

EFFECT OF SALINITY ON CELL GROWTH AND BETA-CAROTENE PRODUCTION IN DUNALIELLA SP. ISOLATED FROM NAM DINH SALTY FIELDS

Pham Thi Bich Dao

Thanh Do University

Email: ptbdao@thanhdouni.edu.vn

Received: 17/12/2022

Reviewed: 20/12/2022

Revised: 25/12/2022

Accepted: 30/12/2022

DOI: <https://doi.org/10.58902/tcnckhpt.v1i2.22>

Abstract: Nam Dinh salty fields are the largest hyper-saline area in the North of Vietnam, has fluctuated in salinity over time. *Dunaliella* is a type of halophile green-orange microalgae especially found in salty fields and is known for its antioxidant activity; because of its ability to create large content of carotenoids. In this study, *Dunaliella* sp. isolates from hyper-saline Nam Dinh salty fields water were cultured in modified Johnson media and were treated at eight different salinities (0.5 to 4 M NaCl), then their cell proliferation rate and β -carotene production were studied. In order to determine the optimal salinity required for the highest β -carotene accumulation, cell count of *Dunaliella* sp. isolates; total carotenoids and concentration of the β -carotene were determined by direct microscopic counting and spectrophotometry. In the samples with different salinities, the cell count and the β -carotene content of *Dunaliella* sp. DA23 ranged between $6.83-10.02 \times 10^6$ cell/mL and 5.13-9.31pg/cell, respectively. At the end of the experiments (16 days), the maximum cell content at 1M NaCl was 9.93×10^6 cell/mL but the highest β -carotene content was obtained at 2.5M NaCl concentrations, as 9.2 pg/cell.

Keywords: Carotenoid; *Dunaliella*; NaCl; Nam Dinh; β -carotene.

1. Đặt vấn đề

Dunaliella là một loại vi tảo đơn bào, hai roi thuộc ngành tảo lục. Các loài *Dunaliella* khác nhau có hình dạng tế bào đa dạng từ hình ellip, hình trứng, hình cầu (kích thước chiều dài 5-25 μ m, chiều rộng 3-13 μ m), tồn tại trong nước ở các đại dương, các hồ nước mặn, các đầm lầy và các ruộng ngập mặn gần biển, chiếm ưu thế trong các thủy vực có nồng độ muối 2M và nồng độ magie cao (Ben Amotz, 2004; Hosseini và Shariati, 2008). Cơ chế thích nghi với dải nồng độ muối rộng ở *Dunaliella* dựa trên khả năng tổng hợp các β -carotene và thay đổi nồng độ glycerol trong tế bào để bảo vệ chúng trước các yếu tố từ môi trường như cường độ ánh sáng và áp suất khí quyển (Avron, 1992; Shariati và Lilley, 1994). Loài *Dunaliella* được các nhà nghiên cứu quan

tâm do chúng có hoạt tính chống oxy hóa cao nhờ khả năng sinh ra lượng lớn các carotenoid. Chi *Dunaliella* có 22 loài và một số dạng biến thể, các dạng sinh sống ở biển và các loài ưa mặn. Loài được biết tới nhiều nhất là *Dunaliella salina* ưa mặn (Borowitzka và Siva, 2007). *Dunaliella salina* là loài vi tảo tồn tại trong môi trường tự nhiên, thường có màu xanh trong môi trường nước mặn. Dưới điều kiện môi trường có độ muối và cường độ ánh sáng cao, *Dunaliella salina* lại có màu đỏ do sự sản sinh các carotenoid có chức năng bảo vệ trong tế bào.

Các carotenoid là chất hóa học thu hút sự quan tâm lớn trên thị trường do thường được sử dụng như các chất tạo màu trong các loại dược phẩm dinh dưỡng, dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm (Fazeli và cộng sự, 2006).

Những hợp chất này có các đặc tính chống oxy hóa và đặc tính tiềm ẩn trong quá trình ngăn ngừa ung thư (Nishino và cộng sự, 2002). Trong số khoảng 1000 loại carotenoid được tìm thấy trong tự nhiên, chỉ có một vài loại có chứa β -carotene (cà rốt), lycopene (cà chua) và lutein (rau bina) (Prasad và cộng sự, 1999). Mặc dù một số loại carotenoid như β -carotene và zeaxanthin có thể được tổng hợp nhân tạo nhưng nguồn carotenoid từ vi tảo tự nhiên, vi khuẩn và nấm men vẫn thường được sử dụng như các chất bổ sung và thu hút sự chú ý của cộng đồng khoa học thế giới (Bhosale và cộng sự, 2004). β -carotene là một sắc tố dạng terpenoid có giá trị dinh dưỡng cao, được sử dụng như một tiền chất của vitamin A và có đặc tính chống oxy hóa cao (Gomez và cộng sự, 2003). Một phân tử β -carotene có thể trung hòa tới hơn 1000 phân tử oxy gốc tự do (Foote và cộng sự, 1970). Vi tảo *Dunaliella* là một nguồn sản xuất β -carotene đang thu hút nhiều sự chú ý với những ứng dụng thực tiễn trong các ngành công nghiệp dinh dưỡng, dược phẩm, mỹ phẩm và trong nghiên cứu kỹ thuật di truyền. Do đó, rất cần những nghiên cứu chuyên môn giúp nâng cao khả năng nhận dạng các chủng *Dunaliella* có hiệu năng sản xuất β -carotene tự nhiên cao và tối ưu hóa môi trường nuôi cấy chúng trong thực tế.

Nam Định là một trong những vựa muối lớn nhất của miền Bắc với 870 ha sản xuất muối. Giao Phong và Bạch Long thuộc huyện Giao Thủy là một trong những xã có sản lượng muối cao của tỉnh. Ruộng muối thuộc xã Giao Phong nằm sát phía trong đê trung ương, giáp thị trấn Quất Lâm. Từ 250 ha ruộng muối, mỗi năm Bạch Long cũng đóng góp cho thị trường khoảng 40.000 tấn muối.

Mục đích của nghiên cứu này là tìm ra các chủng *Dunaliella* có khả năng tổng hợp β -carotene và xác định ảnh hưởng của độ muối đến quá trình tích lũy β -carotene tự nhiên. Biến đổi khí hậu trong những năm gần đây mang đến nhiều đợt nắng nóng kéo dài, đẩy nhanh quá trình bay hơi nước trực tiếp khiến cho độ muối tại khu vực sản xuất muối của 2 xã Giao Phong và Bạch Long tăng lên, quần thể *Artemia* (loài giáp xác) giảm, từ đó gia tăng mức độ đa dạng về mật độ *Dunaliella*. Dưới ảnh hưởng của nhiệt độ cao, cường độ

ánh sáng mạnh và độ muối cao, *Dunaliella* hình thành nên màu đỏ của các ruộng muối. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng và vai trò của nồng độ muối đối với quá trình sinh trưởng và tổng hợp β -carotene của *Dunaliella* phân lập từ ruộng muối hai xã Giao Phong và Bạch Long, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định.

2. Tổng quan nghiên cứu

Dunaliella được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1838 bởi Michel Flix từ các ao bốc hơi sản xuất muối ở miền Nam nước Pháp và được chính thức đặt tên sau những khám phá của Teodoresco năm 1905 (Oren, 2005). Đến nay, loài vi tảo lục đơn bào này đã trở thành mắt xích khởi đầu cho chuỗi sản xuất trong các môi trường siêu mặn trên toàn thế giới. *Dunaliella* là vi tảo điển hình được dùng trong các nghiên cứu về khả năng thích ứng với nồng độ muối và các nghiên cứu giải thích sự tương thích của chất hoà tan và chất hữu cơ để đạt sự cân bằng thẩm thấu. Các nghiên cứu về khả năng tổng hợp β -carotene của *Dunaliella* trong các điều kiện khác nhau cũng đã mở ra các hướng ứng dụng công nghệ sinh học vi tảo thú vị (Ali & Mansour, 2006; Chidambara, 2005).

Theo Ben-Amotz, *Dunaliella* là một nguồn cung cấp carotenoid tiềm năng. Ở độ muối trên 27% NaCl, *Dunaliella* có thể tích lũy được lượng carotenoid lên tới trên 14% khối lượng khô (Ben-Amotz, 1991). β -carotene có hàng loạt tác dụng có lợi cho sức khỏe trong đó nổi bật nhất là tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch, đặc biệt là ở những người dương tính với HIV. Một số carotenoid cũng ảnh hưởng đến con đường truyền tín hiệu giữa các tế bào trong cơ thể, ví dụ như dòng tế bào ung thư thường không thể nhận được các tín hiệu hóa học kiểm soát sinh trưởng từ các tế bào khác. β -carotene giúp mở các kênh truyền tín hiệu trên màng các tế bào ung thư và tiền ung thư, cho phép cơ thể truyền tín hiệu ngừng phân chia đến dòng tế bào ung thư. Do đó, các loại thực phẩm giàu carotenoid, đặc biệt là β -carotene không chỉ có khả năng ngăn cản mà còn có những tác dụng tích cực trong quá trình đảo ngược bệnh ung thư (Naseem và cộng sự, 2016).

Nhiều quốc gia trên thế giới đã đi sâu vào nghiên cứu các đặc điểm sinh học, điều kiện sinh trưởng tối ưu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tích lũy β -carotene của vi tảo. Các thí nghiệm đầu tiên nhằm đánh giá ảnh hưởng của

độ muối đến tốc độ sinh trưởng của các loài *Dunaliella* khác nhau đã được công bố vào những năm 1930 bởi Baas Becking. Baas Becking đã phát hiện ra *Dunaliella viridis* có khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh trong môi trường có nồng độ muối 1-4 M (tương ứng 6-23%) NaCl và pH 6-9. Baas Becking cũng phát hiện ra nồng độ ion Ca và Mn cao là nhân tố ức chế quá trình sinh trưởng tích lũy β -carotene của vi tảo (Baas Becking, 1931). Các nghiên cứu sau này của Lerche trên nhiều chủng *Dunaliella* đã chứng minh rằng hầu hết các chủng *Dunaliella* sinh trưởng tối ưu ở nồng độ muối từ 2-8% và sinh trưởng chậm khi nồng độ muối tăng trên 15%. Tốc độ sinh trưởng là 0,47-1,22/ngày khi được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu. Song song với các nghiên cứu về khả năng sinh trưởng là các nghiên cứu về khả năng tích lũy β -carotene. Khả năng tích lũy β -carotene của vi tảo *Dunaliella* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: nồng độ NaCl, dinh dưỡng, cường độ chiếu sáng, pH... Trong nghiên cứu của Lerch, khả năng tổng hợp carotenoid được kích thích bởi giới hạn dinh dưỡng cũng như cường độ ánh sáng (Lerch, 1937). *Dunaliella salina* NT6 phân lập tại Nha Trang sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ muối NaCl 2M, tích lũy hàm lượng β -carotene lớn hơn 2,94 pg/tế bào (Nguyễn Thị Hải Thanh và cộng sự, 2014). Cùng là chủng phân lập tại Việt Nam, *Dunaliella* sp. phân lập tại Bình Thuận cũng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối NaCl 2M, nhưng có thể đạt hàm lượng β -carotene khoảng 9% sinh khối khô ở môi trường có nồng độ muối NaCl 3M.

Nhờ sự phát triển của khoa học kỹ thuật hiện đại, ngoài những phương pháp nghiên cứu truyền thống, các nhà khoa học đã ứng dụng công nghệ gen trong kích hoạt tổng hợp carotenoid của *Dunaliella* và bước đầu đạt được những hiệu quả tích cực (Fisher và cộng sự, 1997; Liska và cộng sự, 2004; Oren, 2005). Tổ chức tiên phong trong việc nuôi trồng *Dunaliella* để sản xuất β -carotene được thành lập ở Nga vào năm 1966. Hiện nay trên thế giới, sản xuất *Dunaliella* quy mô lớn để thu β -carotene là một trong những thành công về công nghệ sinh học ở sinh vật ưa mặn và có thể ứng dụng vào sản xuất *Dunaliella* thương mại (Borowitzka và cộng sự, 1990; Oren, 2005). Các công nghệ khác nhau được ứng dụng trong quy trình này, từ hình thức nuôi quảng canh tự nhiên đến hình thức nuôi

trồng tập trung mật độ cao với các điều kiện giám sát nghiêm ngặt. Tại Việt Nam, trước ảnh hưởng của thay đổi khí hậu những năm gần đây, trên các ruộng muối hình thành nhiều vùng màu đỏ cùng với sự xuất hiện của nhiều chủng *Dunaliella* tiềm năng, hứa hẹn một hướng đi đầy tiềm năng về sản xuất β -carotene tự nhiên từ vi tảo *Dunaliella*.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Môi trường Johnson cải tiến

Môi trường Johnson cải tiến (Borowitzka, 1988) bao gồm: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,5 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 1,5 g/L; KCl 0,2 1,5 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,2 1,5 g/L; KNO_3 1 1,5 g/L; $NaHCO_3$ 0,043 g/L; KH_2PO_4 0,035 g/L; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,0024 g/L; Na_2EDTA 0,0018 g/L; thành phần vi lượng: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,05 mg/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,04 mg/L; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0,38 mg/L; H_3BO_3 0,61 mg/L; $CuSO_4 \cdot 2H_2O$ 0,06 mg/L; $ZnCl_2$ 0,04 mg/L.

Điều chỉnh pH của môi trường tới 7,5 bằng các dung dịch H_2SO_4 hoặc NaOH pha loãng (0.01M) và đậm đặc (1M) (Celekli và Donmez, 2006). Môi trường khử trùng ở 121°C/10 phút.

3.2. Thu mẫu và phân lập vi tảo

Các mẫu nước tự nhiên được thu thập từ 5 ruộng muối vào thời điểm giữa mùa hè 2017 (các tháng khô hạn từ tháng 5 đến tháng 7) thuộc hai xã Giao Phong và Bạch Long, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định (bảng 1). Mẫu đựng trong các bình nhựa (100 mL) và được chuyển tới phòng thí nghiệm trong 24 giờ. Quan sát sự có mặt của các tế bào *Dunaliella* dưới kính hiển vi Olympus CKX41 dựa trên mô tả hình thái của Borowitzka và Siva (2007).

Bảng 1. Vị trí thu mẫu của 5 chủng *Dunaliella*

Vị trí thu mẫu/ký hiệu chủng	Định vị GPS	
	Bắc (N)	Đông (E)
DA11	20°12'25"	106°23'51"
DA12	20°12'09"	106°24'59"
DA21	20°13'02"	106°25'15"
DA22	20°12'43"	106°24'47"
DA23	20°12'33"	106°24'16"

Sau đó, các mẫu được làm giàu trong bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường với nồng độ NaCl 1,5M, dưới điều kiện chiếu sáng liên tục, cường độ 6000 Lux và 25±2°C. Quá trình sàng lọc chủng thuần được thực hiện

theo phương pháp micropipete và đĩa thạch của Shaish và cộng sự (1991).

Hình thái khuẩn lạc được phân loại dưới kính lúp Carl Zeiss với độ phóng đại 65 lần. Hình dạng và phương thức sinh sản của tế bào vi tảo *Dunaliella* được quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi soi nổi Axio Image A2 ở độ phóng đại 1000 lần.

3.3. Xác định tốc độ sinh trưởng

Phương pháp đếm tế bào được thực hiện bằng buồng đếm Neubauer. Sau 2 ngày nuôi thuần khiết, thu mẫu 1 lần, lắc đều mẫu. Hút 950 μ l mẫu và cố định bằng 50 μ l dung dịch Lugol. Số lượng tế bào được tính toán theo công thức sau:

$$\text{Số lượng tế bào/ml} = \frac{N}{V} \times X$$

Trong đó, N là số lượng tế bào *Dunaliella* trên buồng đếm; V là thể tích buồng đếm; X là hệ số pha loãng.

3.4. Tách chiết carotenoid và β -carotene

Hút 5ml dịch nuôi cấy, ly tâm 3000 vòng trong 15 phút. Bổ sung 5ml acetone 90%. Vortex và mix mẫu cho đến khi mất màu hay chuyển sang màu trắng. Ly tâm 3000 vòng trong 10 phút. Thu phần dịch phía trên và chuyển sang ống Falcon mới. Lặp lại nếu phần mẫu bên dưới chưa mất màu hay chuyển sang màu trắng. Dịch chiết đo mật độ quang ở bước sóng 400-700nm (pha loãng mẫu cần đạt giá trị trong khoảng 0,4-0,9) trên máy quang phổ.

Công thức tính chlorophyll và carotenoid theo Lichtenthaler (1987), β -carotene theo Ben-Amotz và Avron (1983):

Chlorophyll a

$$C_a (\mu\text{g/mL}) = (11.24 \times \text{OD}_{661.5} - 2.04 \times \text{OD}_{645}) \times k$$

Chlorophyll b

$$C_b (\mu\text{g/mL}) = (20.13 \times \text{OD}_{645} - 4.19 \times \text{OD}_{661.5}) \times k$$

Tổng Carotenoid ($\mu\text{g/ml}$)

$$= [(1000 \times \text{OD}_{470} - 1.90 \times C_a - 63.14 \times C_b) / 214] \times k$$

Hàm lượng β -carotene (pg/tb)

$$= (\text{OD}_{480} \times V \times k \times 10) / (2273 * n)$$

Trong đó k là hệ số pha loãng, V là thể tích dịch chiết, n là số lượng tế bào.

3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ

muối

Bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường có bổ sung giống ban đầu với số lượng tế bào 5×10^5 nuôi cấy ở pha log, nhiệt độ 25°C, cường độ chiếu sáng 6000 lux. Nồng độ muối NaCl khác nhau gồm: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 và 4M. Sau 2 ngày thu mẫu 1 lần để phân tích số lượng tế bào, carotenoid và β -carotene cho đến khi kết thúc 20 ngày của chu kỳ nuôi.

3.6. Các phân tích thống kê

Mỗi kết quả được chỉ ra là giá trị trung bình của 3 nghiên cứu lặp lại. Các phân tích thống kê và vẽ đồ thị dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng các chương trình Microsoft Excel. Ý nghĩa thống kê của nghiên cứu được xác định tại độ tin cậy 95% hoặc 99%.

4. Kết quả nghiên cứu

4.1. Phân lập vi tảo *Dunaliella*

Mẫu nước thu thập từ các ruộng muối thuộc xã Giao Phong và Bạch Long, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định được quan sát dưới kính hiển vi Olympus CKX41. Các đặc điểm hình thái học xác định loài *Dunaliella* theo phân loại của Borowitzka và Siva (2007). Vi tảo hình trứng được tách và tinh sạch. Những chủng này có hai roi, chiều dài bằng nhau và thành tế bào mỏng. Theo quan sát, số lượng vi tảo di động trong các mẫu thấp. Trong mẫu quan sát, xuất hiện *Artemia* sp. - một chi của loài giáp xác. Mẫu được nuôi làm giàu trên môi trường Johnson cải tiến, trong suốt quá trình cấy chuyển, không quan sát được các chủng vi tảo khác, điều này chỉ ra rằng nước ruộng muối không đa dạng về thành phần loài. Sau 10 ngày làm giàu, nhận thấy có sự thay đổi màu sắc, từ không màu chuyển dần sang màu xanh lục và vàng.

Các chủng *Dunaliella* được sàng lọc đánh giá trong cùng điều kiện với nồng độ 1,5M NaCl, nhiệt độ phòng, sục khí đều, thời gian chiếu sáng 12:12, cường độ chiếu sáng 6000 lux. Số lượng tế bào giống ban đầu 5×10^5 /ml. Các kết quả được tính theo số lượng tế bào ($\times 10^6$ tế bào/ml) và hàm lượng β -carotene trên mỗi đơn vị tế bào (pg/tế bào). Khả năng sinh tổng hợp β -carotene và số lượng tế bào được phân lập từ 5 mẫu tương ứng với năm chủng *Dunaliella* sơ bộ sau 16 ngày nuôi được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng và tổng hợp β -carotene của 5 chủng *Dunaliella* sp. sau 16 ngày

Chủng	Số lượng tế bào ($\times 10^6$ /ml)	Carotenoid ($\mu\text{g/ml}$)	β -carotene (pg/tb)
DA11	2,46	3,26	2,15
DA12	3,28	5,31	2,58
DA21	1,63	4,32	3,48
DA22	2,75	6,54	4,62
DA23	4,25	8,58	5,19

DA11, DA12: Ruộng muối Giao Phong;

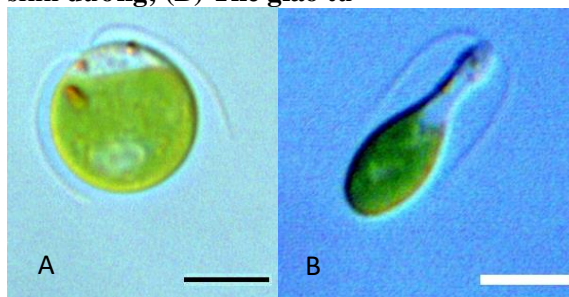
DA21, DA22, DA23: Ruộng muối Bạch Long

Trong các chủng phân lập từ ruộng muối, mẫu DA23 ở Bạch Long có khả năng sinh trưởng nhanh đạt $4,25 \times 10^6$ tế bào/ml, và sinh tổng hợp lượng β -carotene cao nhất trên mỗi tế bào (5,19 pg/tế bào). Do đó, nghiên cứu sử dụng chủng *Dunaliella* sp. DA23 trong các thí nghiệm tiếp theo.

4.2. Đặc điểm hình thái học và phương thức sinh sản của *Dunaliella* sp. DA23

Quan sát dưới kính hiển vi soi nổi Axio Image A2, đặc điểm hình thái của vi tảo *Dunaliella* sp. DA23 cụ thể như sau: dạng đơn bào, sống độc lập và bơi tự do. Điểm mắt màu đỏ rõ nằm ở một phía gần gốc roi, chiều dài tế bào 12,6-16,5 μm , chiều rộng 8,0-10,55 μm . Mỗi tế bào có một khoảng trống hình trứng và được bao bọc bởi lớp màng mỏng. Tế bào có một lục lạp đơn hình chén. Tế bào hình cầu (hình 1a) hoặc kéo dài ra theo hình dạng trong phân chia tạo thể giao tử (hình 1b). Trước và sau khi phân chia tế bào nhị phân, tế bào có hình oval mở rộng (hình bầu dục). Tế bào di động, có hai roi phía trước, roi di chuyển nhịp nhàng, kích thước roi dài gấp 2/3 chiều dài tế bào. Tế bào vi tảo *Dunaliella* sp. DA23 màu xanh và chuyển sang màu vàng xanh ở ngày sinh trưởng thứ mười.

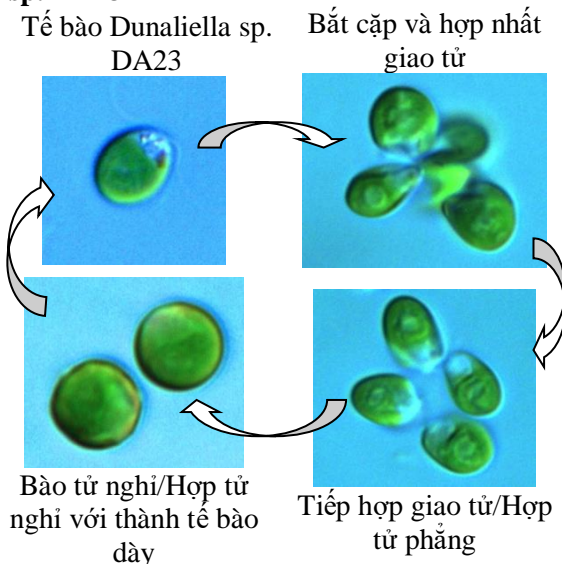
Hình 1. Hình dạng tế bào *Dunaliella* sp. DA23 (thanh kích thước 5 μm) (A) Tế bào sinh dưỡng; (B) Thể giao tử



Dunaliella sinh sản theo hai phương thức:

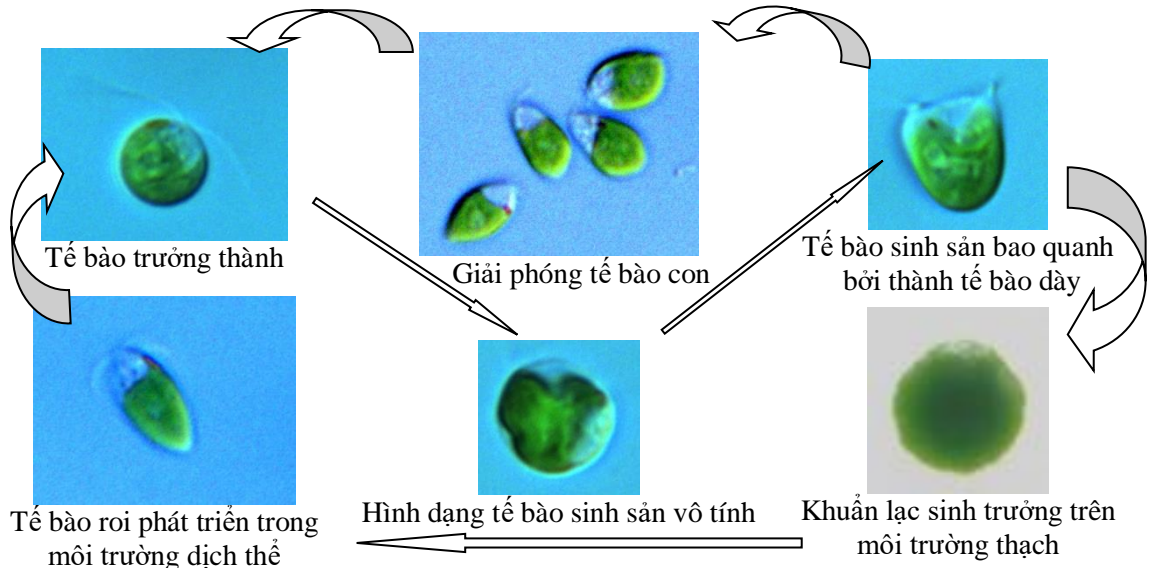
Phương thức sinh sản hữu tính (hình 2): *Dunaliella* sp. DA23 phân chia giảm phân tạo thành các giao tử. Các giao tử tiếp hợp nhờ tiếp xúc roi và tạo cầu nối sinh chất để hình thành hợp tử với lớp màng bao bọc dày. Trong điều kiện môi trường bị pha loãng hoặc nồng độ muối cao, chúng tồn tại dưới dạng hợp tử nghỉ hay còn gọi là bào tử nghỉ. Khi gặp điều kiện thuận lợi, bào tử phân bào tạo thành các tế bào con.

Hình 2. Sinh sản hữu tính của *Dunaliella* sp. DA23



Phương thức sinh sản vô tính (hình 3): tế bào phân đôi thành hai hình thái tương đồng - phân chia nhị phân hình bán cầu. Sau đó phát triển đạt đến dạng hình cầu và giải phóng tế bào con khi màng tế bào bị vỡ. Tế bào con tách ra và phát triển thành các tế bào có kích thước và hình dạng như ban đầu. Trong môi trường thạch, các tế bào phát triển dạng pameloid. Roi được hình thành khi các tế bào sinh trưởng trong môi trường lỏng.

Hình 3. Sinh sản vô tính của Dunaliella sp. DA23



4.3. Ảnh hưởng của nồng độ muối

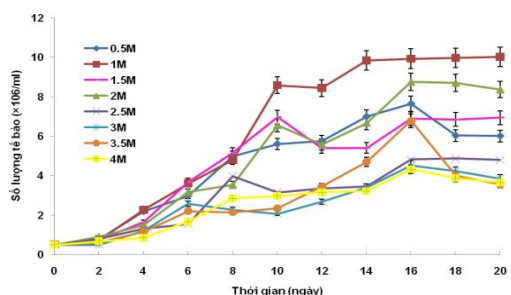
Dunaliella sinh tổng hợp glycerol nội bào như “một dung môi điều hòa” giống hoạt động của một enzyme để duy trì sinh trưởng khi nồng độ muối cao. Glycerol được đào thải khi nồng độ muối của môi trường giảm (Avron, 1992; Craigie và Mc Lachlan, 1964; Shariati và Lilley, 1994). Ảnh hưởng của nồng độ muối lên quá trình sinh trưởng, tích lũy các carotenoid và hàm lượng β -carotene của Dunaliella sp. DA23 được đánh giá tại 8 nồng độ muối NaCl khác nhau (0,5-4M). Thu mẫu phân tích 2 ngày 1 lần cho đến khi kết thúc 20 ngày nuôi.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng độ muối đến quá trình sinh trưởng, tích lũy các carotenoid và hàm lượng β -carotene được trình bày trong hình 4 và 5.

Dunaliella sp. DA23 sinh trưởng tốt trong các môi trường có nồng độ muối NaCl từ 0,5-4M (hình 4). Kết quả thu được có sự tương đồng với chủng Dunaliella của Borowitzka (1988) và Ben-Amotz (1993) (thích nghi tốt với nồng độ muối từ 0,2% cho đến bão hòa, khoảng 35%). Từ ngày nuôi cấy thứ 6, vi tảo Dunaliella sp. DA23 bắt đầu chuyển sang pha tăng trưởng (pha log) tại tất cả các nồng độ muối với số lượng tế bào tăng nhanh gấp 3-7 lần so với ngày bắt đầu nuôi tương ứng với số lượng tế bào $1,67 \times 10^6$ tế bào/ml (NaCl 4M) đến $3,68 \times 10^6$ tế bào/ml (NaCl 1,5M). Với nồng độ muối NaCl 1-2,5M, sau ngày nuôi thứ

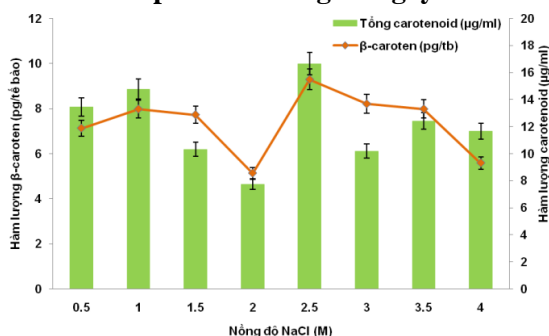
16, số lượng tế bào tiếp tục gia tăng chậm. Ở các nồng độ khác, số lượng tế bào đạt trạng thái cân bằng và có xu hướng giảm dần. Sau ngày thứ 20, tại các nồng độ muối NaCl 1-2,5M, số lượng tế bào tăng giảm không đồng đều. Các thí nghiệm kết thúc tại ngày nuôi cấy thứ 20. Hình 4 thể hiện sự đánh giá tương quan về số lượng tế bào, hàm lượng carotenoid và β -carotene tại các nồng độ muối khác nhau ở ngày nuôi cấy thứ 16. Số lượng tế bào Dunaliella sp. DA23 ở các nồng độ muối khác nhau đạt trong khoảng $6,83-9,93 \times 10^6$ tế bào/ml sẽ cho phép thu được tổng hàm lượng carotenoid tương ứng khoảng 7,72-16,63 μ g/ml và hàm lượng β -carotene khoảng 5,13-9,2pg/tế bào. Chủng Dunaliella sp. DA23 có số lượng tế bào đạt cao nhất tại nồng độ NaCl 1M là $9,93 \times 10^6$ /mL. Hàm lượng carotenoid xác định 2 ngày/lần với nồng độ muối NaCl từ 0,5 tới 4M cũng có sự khác nhau.

Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl (0,5-4M) đến sinh trưởng Dunaliella sp. DA23



Tổng hàm lượng carotenoid trung bình của *Dunaliella* sp. DA23 đạt giá trị cao tại nồng độ muối NaCl 2,5M (16,63 μ g/ml) và NaCl 1M (14,77 μ g/ml). Như vậy, có thể phán đoán nồng độ muối khác nhau của môi trường đã ảnh hưởng tới số lượng tế bào và hàm lượng carotenoid. Hàm lượng β -carotene trên mỗi tế bào tăng khi nồng độ muối NaCl tăng 2,5-3M (hình 5). Hàm lượng β -carotene trung bình cao nhất thu được tại nồng độ muối NaCl 2,5M, giá trị đạt được là 9,2pg/tế bào mặc dù số lượng tế bào tại 16 ngày chỉ đạt 6,83 $\times 10^6$ /ml. Tuy số lượng tế bào đạt cao nhất ở nồng độ NaCl 1M nhưng hàm lượng β -carotene thu được trên mỗi tế bào lại chỉ đạt 7,98 pg chỉ bằng 86% hàm lượng β -carotene thu được trên mỗi tế bào ở môi trường NaCl 2,5M.

Hình 5. Ảnh hưởng nồng độ muối lên tổng hợp carotenoid và β -carotene của *Dunaliella* sp. DA23 trong 16 ngày nuôi



Những kết quả trên cho thấy khả năng sinh trưởng tốt của *Dunaliella* sp. DA23 ở nồng độ muối NaCl > 2M, trùng với những kết quả nghiên cứu của Sze (1993); có khả năng thích ứng ở nồng độ muối cao hơn so với chủng *Dunaliella* sp. NT6 phân lập tại Nha Trang (NaCl 2M) của Nguyễn Thị Thanh Hải (2014) và *Dunaliella* sp. phân lập tại Bình Thuận (NaCl 2M) của Huỳnh Hiệp Hùng và cộng sự (2013). Sze (1993) cho rằng *Dunaliella* thường sinh trưởng tốt ở những vùng thủy triều, hay tập trung nhiều ở ruộng muối khi bị bốc hơi. Nếu nồng độ muối tăng đến mức gần bão hòa (NaCl 3,5M) hàm lượng β -carotene đạt 7,98pg/tế bào, tương ứng với các giá trị đạt được ở nồng độ NaCl 1M. Màu sắc cũng thay đổi rõ rệt: khi nuôi trong môi trường có nồng độ muối NaCl > 2M, *Dunaliella* sẽ xuất hiện màu vàng xanh sau khoảng 10 ngày. Những thay đổi về màu sắc và khả năng chịu nồng độ muối cao là những đặc điểm quan trọng mà

Wong (2000) quan tâm trong phân loại. Wong (2000) cho rằng *Dunaliella* tự điều chỉnh, điều hòa thẩm thấu tốt bằng cách thay đổi nồng độ glycerol nội bào trong quá trình quang hợp để đáp ứng lại áp lực thẩm thấu ngoại bào. Mặc dù vậy, ở môi trường có nồng độ muối cao, tuy số lượng tế bào sinh trưởng thấp nhưng khả năng tích lũy carotenoid và β -carotene trên mỗi tế bào vẫn có thể cao hơn khi nuôi ở môi trường có nồng độ muối thấp. Do vậy, có thể sơ bộ xác định chủng nghiên cứu *Dunaliella* sp. DA23 này là *Dunaliella salina*.

5. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, số lượng tế bào *Dunaliella* sp. DA23 tăng từ 0,5 $\times 10^6$ tới 10,2 $\times 10^6$ /ml tại các nồng độ muối nghiên cứu. Bên cạnh đó, hàm lượng β -carotene trên mỗi tế bào của *Dunaliella* tăng cùng với sự gia tăng của số lượng tế bào sau mỗi 2 ngày nuôi cấy (0,22-9,31 pg/tế bào tại tất cả các nồng độ NaCl thử nghiệm).

Tuy nhiên, khả năng sản xuất trên mỗi đơn vị tế bào tại các nồng độ muối NaCl 2,5-3,5M cao hơn ở các nồng độ muối khác. Hàm lượng carotenoid cao nhất trên mỗi tế bào đạt được tại nồng độ NaCl 2,5M trong 16 ngày nuôi. Những kết quả này phù hợp với những công bố của Ben-Amotz (1991); Gomez và cộng sự (2003) (khả năng sinh tổng hợp carotenoid cũng như số lượng tế bào chịu ảnh hưởng bởi độ muối, đặc biệt tại nồng độ NaCl 2,5M).

Những ảnh hưởng của các nồng độ muối khác nhau đến quá trình sinh trưởng và hàm lượng carotenoid được so sánh theo nồng độ phân tử gam, kết quả chỉ ra rằng tốc độ sinh trưởng của tế bào tại nồng độ NaCl 2,5M (6,83 $\times 10^6$ tế bào/ml) ít hơn đáng kể so với nồng độ NaCl 1M (9,93 $\times 10^6$ tế bào/ml). Mặc dù mật độ tế bào thấp hơn, chủng phân lập này sinh tổng hợp lượng β -carotene tại nồng độ NaCl 2,5M lại cao hơn tại nồng độ NaCl 1M.

6. Kết luận

5 chủng *Dunaliella* sp. phân lập được từ nước của các ruộng muối ở năm vị trí khác nhau thuộc hai xã Giao Phong và Bạch Long có độ muối rất cao (>320g/l). Cả năm chủng đều sinh trưởng và phát triển trên môi trường Johnson cải tiến với số lượng tế bào 1,63 $\times 10^6$ -4,25 $\times 10^6$ /ml sau 16 ngày nuôi cấy, hàm lượng β -carotene tích lũy đạt 2,15-5,19 pg/tế bào. *Dunaliella* sp. DA23 ở ruộng muối Bạch Long

có khả năng sinh trưởng nhanh đạt $4,25 \times 10^6$ tế bào/ml và sinh tổng hợp lượng β -carotene cao nhất trên mỗi tế bào (5,19 pg/tế bào).

Nhận dạng đặc điểm hình thái học của *Dunaliella* sp. DA23 nhận thấy các đặc điểm: đơn bào, sống độc lập và bơi tự do. Điểm mắt màu đỏ rõ nằm ở một phía gần gốc roi, chiều dài tế bào 12,6-16,5 μ m, chiều rộng 8,0-10,55 μ m. Sinh sản theo cả hai phương thức: sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl 0,5-4M đến tốc độ sinh trưởng của *Dunaliella* sp. DA23 cho thấy tốc độ sinh trưởng ở môi trường có nồng độ muối NaCl

1M ($9,93 \times 10^6$ tế bào/ml) cao hơn đáng kể so với môi trường có nồng độ muối NaCl 2,5M ($6,83 \times 10^6$ tế bào/ml), nhưng hàm lượng β -carotene trên mỗi tế bào thu được tại nồng độ NaCl 2,5M (9,2pg/tế bào) lại cao hơn tại nồng độ NaCl 1M (7,98pg/tế bào).

β -carotene có thể được sản xuất từ vi tảo *Dunaliella* sp. phân lập từ ruộng muối huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định. Đây là một nghiên cứu tiền đề quan trọng cho việc lựa chọn các chủng sản xuất β -carotene. Kết quả nghiên cứu mở ra cơ hội thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu để tiến tới hiện thực hoá xây dựng quy trình sản xuất β -carotene tự nhiên.

Tài liệu tham khảo

- Ali H. T. & Mansour S. (2006). Pilot Culture of Three Strains of *Dunaliella salina* for β -Carotene Production in Open Ponds in the Central Region of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (9), pp.1003-1006.
- Avron, M. (1992). Osmoregulation. In *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology* ed. Boca Raton: CRC Press, pp. 135-159.
- Baas-Becking LG. (1931). Salt effects on swarms of *Dunaliella viridis* teod. *J Gen Physiol*. 1931 Jul 20;14(6), pp.765-79.
- Ben-Amotz A., (1991). The Biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene rich alga. *Bioreesource Technology*, 38, pp. 233-235.
- Ben-Amotz, A (2004) *Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products-Major Industrial Species*, Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology Edited by Amos Richmond Copyright.
- Ben-Amotz, A. (1993). Production of β -carotene and Vitamins by The Halotolerant Alga *Dunaliella*. *Marine Biotechnology* Vol 1. pp. 411- 416.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1983). On the Factors Which Determine Massive β -Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*.72, pp.593-597.
- Bhosale, P., Larson, A.J., Bernstein, P.S. (2004). Factorial analysis of tricarboxylic acid cycle intermediates for optimization of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*. *J. Appl. Microbiol*. 96, pp.623-629.
- Borowitzka, M.A. & Siva CJ (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* Chlorophyta, Dunaliellales, with emphasis on the marine and halophilic species. *J. Appl. Phycol*. 19: 567-590.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (1988). *Dunaliella*. In *Micro-algal Biotechnology*, pp. 27-58.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (1990). Commercial Production of β -Carotene by *Dunaliella Salina* in Open Ponds. *Bulletin of Marine Science -Miami-* 47(1), pp. 244-252.
- Celekli, A., Donmez, G. (2006). Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World J. Microb. Biot*. 22, pp. 183-189.
- Chidambara M. K.N. (2005). Production of β -Carotene from Cultured *Dunaliella* sp. And evaluation of Biological Activities, PhD Thesis, University of Mysore, India, December-2005.
- Craigie, J.S., McLachlan, J. (1964). Glycerol as a photosynthetic product in *Dunaliella tertiolecta* Butcher. *Can. J. Bot*. 42, pp.777-778.
- Fazeli, M., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H., Fazeli, A. (2006). Carotenoids

- accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia isolate) and *Dunaliella Salina* (CCAP 19/18 & WT) under stress conditions. *DARU* 14, pp.3.
- Fisher M., Gokhman I., Pick U., Zamir A. (1997). A structurally novel trans ferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *J Biol Chem* 1997, 272, pp.1565-1570.
- Foote, C.S., Denny, R.W., Weaver, L., Chang, Y., Peters, J. (1970). Quenching of singlet oxygen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 171, pp.139.
- Gomez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S., Gonzalez, M.A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861). *Chlorophyta. Biol. Res.* 36(2), pp.185-192.
- Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M. (2008) *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, pp.1364-5072.
- Hung H. H., Loan L. T. T., Lan N. T. M., Phuoc L. T. M., Hồ P. T., (2013). Khảo sát hàm lượng Beta-carotene của chủng vi khuẩn *Dunaliella* phân lập ở Việt Nam”, *Tap chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, T. 16, S. 1T, pp.43-50.
- Lerche W (1937). Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch f Protistenkd* 1937,88, pp. 236-268.
- Lichtenthaler (1987). Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology* Eds. SP Colowick and NO Kaplan, pp.350-382.
- Liska A.J., Shevchenko A., Pick U., Katz A. (2004). Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol*, 136, pp.2806-2817.
- Naseem Z., Alim-un-Nisa, Farah A., Sehrish M. M., Imran K., Sajila H., Ali J., Syed M. I. (2016) Comparative Study of Beta Carotene Determination by various Methods: A Review. *Bio Bulletin* (1), pp.96-106.
- Nishino, H., Murakosh, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Mou, X.Y., Wada, S. (2002). Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21, pp.257-264.
- Oren A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005”. *Saline Syst* 1, 2.
- Prasad, K.N., Kumar, A., Kochupillai, V., Cole, W.C. (1999). High doses of multiple antioxidant vitamins: Essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. *J. Am. Coll. Nutr.* 18, pp.13-25.
- Shaish, A., Ben-Amotz, A., Avron, M. (1991). Production and selection of high β -carotene mutants of *D. bardawil* (chlorophyta). *J. Phycol.* 27, pp.652-656.
- Shariati, M., Lilley, R. McC. (1994). Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes”. *Plant Cell Environ* 17, pp.1295–1304.
- Sze, P. (1993). A Biology of the Algae. *Second Ed. Wm.C. Brown Publ.* 1, 81p.
- Thanh N. T. H., N Nghia. D. (2014). Phân lập vi khuẩn *Dunaliella salina* NT6 tại Khánh Hòa và nghiên cứu các điều kiện sinh trưởng và tổng hợp β -caroten của nó. *Tap chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 1, pp. 218-228.
- Wong, V., Liu X., Bidigare R. (2000). Dependence of Carotenoid Production on Salinity in *Dunaliella salina*. *MarBEC Summer Undergraduate Research Fellowship*, pp.1–14.

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ MUỐI LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ TỔNG HỢP BETA-CAROTENE CỦA VI TẢO DUNALIELLA PHÂN LẬP TỪ RUỘNG MUỐI TỈNH NAM ĐỊNH

Phạm Thị Bích Đào

Trường Đại học Thành Đô
Email: ptbdao@thanhdouni.edu.vn

Ngày nhận bài: 17/12/2022

Ngày phản biện: 20/12/2022

Ngày tác giả sửa: 25/12/2022

Ngày duyệt đăng: 30/12/2022

DOI: <https://doi.org/10.58902/tcnckhpt.v1i2.22>

Tóm tắt:

Nam Định là một trong những vùng muối siêu mặn lớn nhất miền Bắc, có độ muối thay đổi theo thời gian. *Dunaliella* là vi tảo lục ưa mặn thường được tìm thấy trong nước tại những khu vực nhiễm mặn, được biết tới rộng rãi bởi hoạt tính chống oxy hóa, khả năng tạo ra một lượng lớn các carotenoid và tổng hợp β -carotene. Trong nghiên cứu này, các chủng *Dunaliella* được phân lập từ nước của các ruộng muối có độ muối rất cao, sau đó được nuôi cấy trong môi trường Johnson cải tiến và được xử lý tại tám nồng độ muối khác nhau (0,5-4M NaCl) để nghiên cứu tốc độ sinh trưởng và khả năng tổng hợp β -carotene. Để xác định độ muối tối ưu cho quá trình tích lũy β -carotene và số lượng tế bào các chủng phân lập *Dunaliella*, hàm lượng carotenoid và β -carotene được xác định bằng phương pháp đếm tế bào trực tiếp dưới kính hiển vi và quang phổ. Trong các mẫu với nồng độ muối khác nhau, số lượng tế bào và hàm lượng β -carotene của *Dunaliella* sp. DA23 tương ứng nằm trong khoảng $6,83-10,02 \times 10^6$ tế bào/mL và $5,13-9,31$ pg/tế bào. Trong chu kỳ 16 ngày của các thí nghiệm, số lượng tế bào cao nhất là $9,93 \times 10^6$ tế bào/mL, thu được ở mẫu có nồng độ muối 1M NaCl; hàm lượng β -carotene cao nhất là $9,2$ pg/tế bào, thu được ở mẫu có nồng độ muối 2,5M NaCl.

Từ khóa: Carotenoid; *Dunaliella*; NaCl; Nam Định; β -carotene.