

HÀM LƯỢNG FUCOXANTHIN CỦA NĂM CHỪNG TẢO SILIC ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ

Nguyễn Văn Duy¹, Nguyễn Văn Tú¹, Lê Đình Long², Nguyễn Đức Hưng^{1*}

¹ Trường Đại học Sài Gòn

² Ban quản lý Rừng phòng hộ Cần Giờ

TÓM TẮT

Fucoxanthin là sắc tố thuộc nhóm carotenoid hiện diện trong nhiều chủng tảo silic. Loại sắc tố này được xem là một nguồn chất tự nhiên có khả năng chống oxy hóa mạnh. Nghiên cứu này đã khảo sát đặc điểm hình thái của năm chủng tảo silic được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ. Đường cong tăng trưởng và sinh khối khô của mỗi chủng tảo được xác định để làm cơ sở sàng lọc hàm lượng fucoxanthin bằng phương pháp quang phổ. Hàm lượng fucoxanthin trong các chủng tảo silic này dao động trong khoảng 0,23 - 3,49 mg/L, trong đó chủng *Nitzschia* sp1. có giá trị trung bình cao nhất là 3 mg/L. Chủng *Nitzschia* sp1. được đánh giá là một đối tượng tiềm năng trong công nghệ sinh học về vi tảo theo hướng sản xuất fucoxanthin.

Từ khóa: Fucoxanthin, *Nitzschia*, rừng ngập mặn Cần Giờ, tảo silic.

MỞ ĐẦU

Tảo silic (Bacillariophyceae) đóng góp phần lớn vào năng suất sơ cấp của vùng biển và chiếm khoảng 25% tổng lượng cacbon được cố định trên Trái đất (Leblanc *et al.*, 2012). Tảo silic còn là đối tượng nghiên cứu làm nguồn cung cấp thức ăn trong nuôi trồng thủy sản và nhiên liệu sinh học (Merz, Main, 2014). Hiện nay, tảo silic còn được ứng dụng trong công nghệ nano (Jamali *et al.*, 2012) và công nghệ mỹ phẩm (Gügi *et al.*, 2015). Nghiên cứu sàng lọc và ứng dụng các chủng vi tảo silic phù hợp cho các mục đích công nghệ sinh học về vi tảo là rất cần thiết.

Fucoxanthin là một loại sắc tố thu nhận ánh sáng, có trong lục lạp của các sinh vật nhân thực, bao gồm cả tảo nâu (Phaeophyceae), và trong các loài vi tảo đơn bào như tảo silic (Peng *et al.*, 2011). Gần đây vai trò của loại sắc tố này được chú ý quan tâm vì có các đặc tính chống oxy hóa mạnh, tác động chống ung thư, chống béo phì (Guo *et al.*, 2016; Abu-Ghannam, Shannon, 2017). Vì vậy, fucoxanthin có thể được xem như là một loại “thuốc từ biển” có tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh y dược và chăm sóc sức khỏe. Tảo silic có nhiều ưu điểm vượt trội về khả năng tăng trưởng cũng như hàm lượng fucoxanthin cao hơn so với tảo nâu nên nhóm vi tảo này đang được ưu tiên sàng lọc để tuyển chọn những chủng có thể ứng dụng trong sản xuất fucoxanthin với quy mô lớn (Xia *et al.*, 2013). Nguồn giống tảo silic thích nghi với điều kiện địa phương và có khả năng cung cấp năng suất sinh khối cao luôn là những lợi thế đặc biệt trong phát triển công nghệ sinh học về vi tảo. Vì vậy, nghiên cứu phân lập và sàng lọc các chủng tảo silic có hàm lượng fucoxanthin cao từ môi trường rừng ngập mặn Cần Giờ được thực hiện.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập và phân tích hình thái tế bào

Một số điểm thu mẫu thuộc phạm vi vùng lõi của rừng phòng hộ Cần Giờ như sông Dàn Xây, sông Lò Voi. Mẫu tảo dạng trôi nổi được thu nhận bằng lưới phiêu sinh với mắt lưới 20 µm khi triều cao, mẫu tảo dạng sống bám và sống đáy được thu bằng cách chải và rửa các rễ cây, hoặc thu lớp bùn mỏng trên bề mặt lúc triều thấp. Các mẫu được lưu giữ trong chai nhựa, trong điều kiện ánh sáng tự nhiên và đưa về phòng thí nghiệm trong ngày. Phân lập các chủng vi tảo silic theo phương pháp tế bào đơn bằng pipet Pasteur. Phân tích các đặc điểm hình thái của tế bào sống dưới kính hiển vi quang học (Model BB1125, Euromex - Hà Lan) và dựa vào hình ảnh SEM (Scanning Electron Microscopy) của cấu trúc mảnh vỏ. Để chụp ảnh SEM, các mảnh vỏ của tảo silic được tiến hành rửa bằng HCl 10% và H₂O₂ 3%, ủ mẫu trong 12 giờ, sau đó đun sôi cho đến khi dung dịch không còn màu. Mẫu tiếp tục được rửa lại bằng nước cất tối thiểu là 6 lần, để khô ở nhiệt độ phòng sau đó tiến hành chụp ảnh SEM (Karthick *et al.*, 2010) theo dịch vụ tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (01 Mạc Đĩnh Chi, Q1, TP. HCM). Định loại tảo silic ngoài việc dựa vào hình dạng, kích thước thì xem xét các cấu trúc đặc biệt trên mảnh vỏ như rãnh, cấu trúc lỗ, cấu trúc ống đặc trưng và số vân/10µm (Round *et al.*, 1990). Các phép đo kích thước và số vân/10µm dựa vào ảnh SEM và được thực hiện bằng phần mềm ImageJ phiên bản 1.52 a.

Điều kiện nuôi cấy và khảo sát đường cong tăng trưởng

Các chủng tảo sau khi phân lập thành các dòng thuần sẽ được nuôi cấy trong điều kiện có kiểm soát (nhiệt độ 24 ± 1°C, chu kì sáng tối 12:12, cường độ ánh sáng đèn huỳnh quang trong khoảng 1000 - 1200 lux) tại phòng

nuôi tảo của Khu thí nghiệm thực hành Sinh - Hóa - Môi trường, Trường Đại học Sài Gòn. Môi trường dùng để nuôi tảo silic là nước biển tự nhiên có bổ sung các thành phần khoáng và vitamin theo công thức F/2 (Guillard, 1975), pH môi trường khoảng 7.4 - 8.3, độ mặn trung bình 25 - 30 ‰. Các chủng tảo silic được nuôi cấy theo hình thức nuôi cấy mẻ (Batch) trong các bình tam giác 250 mL không sục khí, lượng môi trường F/2 sử dụng để nuôi cấy là 150 mL. Sử dụng buồng đếm hồng cầu Neubauer cải tiến và kính hiển vi quang học để xác định mật độ tế bào (tế bào/mL) mỗi ngày trong quá trình tăng trưởng của các chủng tảo. Đường cong tăng trưởng được xây dựng dựa vào mối quan hệ giữa mật độ (tế bào/mL) và thời gian tăng trưởng (ngày). Sinh khối khô của mỗi chủng tảo ở cuối pha lũy thừa được xác định bằng cách lọc 10 mL dịch tảo qua giấy lọc (Whatman GF/F, đường kính 47 mm, kích thước lỗ 0,7 µm). Làm khô giấy lọc có vi tảo ở 95°C đến khối lượng không đổi, làm mát trong bình hút ẩm chân không. Cân lại giấy lọc và xác định trọng lượng khô (g/L).

Xác định hàm lượng fucoxanthin

Dựa vào đường cong tăng trưởng đặc trưng của mỗi chủng vi tảo silic để xác định thời điểm thu nhận sinh khối phù hợp cho việc khảo sát hàm lượng fucoxanthin, tốt nhất là khi đạt mật độ tối đa hay cuối pha lũy thừa. Hàm lượng fucoxanthin trong các chủng vi tảo silic được xác định bằng phương pháp quang phổ. Phương pháp đo quang phổ này có thể được áp dụng cho các tảo silic, với sai số chuẩn là 3-14,6% khi so sánh với kết quả theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và được xem là một phương pháp sàng lọc hiệu quả các chủng vi tảo silic có tiềm năng sản xuất fucoxanthin (Wang *et al.* 2018a). Hàm lượng fucoxanthin được tính theo công thức như sau:

$$C_{fuc} = 6,39 \times A_{445} - 5,18 \times A_{663} + 0,312 \times A_{750} - 5,27$$

Trong đó: C_{fuc} : hàm lượng fucoxanthin (mg/L), A: độ hấp thụ quang ở bước sóng tương ứng.

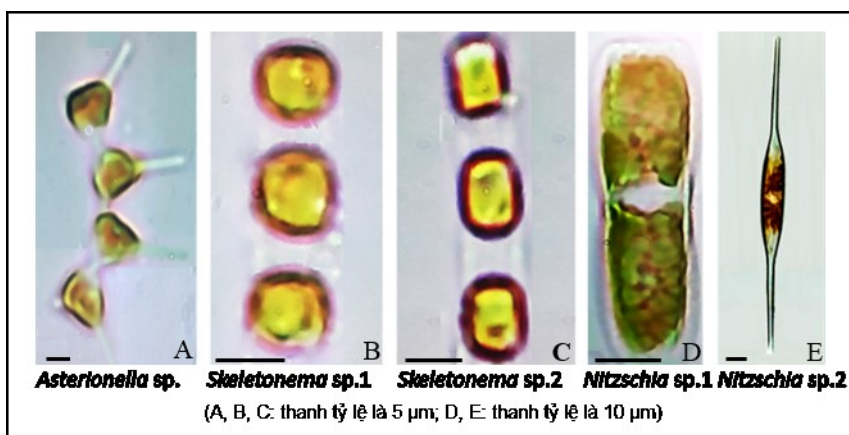
Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn được tính bằng Microsoft Excel 2013. Ngôn ngữ thống kê R (phiên bản 3.5.2) được sử dụng để kiểm định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hàm lượng fucoxanthin giữa các chủng tảo silic với các chữ cái thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

KẾT QUẢ

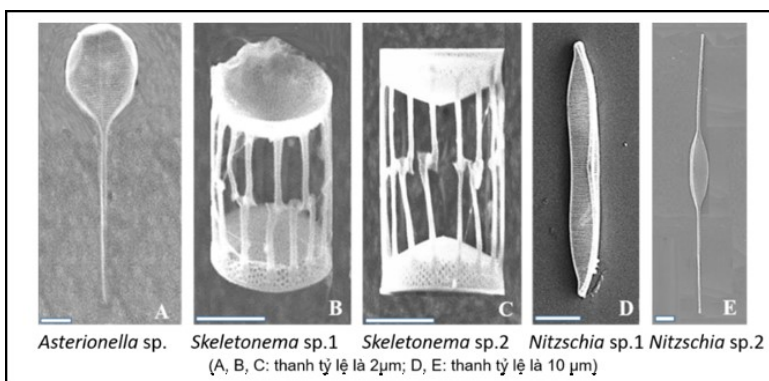
Đặc điểm hình thái của 5 chủng tảo silic

Sau quá trình phân lập, chúng tôi thu nhận được 3 chủng tảo silic thuần sống dạng sống trôi nổi, không có khả năng di chuyển, tế bào dính với nhau thành dạng tập đoàn: dạng sợi xoắn là *Asterionella* sp., và dạng sợi thẳng là *Skeletonema* sp.1 và *Skeletonema* sp.2. Ngoài ra còn phân lập được thêm 2 chủng tảo silic thuộc dạng sống đáy, có khả năng di chuyển và các tế bào ở dạng đơn lẻ tách rời nhau là *Nitzschia* sp.1 và *Nitzschia* sp.2 (Hình 1).



Hình 1. Ảnh dưới kính hiển vi quang học (400X) của 5 chủng tảo silic

Dựa vào ảnh SEM của các mảnh vỏ đã loại bỏ chất hữu cơ (Hình 2), các đặc điểm đặc hình thái đặc trưng của mỗi chủng được thể hiện trong Bảng 1. Những đặc điểm hình thái này khẳng định đây là 5 chủng tảo silic khác nhau. Tuy nhiên, cần phải phân tích thêm một số thông tin di truyền để có thể định danh chính xác lên loài của các chủng này.



Hình 2. Ảnh SEM cấu trúc vỏ của 5 chủng tảo silic

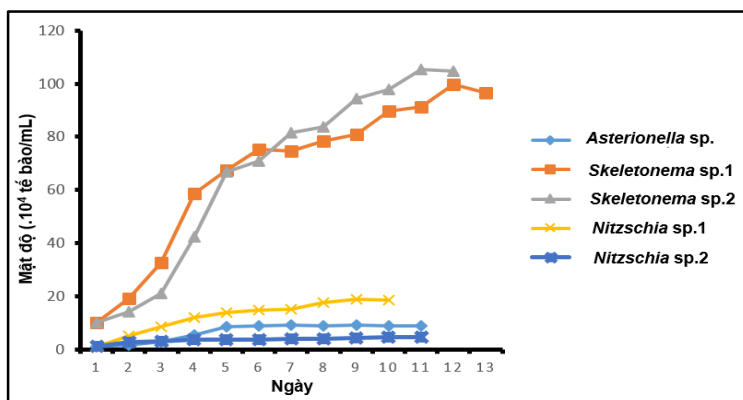
Các nghiên cứu về chi *Asterionella* thường tập trung vào khả năng kháng khuẩn của một số loài trong chi này chẳng hạn như loài *A. japonica*. Nhiều loài *Skeletonema* được nghiên cứu và sử dụng trong nuôi trồng các loài hai mảnh vỏ, việc sử dụng tảo này trong sàng lọc fucoxanthin còn ít được biết đến. Ngược lại, gần đây các chủng *Nitzschia* sp. được coi là một đối tượng tiềm năng phù hợp cho sản xuất fucoxanthin và dầu sinh học (Sahin *et al.*, 2019 ; Lu *et al.*, 2019).

Bảng 1. Một số đặc điểm hình thái cơ bản của năm chủng tảo silic

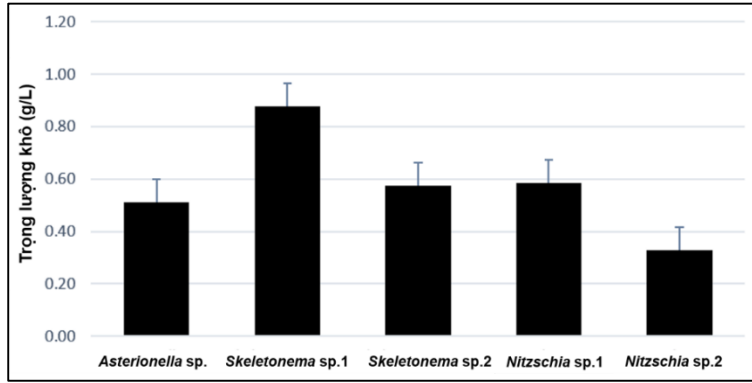
Chủng	Dài (µm)	Rộng (µm)	Số vân/10µm	Số lỗ/10µm	Di chuyển
<i>Asterionella</i> sp.	18 - 20	4,6 - 5	50	-	không
<i>Skeletonema</i> sp.1	-	4,4 - 6,5	-	40	không
<i>Skeletonema</i> sp.2	-	4,9 - 5,7	-	60	không
<i>Nitzschia</i> sp.1	41 - 42	3,1 - 3,8	34 - 36	-	có
<i>Nitzschia</i> sp.2	156 - 158	4,8 - 7,6	40	-	có

Đường cong tăng trưởng và sinh khối khô

Đối với ba chủng *Asterionella* sp., *Nitzschia* sp.1 và *Nitzschia* sp.2 Với, mật độ xuất phát ban đầu của là 10^4 (tế bào/mL). Tuy nhiên, đối với chủng *Skeletonema* sp.1 và *Skeletonema* sp.2, do có kích thước tế bào rất nhỏ nên để đảm bảo đủ lượng sinh khối phù hợp để phân tích fucoxanthin, mật độ xuất phát ban đầu phù hợp là 10^5 (tế bào/mL). Dựa theo mật độ tế bào, chủng có mật độ cao nhất là *Skeletonema* sp.2 với 105,41 ($\cdot 10^4$ tế bào/mL) vào ngày thứ 11, chủng có mật độ thấp nhất là *Nitzschia* sp.2 đạt 4,52 ($\cdot 10^4$ tế bào/mL) ngày thứ 9. Ba chủng còn lại có mật tối đa lần lượt là *Asterionella* sp. là 8,99 ($\cdot 10^4$ tế bào/mL) vào ngày thứ 6, *Skeletonema* sp.1 là 99,63 ($\cdot 10^4$ tế bào/mL) và ngày thứ ngày 11 và *Nitzschia* sp.1 là 18,72 ($\cdot 10^4$ tế bào/mL) ngày thứ 9 (Hình 3). Lượng sinh khối trong đơn vị thể tích cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng fucoxanthin, với sự điều chỉnh mật độ ban đầu của nhóm *Skeletonema* là 10^5 (tế bào/mL) nhằm hạn chế sự khác biệt đáng kể về sinh khối giữa các nhóm tảo *Asterionella*, *Skeletonema*, và *Nitzschia*. Kết quả hàm lượng sinh khối khô của các chủng vi tảo dao động trong khoảng từ 0,24 đến 1,22 (g/L), trong đó *Skeletonema* sp.1 có sinh khối trung bình cao nhất là 0,87 (g/L) và *Nitzschia* sp.2 có sinh khối trung bình thấp nhất 0,33 (g/L) (Hình 4). Hàm lượng sinh khối khô trung bình của mỗi chủng tảo ở thời điểm đạt mật độ cao nhất đảm bảo điều kiện để có thể khảo sát hàm lượng fucoxanthin theo phương pháp đo quang phổ (Wang *et al.*, 2018).



Hình 3. Đường cong tăng trưởng của năm chủng tảo silic

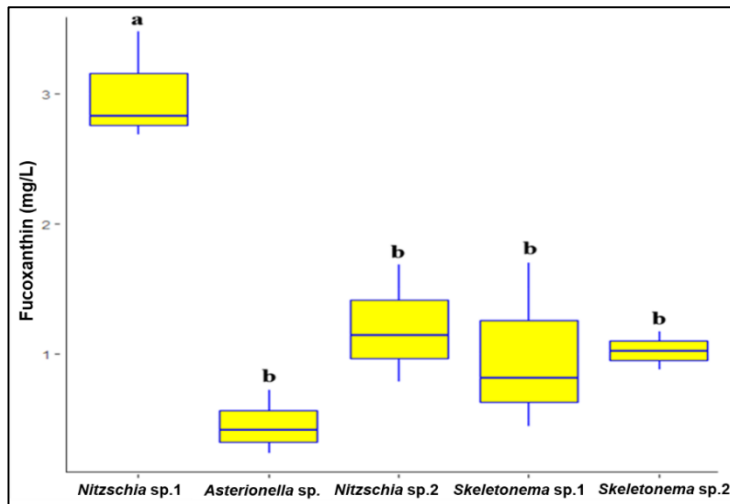


Hình 4. Hàm lượng sinh khối khô của năm chủng tảo silic

Trong nghiên cứu này, thời điểm thu nhận sinh khối để khảo sát hàm lượng fucoxanthin là khi mật độ cao nhất hay cuối pha lũy thừa của từng chủng tảo riêng lẻ. Tuy nhiên, ở những pha tăng trưởng khác nhau, tế bào của mỗi chủng có thể khác nhau về kích thước, thành phần tế bào, thành phần sắc tố kể cả hàm lượng fucoxanthin. Ở loài tảo silic *Chaetoceros muelleri*, tùy thuộc vào giai đoạn tăng trưởng mà hàm lượng fucoxanthin có thể dao động trong khoảng 2,2 - 9,24 mg/L (Wang *et al.*, 2018). Do đó, sự tích lũy fucoxanthin của các chủng tảo silic trong nghiên cứu này cần được nghiên cứu đầy đủ hơn, có thể là giữa pha lũy thừa, cuối pha lũy thừa và giữa pha cân bằng trong trình tăng trưởng của từng chủng tảo riêng lẻ.

Hàm lượng fucoxanthin

Hàm lượng fucoxanthin của năm chủng tảo silic phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ dao động trong khoảng 0,23 - 3,49 mg/L, trong đó chủng *Nitzschia* sp.1 có hàm lượng trung bình cao nhất là 3 mg/L và chủng *Asterionella* sp. có hàm lượng trung bình thấp nhất là 0,46 mg/L (Hình 5), sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê. Sự tích lũy fucoxanthin phụ thuộc vào nhiều điều kiện nuôi cấy khác nhau. Nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện ánh sáng có khả năng tạo ra năng suất fucoxanthin tối đa ở loài tảo silic *Cylindrothyca closterium* (Wang *et al.*, 2018) hoặc khi nuôi cấy *Nitzschia* sp. trong điều kiện dinh dưỡng khác nhau như môi trường F/2 giàu nitrogen và môi trường F/2 giàu sắt đều có thể tăng cường sự tích lũy hàm lượng fucoxanthin (Sahin *et al.*, 2019). Điều này cho thấy chủng *Nitzschia* sp.1 trong nghiên cứu này có thể được coi là một đối tượng nghiên cứu tiềm năng trong nghệ sinh học về vi tảo theo hướng sản xuất fucoxanthin bằng cách cải thiện các biện pháp kỹ thuật, điều kiện nuôi cấy khác nhau.



Hình 5. Hàm lượng fucoxanthin của 5 chủng tảo silic

KẾT LUẬN

Năm chủng tảo silic đã được phân lập, giữ giống và pha tăng trưởng sinh trưởng tốt trong môi trường F/2 ở điều kiện phòng thí nghiệm. Những đặc điểm hình thái này khẳng định đây là 5 chủng tảo silic khác nhau. Đường cong tăng trưởng và sinh khối khô của năm chủng tảo được xác định để làm cơ sở phù hợp cho việc khảo sát hàm lượng fucoxanthin bằng phương pháp quang phổ. Kết quả bước đầu sàng lọc hàm lượng fucoxanthin của năm chủng tảo silic phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ dao động trong khoảng 0,23 - 3,49 mg/L, trong đó

chủng *Nitzschia* sp.1 có hàm lượng trung bình cao nhất là 3 mg/L. Trong năm chủng này, *Nitzschia* sp.1 là chủng được lựa chọn phù hợp cho nhiều nghiên cứu sâu hơn về công nghệ sinh học vi tảo, đặc biệt có tiềm năng ứng dụng sản xuất fucoxanthin. Do có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tích lũy fucoxanthin của tảo silic, vì vậy cần tiếp tục nghiên cứu những biện pháp kỹ thuật để tăng cường khả năng tích lũy fucoxanthin của *Nitzschia* sp.1 trong quá trình sinh trưởng của các chủng tảo silic này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ đề tài cơ sở mã số: CS2019 - 11 của Trường Đại học Sài Gòn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abu-Ghannam N, Shannon E (2017). Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as functional food. In Gupta VK, Treichel H, Shapaval VO, Antonio de Oliveira L, Tuohy M G (Eds.), *Microb Func Food Nutraceut* (pp. 39-64). John Wiley & Sons, Ltd.
- Gügi B, Le Costaouec T, Burel C, Lerouge P, Helbert W, Bardor M (2015). Diatom-Specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. *Marine Drugs* 13(9): 5993-6018.
- Guillard RR (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals* (pp. 29-60). Springer.
- Guo B, Liu B, Yang B, Sun P, Lu X, Liu J, Chen F (2016). Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer. *Marine Drugs* 14(7).
- Jamali AA, Akbari F, Ghoraklu MM, de la Guardia M, Yari Khosroushahi A (2012). Applications of diatoms as potential microalgae in nanobiotechnology. *BiolImpacts: BI* 2(2): 83-89.
- Karthick B, Taylor JC, Mahesh MK, Ramachandra TV (2010). Protocols for collection, preservation and enumeration of diatoms from Aquatic Habitats for Water Quality Monitoring in India. *IUP J Soil Water Sci* 3(1): 25-60.
- Leblanc K, Arístegui J, Assmy P, Beker B, Bode A, Breton E, Cornet V, Gibson J, Gosselin M-P, Kopczynska E, Marshall H, Peloquin J, Piontkovski S, Poulton AJ, Quéguiner B, Schiebel R, Shipe R, Stefels J, ... Yallop M (2012). A global diatom database – abundance, biovolume and biomass in the world ocean. *Earth Syst Sci Data* 4(1): 149-165.
- Lu X, Liu B, He Y, Guo B, Sun H, Chen F (2019). Novel insights into mixotrophic cultivation of *Nitzschia laevis* for co-production of fucoxanthin and eicosapentaenoic acid. *Biores Technol* 294: 122-145.
- Merz C, Main K (2014). Microalgae (diatom) production-The aquaculture and biofuel nexus. *2014 Oceans - St. John's*, St. John's, NL, pp.1-10.
- Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs* 9(10): 1806-1828.
- Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990). *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press.
- Sahin MS., Khazi MI, Demirel Z, Dalay MC (2019). Variation in growth, fucoxanthin, fatty acids profile and lipid content of marine diatoms *Nitzschia* sp. and *Nanofrustulum shiloi* in response to nitrogen and iron. *Biocat Agri Biotechnol* 17: 390-398.
- Wang LJ, Fan Y, Parsons RL, Hu GR, Zhang PY, Li FL (2018). A Rapid Method for the Determination of fucoxanthin in diatom. *Marine Drugs* 16(1): 33.
- Wang S, Verma SK, Hakeem Said I, Thomsen L, Ullrich MS, Kuhnert N (2018). Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light. *Microb Cell Fact* 17(1): 110.
- Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q, Zhang C (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs* 11(7): 2667-2681.

CONTENT OF FUCOXANTHIN IN FIVE DIATOM STRAINS ISOLATED FROM CAN GIO MANGROVE

Nguyen Van Duy¹, Nguyen Van Tu¹, Le Dinh Long², Nguyen Duc Hung^{1*}

¹ Saigon University

² Management board of Can Gio Mangrove Biosphere Reserve

SUMMARY

Fucoxanthin is a pigment belonging to the carotenoid that presents in many diatom strains. This pigment is considered a natural product with a strong antioxidant capacity. This study investigated the morphological characteristics of five diatom strains isolated from Can Gio mangrove. Growth curve and dry biomass of each strain were determined as a basis for screening the content of fucoxanthin by spectrophotometric method. The content of fucoxanthin in these strains ranged from 0.23 to 3.49 mg/L, of which strain *Nitzschia* sp1. has the highest average value of 3 mg/L. *Nitzschia* sp1. strain is assessed as a potential model in microalgae biotechnology towards fucoxanthin production.

Keywords: Fucoxanthin, *Nitzschia*, Can Gio mangrove, diatom.

* Corresponding author: Tel: +84-977077897; Email: duchung@sgu.edu.vn