẫn đến ức chế quang hợp và ảnh hưởng lên tăng trưởng. Sự giới hạn phosphate dẫn đến tăng tích lũy lipid ở các tế bào vi tảo *Scenedesmus* sp. và *Botryococcus braunii* (Minhas et al., 2016)

Theo Tran và cộng sự (2014), tín hiệu lipid (lipid signal) được sử dụng như một marker quan trọng cho việc phát hiện và chọn lọc lượng lớn các chủng vi tảo lục *Dunaliella salina* có khả năng tích lũy hàm lượng carotenoid cao kết hợp với các dữ liệu về hình thái và sinh lý dưới một số điều kiện nuôi cấy ức chế (Tran et al., 2014). Triacylglycerol ở vi tảo được xem là nguồn nhiên liệu sinh học đầy hứa hẹn khi được nuôi cấy trong điều kiện đói nitơ. Tuy nhiên, đói nitơ là điều kiện ức chế làm tăng tích lũy lipid, cuối cùng dẫn đến ức chế phân chia tế bào và quang hợp. *Chlorella* và *Chlamydomonas* là các vi tảo lục cho thấy khả năng tích lũy lipid trong điều kiện nuôi cấy đói nitơ (Goncalves et al., 2016). Như vậy các chủng vi tảo lục PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) thuộc nhóm có hàm lượng lipid cao và các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) thuộc nhóm có hàm lượng lipid thấp sau 27 ngày nuôi cấy.



Hình 3.5. Hàm lượng lipid trên thể tích của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng

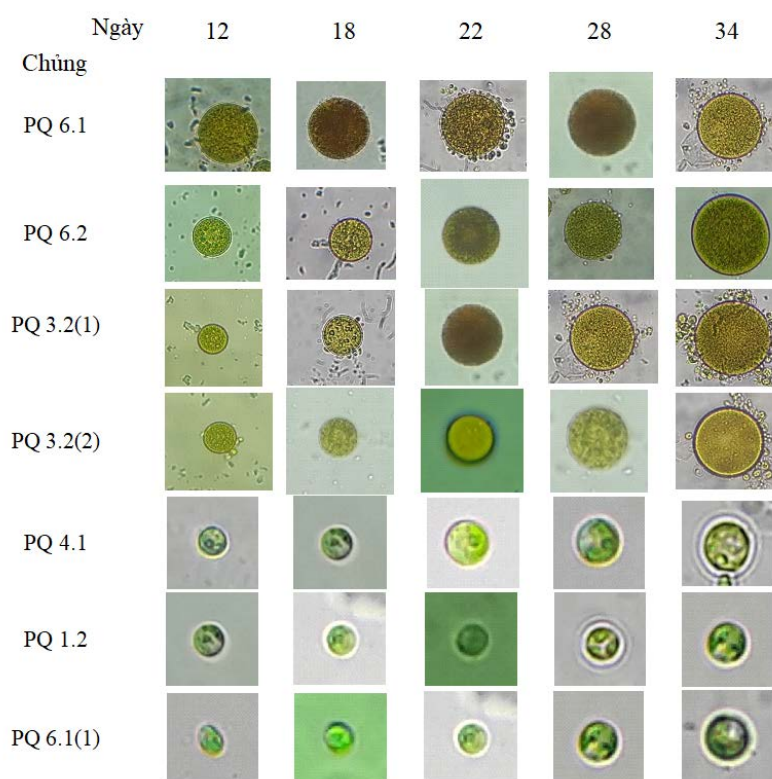


Hình 3.6. Hàm lượng lipid trên đơn vị tế bào của các chủng vi tảo lục (a) PQ 6.1; (b) PQ 6.2, PQ 3.2(1), PQ 3.2(2); (c) PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) dưới điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng

3.2. Chọn lọc bằng cách ức chế ánh sáng cường độ cao

3.2.1. Hình thái tế bào

Sau 12 ngày nuôi cấy, các chủng vi tảo lục được ức chế dưới điều kiện cường độ ánh sáng cao 200 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, tế bào các chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) tế bào có hình cầu, chuyển vàng/cam và kích thước tế bào lớn. Trong khi đó, các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) tế bào hình cầu, màu xanh và kích thước tế bào không có thay đổi nhiều (Hình 3.7). Ánh sáng cần cho tăng trưởng và quá trình quang hợp của vi tảo. Tuy nhiên ở điều kiện ánh sáng cường độ cao ảnh hưởng hình thái và màu sắc tế bào, tế bào tăng quá trình tổng hợp carotenoid và lipid làm cho tế bào tăng kích thước và chuyển sang vàng hoặc cam.

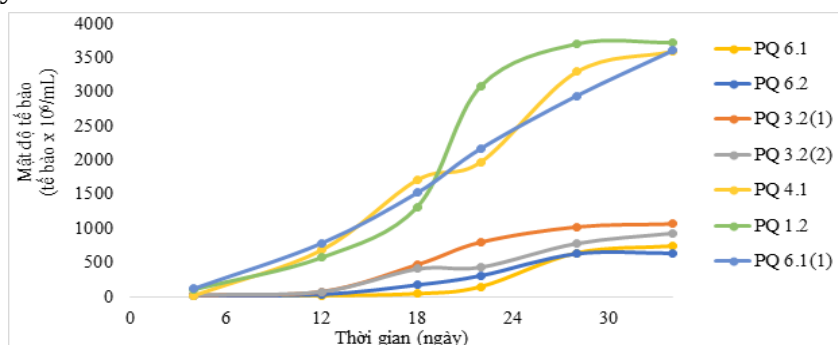


Hình 3.7. Hình thái tế bào của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy ức chế ánh sáng cao

3.2.2. Sự tăng trưởng

Hình 3.8 cho thấy, sự tăng trưởng của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện ức chế ánh sáng cao 200 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ sau 12 ngày nuôi cấy. Sự tăng trưởng phân biệt rõ thành 2 nhóm: nhóm có mật độ tế bào thấp và tăng trưởng ổn định gồm 4 chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) và nhóm có mật độ tế bào cao và tăng trưởng mạnh gồm 3 chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1). Các vi sinh vật quang hợp thể hiện sự đa dạng về hình dạng và kích thước. Mỗi chủng có một điều kiện tăng trưởng tối ưu riêng như nhiệt độ, pH, độ muối, ánh sáng và thành phần dinh dưỡng trong môi trường. Trong đó chỉ số quan trọng nhất đối với các vi

sinh vật quang hợp là cường độ ánh sáng. Dưới các điều kiện ức chế, cường độ ánh sáng cao, cạn kiệt dinh dưỡng, sự thay đổi phân áp oxy hoặc nhiệt độ cao hay thấp, quá trình chuyển của vi sinh vật quang hợp thay đổi và cường độ quang hợp có thể giảm (Faraloni, & Torzillo, 2017). Vì vậy, khi có sự thay đổi cường độ ánh sáng sau 12 ngày nuôi cấy các loài vi tảo khác nhau có sự thay đổi về sự tăng trưởng và chuyển hóa để đáp ứng lại với những điều kiện này.



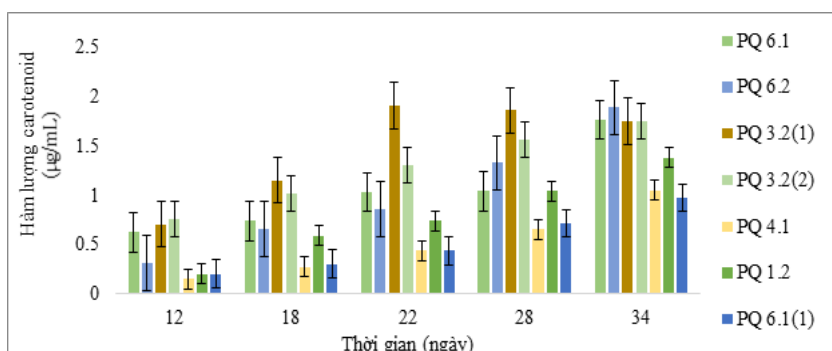
Hình 3.8. Sự tăng trưởng của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy ức chế cường độ ánh sáng cao

3.2.3. Hàm lượng carotenoid

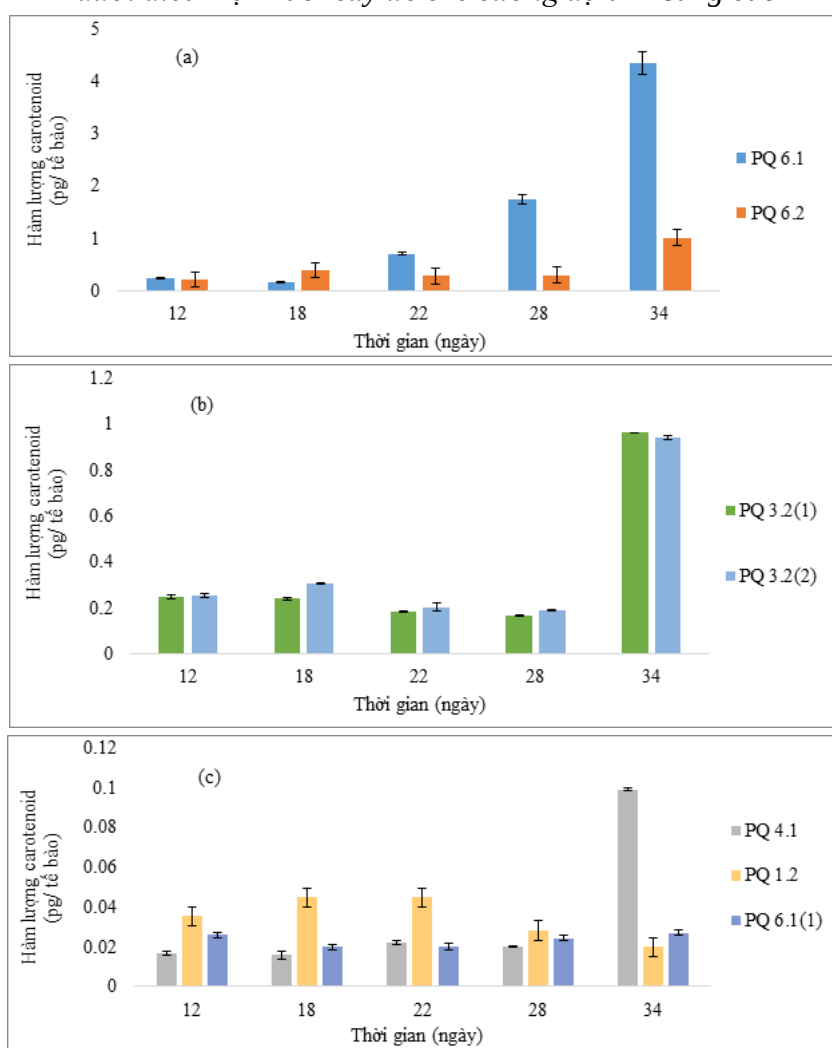
Hàm lượng carotenoid trên đơn vị thể tích ($\mu\text{g/mL}$) và tế bào (pg/tế bào) của các chủng vi tảo lục tăng lên sau ức chế cường độ ánh sáng cao. Trong đó, các chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) có hàm lượng cao hơn các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) ($p \leq 0,05$) (Hình 3.9, 3.10).

Ánh sáng là một trong những yếu tố giới hạn quan trọng nhất đối sự sản xuất carotenoid, sinh khối và acid béo. Cường độ ánh sáng cũng như thời gian chiếu sáng ảnh hưởng lên sự tăng trưởng, sinh khối và các chất chuyển hóa quan trọng khác ở các loại vi tảo khác nhau. Tăng cường độ ánh sáng dẫn đến tăng gấp 3 lần hàm lượng astaxanthin ở *H. pluvialis*. Bên cạnh đó, hàm lượng β -carotene cũng được tăng ở *D. salina* lên tới 3,1% trọng lượng khô khi cường độ ánh sáng thay đổi từ 100 đến 1000 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ (Minhas et al., 2016).

Trong nuôi cấy vi tảo để giải quyết vấn đề tăng trưởng và sản xuất các hợp chất có giá trị sinh học, một giải pháp phổ biến là chiến lược nuôi cấy 2 giai đoạn, giai đoạn 1 với điều kiện nuôi cấy tối ưu để đạt được sinh khối tối đa, trong khi giai đoạn 2 để cho sự tích lũy lipid và carotenoid sử dụng các điều kiện ức chế như cạn kiệt nitơ, cường độ ánh sáng cao, nhiệt độ cao, độ muối cao, nồng độ sắt cao (Sun et al., 2018). Ở thực vật và tảo, carotenoid được tổng hợp trong lục lạp quanh nhân và sự tích lũy chúng chỉ khi tế bào tiếp xúc với một số yếu tố ức chế. Sự tích lũy astaxanthin trong các thể lipid bên ngoài lục lạp tăng dưới một số điều kiện ức chế. Sự tổng hợp carotenoid được tăng cường bởi ROS (reactive oxygen species) dưới các điều kiện ức chế như cường độ ánh sáng cao, độ muối cao (Minhas et al., 2016).



Hình 3.9. Hàm lượng carotenoid trên đơn vị thể tích của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy ức chế cường độ ánh sáng cao

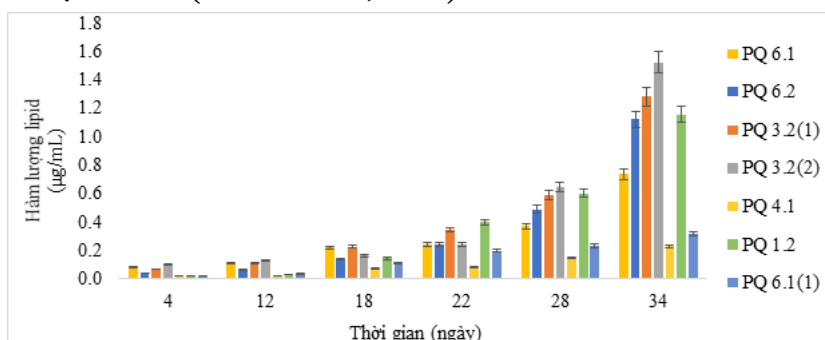


Hình 3.10. Hàm lượng carotenoid trên đơn vị tế bào của các chủng vi tảo lục (a) PQ 6.1, PQ 6.2; (b) PQ 3.2(1), PQ 3.2(2); (c) PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) dưới điều kiện nuôi cấy ức chế cường độ ánh sáng cao

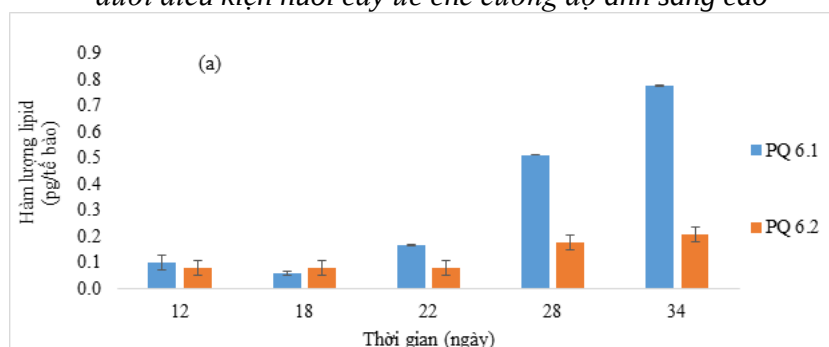
3.2.4. Hàm lượng lipid

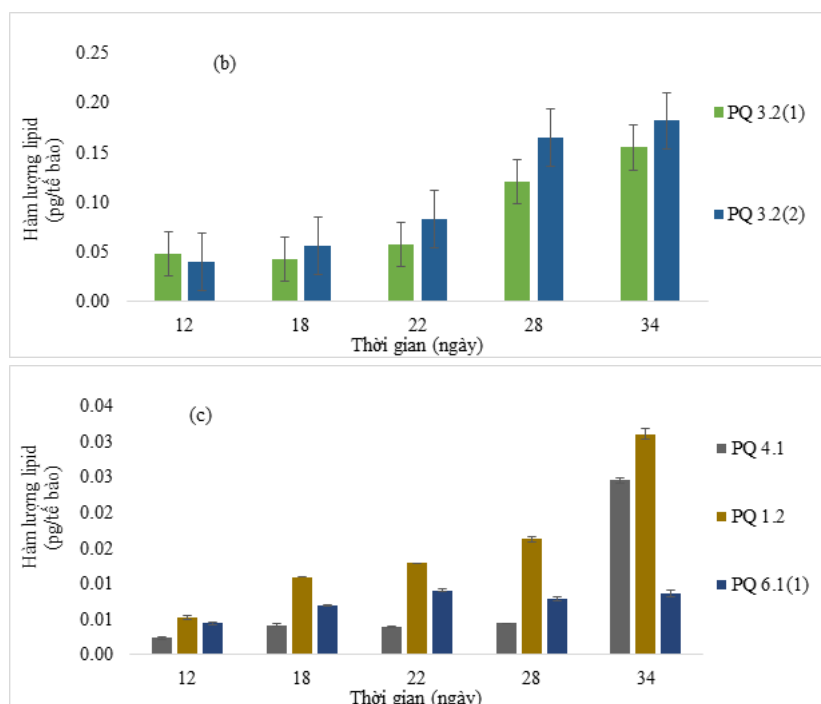
Tương tự hàm lượng carotenoid, hàm lượng lipid trên đơn vị thể tích ($\mu\text{g/mL}$) và trên tế bào (pg/tế bào) của các chủng vi tảo lục tăng lên sau ức chế cường độ ánh sáng cao. Trong đó, các chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1(1), PQ 3.2(2) có hàm lượng cao hơn các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) ($p \leq 0,05$) (hình 3.11, 3.12). Nhiều yếu tố ức chế khác nhau gây ra sự thay đổi quá trình chuyển hóa của tế bào như hoạt hóa tinh bột và tích lũy triglyceride dẫn đến tích lũy các hạt lipid trong tảo. Yếu tố ức chế phổ biến nhất được sử dụng cho tăng sản xuất lipid là cường độ ánh sáng, nhiệt độ và nitrate (Minhas et al., 2016).

Parietochloris incise là một vi tảo lục đơn bào nước ngọt tích lũy hàm lượng rất cao triacylglycerol giàu acid arachidonic. *Parietochloris incise* nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng cao ($400 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) đạt được hàm lượng acid béo tổng và acid arachidonic trên thể tích cao do tăng sinh khối. Sự đổi nitor cũng mang lại sự gia tăng mạnh tỷ lệ acid arachidonic trên acid béo tổng (Solovchenko, Khozin-Goldberg, Didi-Cohen, Cohen, & Merzlyak, 2008). Ở *Mychonastes homosphaera*, *Chlorella vulgaris*, *Raphidocelis subcapitata* và *Scenedesmus* sp. sự sản xuất lipid tăng khi tăng cường độ ánh sáng từ thấp đến cao. Hàm lượng acid béo không bão hòa nhiều nối đôi (PUFA) cao dưới cường độ ánh sáng thấp, tuy nhiên ở cường độ ánh sáng cao gây ra sự tích lũy lượng lớn acid béo bão hòa và acid béo không bão hòa một nối đôi (Minhas et al., 2016).



Hình 3.11. Hàm lượng lipid trên đơn vị thể tích của các chủng vi tảo lục dưới điều kiện nuôi cấy ức chế cường độ ánh sáng cao





Hình 3.12. Hàm lượng lipid trên đơn vị tế bào của các chủng vi tảo lục (a) PQ 6.1, PQ 6.2; (b) PQ 3.2(1), PQ 3.2(2); (c) PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) dưới điều kiện nuôi cấy ức chế cường độ ánh sáng cao

4. Kết luận

Các chủng vi tảo lục được phân lập từ Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang có thể chia làm hai nhóm: nhóm các chủng PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.2(1), PQ 3.2(2) tế bào chuyển màu vàng hoặc cam, kích thước tăng, tăng trưởng thấp và ổn định, tích lũy carotenoid và lipid cao dưới các điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng và ức chế cường độ ánh sáng cao. Trong khi đó, nhóm các chủng PQ 4.1, PQ 1.2, PQ 6.1(1) tế bào có màu xanh, kích thước nhỏ, tăng trưởng cao, tích lũy carotenoid và lipid thấp dưới các điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng và ức chế cường độ ánh sáng cao.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andersen, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*: Elsevier.
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. (2019). Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine drugs*, 17(5), 304.
- Dixon, C., & Wilken, L. R. (2018). Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-24.

- Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., & Liu, Y. (2014). Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *ScientificWorldJournal*, 2014, 694305. doi:10.1155/2014/694305
- Faraloni, C., & Torzillo, G. (2017). Synthesis of antioxidant carotenoids in microalgae in response to physiological stress. *Carotenoids. IntechOpen*, 143-157.
- Goncalves, E. C., Koh, J., Zhu, N., Yoo, M. J., Chen, S., Matsuo, T., . . . Rathinasabapathi, B. (2016). Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: evidence for a role for ROC 40, a transcription factor involved in circadian rhythm. *The Plant Journal*, 85(6), 743-757.
- Guillard, R. R., & Sieracki, M. S. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. *Algal culturing techniques*, 239-252.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621-639.
- Jaeyeon Park, Hae Jin Jeong, Eun Young Yoon, & Moon, S. J. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*, 31(4).
- Lee, R. E. (2018). *Phycology*: Cambridge University Press.
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology advances*, 31(8), 1532-1542.
- Martín-Juárez, J., Markou, G., Muylaert, K., Lorenzo-Hernando, A., & Bolado, S. (2017). Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (pp. 183-207): Elsevier.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7, 546.
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour Technol*, 155, 330-333. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.077
- Munir, N., Sharif, N., Naz, S., & Manzoor, F. (2013). Algae: a potent antioxidant source. *Sky Journal of Microbiology Research*, 1(3), 22-31.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156, 146-154.
- Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D., & Ravishankar, G. A. (2006). An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Agric Food Chem*, 54(20), 7585-7588. doi:10.1021/jf060737t
- Shaish, A., Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1992). Biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella* *Methods in Enzymology* (Vol. 213, pp. 439-444): Academic Press.

- Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., & Merzlyak, M. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 245-251.
- Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 272.
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015). Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine drugs*, 13(10), 6152-6209.
- Tran, D., Mai, T., Vo, T., Ward, A., Nguyen, H., & Hoang, X. (2014). Lipid Signal Can Be An Additional Marker For The Detection Of *Dunaliella Salina*. *Wolfenia journal*, 21(12), 216-233.

**THE MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
CHARACTERISTICS ARE IMPORTANT MARKERS FOR SELECTION
OF FRESHWATER GREEN MICROALGAE WITH HIGH CAROTENOID
AND LIPID CONTENTS**

Vo Hong Trung*, Do Anh Thu, Nguyen Thi Hong Phuc, Tran Dinh Phuong
Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh, Vietnam

*Corresponding author: Vo Hong Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Received: June 02, 2020; Revised: October 23, 2020; Accepted: December 25, 2020

ABSTRACT

Green microalgae are photosynthetic microorganisms capable of producing essential organic substances to maintain life on Earth. The selection process for green microalgal strains capable of accumulating high carotenoids and lipid contents was carried out on biomass from water samples collected in Phu Quoc (PQ) island, Kien Giang province of Viet Nam, based on morphological, physiological and biochemical characteristics. As a result, four green microalgal strains, including PQ 6.1, PQ 6.2, PQ 3.1 (1), PQ 3.2 (2), were identified as high accumulators, whereas four other strains, PQ 1.4, PQ 1.2, PQ 6.1(1), were identified as non-accumulators. This is evident by the differences in cellular characteristics: when grown under nutrient-depleting and/or high-light intensity condition, high-accumulating strains have large cell size, yellow or orange coloration, low and stable growth but high carotenoid and lipid contents; whereas non-accumulators have small cell size, green color, high growth, but low carotenoid and lipid contents.

Keywords: carotenoid; Green microalgae; lipid