



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0004046

(51) **C12N 1/12**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00555

(22) 27/09/2023

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/04/2024 433

(71) Công ty TNHH Tư vấn, Thương mại và Dịch vụ Khoa học Kỹ thuật Transmed (VN)
Tầng 3 Tòa Nhà Sapphire Palace, Số 4 Chính Kinh, Phường Thượng Đình, Quận
Thanh Xuân, Thành Phố Hà Nội

(72) Vũ Hồng Minh (VN); Đặng Diễm Hồng (VN); Lê Thị Thơm (VN); Nguyễn Cẩm Hà
(VN).

(54) **CHỦNG VI TẢO BIẾN DỊ DƯỠNG AURANTIOCHYTRIUM MANGROVEI KG
145 ĐƯỢC PHÂN LẬP CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT POLYSACARIT NGOẠI
BÀO VÀ AXIT BÉO KHÔNG BẢO HÒA ĐA NÓI ĐÔI**

(21) 2-2023-00555

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập, trong đó chủng này có trình tự 18S rARN nêu trong SEQ ID NO.1, có khả năng sản xuất polysacarit ngoại bào (EPS), axit béo không bão hòa đa nối đôi như DHA, EPA, DPA đồng thời có khả năng sinh tổng hợp squalen, carotenoit và axtasanthin hiệu quả. Chủng vi tảo theo sáng chế thích hợp nuôi cấy thu sinh khối ứng dụng làm thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, dược phẩm, nhiên liệu sinh học cũng như thức ăn bổ sung cho động vật nuôi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập có khả năng sản xuất polysacarit ngoại bào (EPS) và axit béo không bão hòa đa nối đôi như DHA, EPA, DPA đồng thời còn có khả năng tổng hợp squalen và carotenoid để phát triển làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người, mỹ phẩm, dược phẩm, nhiên liệu sinh học và thức ăn cho động vật nuôi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, dầu cá là nguồn cung cấp axit béo docosahexaenoic (DHA, C22:6, n-3) chính cho các ứng dụng thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, nhưng nguồn cá tự nhiên ngày càng bị hạn chế (Naylor RL et al., Feeding aquaculture in an era of finite resources. *PNAS*. 106: 15103-15110). Sự gia tăng dân số, nhu cầu về thức ăn nuôi trồng thủy sản ngày càng tăng và nguồn cung từ đánh bắt thủy sản quá mức đã thúc đẩy tìm kiếm các nguồn cung cấp DHA mới để thu hẹp khoảng cách giữa cung và cầu về các axit béo không bão hòa đa nối đôi (Polyunsaturated fatty acids - PUFA) này (Tocher DR et al., Betancor MB, Sprague M, Olsen RE, Napier JA (2019) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: Bridging the gap between supply and demand. *Nutrients*. 11: 1-20, 2019). Chính vì vậy, việc tìm kiếm nguồn sinh vật có khả năng tổng hợp DHA cao thay thế nguồn dầu cá là vấn đề đã được đặt ra cần phải giải quyết từ vài thập kỷ nay. Gần đây, vi tảo biển dị dưỡng được xem là đối tượng rất tiềm năng cho việc thay thế dầu cá trong việc cung cấp các n-3 PUFAs (Aasen et al., Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalen, and carotenoids. *Applied microbiology and biotechnology*. 100(10): 4309-4221, 2016; Marchan LF et al., Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: a review. *Biotechnol. Adv.* 36:26–46, 2018). Việc sản xuất ω -3 PUFAs từ đối tượng này so với các loài vi tảo biển quang tự dưỡng truyền thống khác có nhiều thuận lợi hơn: có thể duy trì các điều kiện nuôi trồng tối ưu và giảm tạp nhiễm, quá trình sản xuất có thể kéo dài quanh năm, không phụ thuộc mùa vụ hay khí hậu; có thể dễ dàng

kiểm soát được các điều kiện nuôi trồng, đảm bảo được chất lượng sản phẩm theo mong muốn, mật độ tế bào (MĐTB) tảo cao (Bumbak et al., Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*. 91(1): 31-46, 2011). Sinh khối *Aurantiochytrium* sp. chứa tới 50 ~ 77% lipid, trong đó 30 - 70% là DHA (Huang TY et al., A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22: 6 proportions in total fatty acid. *Bioresource technology*. 123:8-14; Li J et al., A strategy for the highly efficient production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 using glucose and glycerol as the mixed carbon sources. *Bioresour. Technol.* 177: 51-57), 25% carbohydrat và 10% protein (Ramos-Vega A et al., Prospects on the use of *Schizochytrium* sp. to develop oral vaccines. *Front Microbiol.* 9:02506) và terpenoit bao gồm astaxanthin, phoenicoxanthin, canthaxanthin và β -carotene (Xie et al., Mining terpenoids production and biosynthetic pathway in thraustochytrids. *Bioresource Technol.* 244:1269–1280). Ngoài ra, chúng còn có thành phần axit béo đơn giản chủ yếu bao gồm axit myristic, axit palmitic, DHA và axit docosapentaenoic (DPA, C22:5, ω -6) (Jiang Y et al., Fatty acid composition and squalen content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1196-1200). Hiện nay, *Aurantiochytrium* sp. đã được người tiêu dùng đón nhận như một nguồn bổ sung DHA tự nhiên, đặc biệt là thuần chay (Ratledge C, Omega-3 biotechnology: errors and omissions. *Biotechnol Adv.* 30:1746–1747, 2012) và trở thành sản phẩm thương mại lớn nhất cung cấp DHA từ vi sinh vật do được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp thuận (Subhash GV et al., Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. *Bioresource Technol.* 244:1304–1316, 2017).

Bên cạnh các chi vi tảo có thể nuôi theo phương thức dị dưỡng như *Cryptothecodinium*, *Nitzschia*, còn có nhóm vi tảo biển dị dưỡng thuộc ngành Labyrinthulomycota (Đặng Diễm Hồng và cộng sự, Vi tảo biển dị dưỡng *Labyrinthula*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* mới ở Việt Nam: Tiềm năng và thách thức. *Nhà xuất bản khoa học tự nhiên và công nghệ*.). Thraustochytrids trước đây được xếp vào nhóm nấm biển nhưng từ những năm 2020 trở lại đây, chúng được xếp vào nhóm vi tảo biển dị dưỡng dựa trên các kết quả nghiên cứu về gen và protein cũng như các bằng chứng nghiên cứu đã chỉ ra tổ tiên của nhóm này có chứa lap thể sau đó lap thể mất đi chức

năng quang hợp của nó và trở thành nơi dự trữ các axit béo của cơ thể (Leyland B et al., Are thraustochytrids algae? *Fungal Biol.* 121: 835-840, 2017). Giống như các cơ thể sinh vật có dầu khác, các thraustochytrids tích lũy lipid khi thiếu một yếu tố tăng trưởng thiết yếu và lưu trữ các axit béo được tạo ra dưới dạng triacylglycerol trong các thể lipid nội bào (Watanabe T et al., Regulation of TG accumulation and lipid droplet morphology by the novel TLDP1 in *Aurantiochytrium limacinum* F26-b. *J. Lipid Res.* 58: 2334-2347, 2017). Các axit béo có mạch cacbon ngắn hơn được tổng hợp theo con đường tổng hợp axit béo bình thường (quá trình gắn 2 các bon và tiếp theo là khử bão hòa) trong khi PUFAs được tổng hợp thông qua con đường polyketit (PKS). Con đường PKS là một quá trình hiệu quả hơn về nhu cầu oxy và năng lượng so với con đường khử bão hòa tương tự cho quá trình sinh tổng hợp PUFA được tìm thấy ở các vi khuẩn sinh dầu khác (Napier JA, Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: A novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms. *Trends Plant Sci.* 7: 51-54, 2002). Điều này là một thuận lợi lớn cho việc sản xuất DHA ở đối tượng thraustochytrids khi sử dụng các hệ thống bình lên men thông thường để vi tảo biển dị dưỡng này có thể đạt được mật độ tế bào (MĐTB) rất cao, trong đó sục khí thường là một yếu tố hạn chế cho quá trình tích lũy sinh khối có hàm lượng DHA cao (Stanbury PF et al., Aeration and agitation Principles Ferment. *Technol.* 243-275, 1995).

Hàng loạt các vi sinh vật dị dưỡng có khả năng phân giải các chất hữu cơ, đóng góp vai trò quan trọng trong quá trình tái tạo các chất dinh dưỡng có trong hệ sinh thái (Thompson CE et al., A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. *AMB Express.* 3:65). EPSs được tiết ra rộng rãi bởi các sinh vật biển khác nhau như thực vật, động vật, vi tảo và vi khuẩn (Philippis RD et al., Exocellular polysaccharide from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol Rev.* 22:151-175). Các EPSs được tạo ra ở cơ thể này có hoạt tính sinh học cao như chống ung thư, chất chống đông máu (chất tương tự heparin) và dùng trong băng bó các vết thương cho phẫu thuật mắt và khớp (Jain R et al., Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists. *Marine Biotechnology.* 7: 184-92, 2005). Ngoài các ứng dụng trong y tế, các EPS cũng còn có vai trò rất quan trọng làm chất ổn định nhũ tương (trong thực phẩm), chất keo tụ (trong làm sạch nước và khai thác quặng), chất ổn định bột (trong bia và chất lỏng chữa cháy), chất keo (trong công nghệ enzym và thực phẩm), chất dưỡng ẩm (trong

mỹ phẩm và dược phẩm) và là chất ức chế sự hình thành tinh thể trong thực phẩm đông lạnh và xi-rô đường (Sutherland IW, Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16, 41–46, 1998). Cho đến nay, trên các đối tượng là vi sinh vật biển nói chung và vi tảo biển dị dưỡng nói riêng, chưa có công bố nào về khả năng tạo ra các EPSs mới và hữu ích. Ở vi khuẩn dị dưỡng và vi khuẩn lam, các EPS có thể tồn tại dưới dạng viên nang bao quanh tế bào hoặc dưới dạng chất nhớt phân tán. Các EPS mang lại một số lợi ích cho các tế bào tạo ra nó. Trong các cột nước nổi, EPS giúp cho việc lắng đọng thực vật phù du nở hoa và các chất lơ lửng khác. Chúng cũng ảnh hưởng đến việc chuyển các kim loại nặng và các hợp chất độc hại khác từ các cột nước sang phần trầm tích. Trong hệ thống sinh vật đáy, chúng giúp liên kết và ổn định trầm tích và điều chỉnh sự bám dính của một số ấu trùng động vật không xương sống lên bề mặt. Các EPS đóng vai trò chính trong việc hình thành màng sinh học và tạo màng sinh học. Chúng cũng dùng làm thức ăn cho giáp xác chân chèo harpacticoid, giun tròn, trùng bánh xe và nhiều loài động vật phù du khác nhau (Bhosle NB et al., Isolation and partial chemical analysis of exopolysaccharides from the marine fouling diatoms *Navicula subinflata*. *Bot Mar*: 38: 103–110, 1995; Decho, 1990). Do đó, các sinh vật sản xuất EPS (khi EPS đạt số lượng đáng kể) sẽ có vai trò sinh thái quan trọng. Trong số các sinh vật biển đó phải kể đến vai trò của nhóm thraustochytrids, chúng thường được tìm thấy trong môi trường sống của rừng ngập mặn, biển và cửa sông và đã được chứng minh là sản sinh ra một loạt các enzym ngoại bào có thể phân hủy và các khoáng vi lượng hữu cơ trong môi trường. Ở các môi trường nuôi cấy của các loài khác nhau có thể hiện các hoạt động của nhiều enzym phân giải khác nhau như cellulaza, lipaza, proteaza, amylaza và glucosidaza (Liu Y et al., Culturable diversity and biochemical features of thraustochytrids from coastal waters of Southern China. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98:3241–3255, 2014; Taoka Y et al., Influences of culture temperature on the growth, lipid content and fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. strain mh0186. *Marine biotechnology.* 11(3):368-374, 2009). Các EPS biến đổi trong suốt quá trình hình thành tế bào, trong quá trình sinh trưởng, phát triển của tế bào, tương tác giữa tế bào với tế bào cũng như giữa tế bào với môi trường (Pogorelko G et al., Arabidopsis and Brachypodium distachyon transgenic plants expressing *Aspergillus nidulans* acetylsterases have decreased degree of polysaccharide acetylation and increased resistance to pathogens. *Plant Physiology.* 162(1):9-23, 2013). Tuy nhiên,

ngược lại chính việc sản xuất EPS có thể mang lại một số lợi ích sinh học cho có thể thraustochytrid. Đầu tiên, các chủng vi tảo biển dị dưỡng thraustochytrid được phân lập từ các vùng rừng ngập mặn - nơi trải qua quá trình phơi nhiễm và ngập nước định kỳ theo thủy triều nhưng nhờ có EPS, các tế bào vi sinh vật sống ở điều kiện nêu trên (trong đó có thraustochytrid) có khả năng giữ ẩm khi tiếp xúc với không khí (lúc thủy triều xuống). Độ phức tạp của polysaccharit trong thành tế bào và sự hình thành mạng lưới polysaccharit quyết định độ bền, tính linh hoạt và chức năng của thành tế bào sơ cấp.

Aurantiochytrium là vi tảo biển dị dưỡng được xem là nguồn sản xuất các axit béo không bão hòa cao nhất, hàm lượng lipid chiếm 70% sinh khối khô (SKK) và DHA chiếm 30 - 70% so với các axit béo tổng số (total fatty acids - TFA) và nó không có độc tố tảo (Manikan V et al., A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. *Algal Research*. 9: 40-7, 2015). Chủng *Aurantiochytrium* sp. ATCC PRA-276 có SKK đạt 23,9 g/L sau 96 giờ nuôi cấy trong hệ thống lên men sử dụng nồng độ nitơ ban đầu là 0,22 g/L và glucose là 30 g/L. Trong các điều kiện này, hàm lượng DHA và DPA ω -6 lần lượt là 2,54 và 0,80 g/L. *Aurantiochytrium* sp. MA20 có sinh khối, lipid và DHA lần lượt là $29,1 \pm 0,13$, $16,2 \pm 0,31$ và $9,47 \pm 0,26$ g/L (Wang Q et al., Enhancement of DHA production from *Aurantiochytrium* sp. by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis aided with microbial microdroplet culture screening. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 6:1-2, 2022). Theo Wang và cộng sự, bằng cách kết hợp giữa các quá trình chuyển hóa axit béo thì chủng *Aurantiochytrium* sp. SD116 có hàm lượng DHA đạt 61% so với TFA và 331 mg/g sinh khối khô. Nuôi cấy theo mẻ chủng *A. limacinum* SR21 trong điều kiện sử dụng glucoza 90g/L, cao nấm men 10g/L và muối biển 17,5 g/L, sinh trưởng của tế bào đạt 55 g SKK/L, hàm lượng axit béo đạt 44% SKK và sản lượng DHA là 12,5 g/L. Do đó, hàm lượng DHA, EPA và DPA phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, nguồn nitơ, nguồn carbon, độ mặn.

Các PUFA có rất nhiều vai trò đối với sức khỏe con người như: tham gia vào sự điều hòa quá trình trao đổi lipid, vận chuyển và hướng tới các mô. Do PUFA tham gia vào thành phần cấu trúc thành tế bào nên sự có mặt của chúng trong thành phần phospholipit góp phần tạo nên tính linh động của màng tế bào, góp phần quan trọng trong việc điều chỉnh hoạt động của các protein màng. Thành phần quan trọng trong cấu tạo tế bào não, đặc biệt não của trẻ nhỏ từ 0 - 2 tuổi là PUFA. Chúng có ảnh hưởng tích

cực và quan trọng đến hoạt động của hệ thống thần kinh trung ương, cần thiết cho sự phát triển chức năng não bộ và thị giác ở trẻ nhỏ. Cần nhấn mạnh rằng não bộ không thể duy trì hoạt động nếu như không có những axit béo quan trọng này (Nagy K et al., Importance of fatty acids in physiopathology of human body. In *Fatty acids. IntechOpen*, 2017). Ngày nay, vai trò của PUFA góp phần cải thiện hiệu quả bệnh tim mạch: giảm nguy cơ loạn nhịp tim; có hiệu quả rõ rệt trong điều trị suy nhược; giảm nguy cơ hình thành khối u tuyến tiền liệt; làm chậm tốc độ tăng trưởng của mảng xơ vữa động mạch; cải thiện chức năng nội mô; hạ huyết áp (nhẹ) và giảm phản ứng viêm đã được công bố. So với các cơ quan khác, hàm lượng DHA trong não và mắt cao hơn, đặc biệt tập trung vào chất xám của não và võng mạc. Khi hàm lượng DHA thấp đã làm giảm sự phát triển nhận thức và chức năng thị giác (Calder PC, Docosahexaenoic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 69(1): 8-21, 2016). Việc sử dụng các axit béo ω - 3 để cải thiện tình trạng bệnh tiểu đường thai kỳ, có lợi trong việc điều hòa chức năng trao đổi chất của mẹ và thai nhi cũng đã được công bố (Elshani B et al., Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetes, maternal and fetal insights: current use and future directions. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 34(1):124-36, 2019). Một số các axit béo dạng ω - 6 như linoleic và DPA có tác dụng chống viêm dây thần kinh trong cơ thể người ở các mô hình *in vitro* về bệnh Alzheimer. Chất chuyển hóa DPA ω -6 trong não sẽ được tăng lên, có tác dụng thúc đẩy quá trình chống viêm dây thần kinh dẫn đến làm giảm bệnh Alzheimer khi axit linoleic ω - 6 có trong khẩu phần ăn. Trong đó, khi kết hợp DHA với DPA ω - 6, chúng tăng cường tác dụng chống viêm, giảm phù nề (Nauroth JM et al., Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA ω -6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema in vivo. *Lipids*. 45(5):375-384, 2010), giảm co thắt mạch máu và kết tụ tiểu cầu. *Aurantiochytrium* sp. đang được nghiên cứu như một nguồn mới của axit béo DHA bổ sung vào thực phẩm, đã được chứng minh là không độc và an toàn cho sức khỏe con người và động vật nuôi (Bell AN et al., Identity and Safety of a Novel *Aurantiochytrium* sp. for Terrestrial Heterotrophic Docosahexaenoic Acid Production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 11(12): 489-509, 2020).

Các axit béo EPA, ARA (Arachidonic acid; C20 :4 ω - 6) và DHA (PUFAs) rất cần thiết cho sự phát triển và biến thái của ấu trùng tôm, cá, cua và động vật thân mềm hai mảnh vỏ. Trong đó, cần nhấn mạnh rằng tỷ lệ giữa các axit béo DHA, EPA và ARA còn

quan trọng hơn rất nhiều so với hàm lượng của chúng. Các loài vi tảo có hàm lượng dinh dưỡng rất cao, đặc biệt là các axit béo (Becker W, *Microalgae for aquaculture. The nutritional value of microalgae for aquaculture*, In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*, 380-391, 2004). Tại các trại sản xuất giống thủy sản của Ai Cập, sử dụng sinh khối *Tetraselmis chuii* (có PUFA với hàm lượng ARA đạt 5,50%; EPA - 4,80% và DHA - 5,00% so với TFA) làm giàu luân trùng *Brachionus plicatilis* và ấu trùng *Artemia salina* đã làm tăng tốc độ sinh trưởng và khả năng sống sót, tăng khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, nâng cao giá trị dinh dưỡng của luân trùng và *Artemia*. Tiếp theo sử dụng luân trùng và *Artemia* được làm giàu nêu trên làm thức ăn cho cá, tôm, cua đã làm tăng khả năng sống sót và giúp cho ấu trùng nuôi phát triển tốt nhất. Hàm lượng axit béo ARA, ALA (Alpha linolenic acid, C18:3 ω - 3), DHA và EPA trong thịt cá đã tăng lên đáng kể sau khi bổ sung *Aurantiochytrium* sp. vào thức ăn. Trong đó, ARA tăng từ 0,97 đến 1,24%, ALA tăng từ 0,59 đến 0,81%, DHA tăng từ 14,63 lên 14,82% và EPA tăng từ 4,58 - 5,19%. Ở giai đoạn non của tôm, cua và cá các loại, khi thức ăn của chúng thiếu DHA và EPA đã gây ra tỷ lệ chết cao, tốc độ sinh trưởng chậm.

Hiện nay, nhiên liệu sinh học được phân thành thế hệ thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư nhằm đáp ứng nhu cầu năng lượng toàn cầu đồng thời giảm thiểu tác động đến môi trường. Nhiên liệu sinh học thế hệ đầu tiên là lấy nguồn nguyên liệu chủ yếu là từ thực vật như các cây có dầu: cây cọ, đậu tương, mía, ngô. Nhiên liệu sinh học thế hệ thứ hai đã ra đời và chủ yếu được sản xuất từ các phụ phẩm nông nghiệp (rơm, ngũ cốc, bã mía) chất thải (dầu mỡ động vật, thành phần hữu cơ từ chất thải rắn của đô thị). Nhiên liệu sinh học thế hệ thứ ba là sử dụng sinh khối vi tảo. Nhiên liệu sinh học thế hệ thứ tư sử dụng các vi sinh vật biến đổi gen như vi tảo, nấm men và vi khuẩn lam được sử dụng để tăng cường sản xuất nhiên liệu sinh học (Joshi G et al., *Challenges and opportunities for the application of biofuel. Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 79: 850-866, 2017).

Năng lượng tái tạo và hóa chất dựa trên tảo đã ngày càng thu hút được sự chú ý trong vài thập kỷ qua, chủ yếu là do chúng có tiềm năng giảm phát thải khí nhà kính và giảm sự phụ thuộc của chúng ta vào nhiên liệu hóa thạch. Tuy nhiên, các ngành công nghiệp dựa trên tảo vẫn không có khả năng sản xuất nhiên liệu sinh học bền vững và rẻ tiền. Việc sản xuất nhiên liệu sinh học từ vi tảo chỉ có thể thực hiện được nếu nó được

kết hợp với việc đồng sản xuất các sản phẩm phụ có giá trị cao cho ngành công nghiệp hóa dầu hoặc dược phẩm (Lam GP et al., Multiproduct microalgae biorefineries: from concept towards reality. *Trends Biotechnol.* 36:216–27, 2018). Chỉ một số loài vi tảo cho phép đồng sản xuất các sản phẩm có giá trị. Vi tảo có thể được sử dụng cho nhiều ứng dụng khác nhau, chẳng hạn như năng lượng tái tạo (etanol sinh học, dầu diesel sinh học và khí sinh học), thực phẩm (axit béo omega-3 và omega-6 như EPA, DPA, DHA và protein), dược phẩm và mỹ phẩm (β -carotene, squalene và astaxanthin).

Vi tảo có tỷ lệ sản xuất lipid cao gấp 7-31 lần so với các loại cây có dầu khác. Hàm lượng dầu trong vi tảo dao động từ 20-50% và có thể lên đến 80% SKK nên vi tảo phù hợp làm nguyên liệu phù hợp cho sản xuất nhiên liệu sinh học. Một số vi tảo cũng có thể tổng hợp một lượng lớn axit béo không bão hòa đa nối đôi như C22:6 (42 %) ở *Aurantiochytrium* sp., C22:5 + C22:6 (39,4 %) ở *Schizochytrium limacinum*... (Sajjadi B et al., Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 97: p. 200-232, 2018). Nhiên liệu sinh học vi tảo không độc hại, có khả năng phân hủy sinh học cao và không có hàm lượng lưu huỳnh. Việc tảo sử dụng CO₂ trong quá trình phát triển khiến nó trở thành tác nhân giảm thiểu CO₂ khả thi từ các nhà máy. Vi tảo dựa vào quá trình quang hợp để sản xuất năng lượng hóa học từ năng lượng mặt trời. Năng lượng hóa học do vi tảo tổng hợp được lưu trữ trong lipid, protein và carbohydrate. Khi xem xét nhiên liệu sinh học, sản lượng lipid từ một loài cụ thể ảnh hưởng lớn đến hiệu quả sản xuất của nó. Ngoài ra, Vi tảo có tốc độ sinh trưởng cao hơn, hiệu quả quang hợp cao, thích nghi với điều kiện stress môi trường khắc nghiệt và có thể phát triển trong điều kiện nước thải với khả năng hấp thu dinh dưỡng cao. Ngoài ra, cấu trúc tế bào và thành phần axit béo đơn giản giúp đơn giản hóa các kỹ thuật của quá trình tách chiết và thu hồi sản phẩm (Udayan A et al., Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochemistry Reviews.* 22(4):833-60, 2023).

Squalen là một chất lỏng dạng dầu thuộc nhóm triterpene, nó được hình thành bởi sáu đơn vị isoprene, do đó, nó là một hợp chất isoprenoid 30 carbon với sáu liên kết đôi (công thức của squalene là C₃₀H₅₀). Sự tích lũy squalen, một tiền chất hydrocarbon trong con đường tổng hợp sterol, cũng đã được nghiên cứu ở *thraustochytrids*. Squalen chủ yếu được sử dụng như một chất giữ ẩm vì đặc tính chống oxy hóa tự nhiên của nó. Nó

có nhiều ứng dụng dược phẩm và y tế với chức năng ức chế khối u, kháng khuẩn và kháng nấm (Nakazawa A et al., Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalen production. *Bioresource Technology*. 109: 287-291, 2012). Gần đây, chủng thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a, được phát hiện là tạo ra một lượng lớn squalen (có hàm lượng 171 mg/g SKK với năng suất tạo squalen là 0,9 g/L) trong điều kiện môi trường tối ưu có nhiệt độ là 25°C, có chứa 25-50 % nước biển (v/v) và có 2-6 % glucoza (w/v). Kết quả nghiên cứu của Nakazawa và cộng sự (Nakazawa A et al., TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *J Appl Phycol*: 26:29–41, 2014) đã cho thấy loài *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a tích lũy lượng squalen cao hơn các loài khác. Chủng *Aurantiochytrium* sp. BR-MP4-A1 được phát hiện là tạo ra hàm lượng squalen cao nhất (2,46 g/L) sau 72 giờ trong số tất cả các dòng phân lập được thử nghiệm. Có thể được nâng cao và cải thiện hàm lượng squalene ở nhiều loại vi sinh vật bằng cách; (1) sử dụng quá trình lên men với các điều kiện bổ sung các chất đã được tối ưu hóa, (2) Sử dụng kỹ thuật di truyền để làm thay đổi hoạt động của các gen tham gia trong quá trình tổng hợp squalen, và (3) bổ sung chất ức chế (ví dụ: terbinafin là chất ức chế enzyme monooxygenaza trong con đường tổng hợp sterol dẫn đến tích lũy squalen).

Ketocarotenoid như astaxanthin, canthaxanthin, phoenicoxanthin, echinenon, và không phải ketocarotenoid như β -caroten và zeaxanthin là các thành phần chính của carotenoid ở thraustochytrids. Carotenoid của vi tảo biển có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ các tế bào chống lại các điều kiện bất lợi của môi trường (Leyton A et al., Antarctic thraustochytrids as sources of carotenoids and high-value fatty acids. *Marine drugs*. 19(7): 386, 2021).

Việt Nam có mức độ đa dạng sinh học và giàu động thực vật và vi sinh vật có khả năng phát triển với nhiều đặc tính quý. Đặc biệt là các loài vi tảo biển dị dưỡng giàu các PUFA được phân lập tại vùng rừng ngập mặn Việt Nam có tiềm năng ứng dụng rất lớn: tốt cho sức khỏe tim mạch, là thành phần cấu nên tế bào thần kinh và võng mạc nên tốt cho sự phát triển của não bộ và mắt, cần thiết cho sự phát triển của ấu trùng tôm, cua, cá và nhuyễn thể hai mảnh vỏ. Chi *Aurantiochytrium* có ưu điểm dễ dàng nuôi cấy trong các hệ thống lên men, không phụ thuộc vào mùa vụ, không cạnh tranh với đất cho sản xuất nông nghiệp và năng suất cao. Do đó, cần phát triển các loài vi sinh có khả năng sản xuất các EPS ngoại bào, tổng hợp các axit béo không bão hòa đa nối đôi PUFA,

squalen và carotenoit. Trong đó thành phần axit béo của chúng đơn giản và dễ dàng tách chiết ra khỏi hỗn hợp axit béo. Bên cạnh đó nó còn có sản xuất một số hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học nhằm phát triển thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người, mỹ phẩm, dược phẩm, nhiên liệu sinh học cũng như thức ăn bổ sung cho động vật nuôi.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm khắc phục những vấn đề nêu trên, cụ thể bằng cách phân lập từ lá được *Rhizophora apiculate* đang trong giai đoạn phân hủy tại rừng ngập mặn An Thới, Phú Quốc, Kiên Giang, Việt Nam thu được chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 không chỉ có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi như DHA, EPA, DPA mà còn có khả năng tổng hợp squalen và carotenoit/astaxanthin hiệu quả có khả năng ứng dụng làm thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, dược phẩm, nhiên liệu sinh học và thức ăn cho động vật nuôi.

Sáng chế đề cập đến chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập, trong đó chủng này:

- chứa trình tự 18S rARN nêu trong SEQ ID NO.1 có kích thước 1714bp và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ KG145;

- có khả năng sản xuất polysacarit ngoại bào với protein đạt $21,21 \pm 0,43\%$, lipit đạt $15,76 \pm 0,76\%$ và cacbohydrat đạt $28,03 \pm 1,25\%$ (theo trọng lượng) so với tổng polysacarit ngoại bào;

- có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi so với axit béo tổng số bao gồm axit docosaheptaenoic (DHA) đạt 32,34%, axit eicosapentaenoic (EPA) đạt 0,79% và axit docosapentaenoic (DPA) đạt 5,77% (theo trọng lượng); và

- có khả năng sinh tổng hợp squalen lên tới $85,15 \pm 0,43$ mg/g sinh khối khô, carotenoit lên tới $32,15 \pm 0,62$ µg/g sinh khối khô và astaxanthin lên tới $8,52 \pm 0,39$ µg/g sinh khối khô ở điều kiện 25 °C, độ mặn 15‰, glucoza 9%, cao nấm men 1%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp thể hiện hình thái khuẩn lạc dưới kính hiển vi quang học của chủng vi tảo biển *Aurantiochytrium mangrovei* KG145; (A) hình thái khuẩn lạc trên môi

trường GPYc thạch; (B) hình thái khuẩn lạc ở độ phóng đại 400 lần; (C) hình thái khuẩn lạc ở độ phóng đại 12.000 lần;

Hình 2 là ảnh chụp hình thái tế bào của chủng vi tảo biển *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được nuôi trồng trên môi trường GPYc lỏng; (A) hình thái tế bào với độ phóng đại 1.200 lần; (B) hình thái tế bào với độ phóng đại 20.000 lần;

Hình 3 là ảnh chụp kết quả điện di kết quả gen 18S trên gel agarosa 0,8% của chủng vi tảo biển *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 với; (A) ADN tổng số; (B) gen 18S nhân bằng cặp mồi FA1v à RA3; (C) gen 18S rARN tinh sạch.

Hình 4 là hình ảnh thể hiện kết quả cây phát sinh loài khi xác định loài đối với chủng vi tảo biển *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 theo trình tự gen 18S rARN;

Hình 5 là ảnh chụp kết quả phân tích thành phần axit béo trong sinh khối chủng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 khi nuôi cấy trong môi trường M2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện cụ thể này chỉ nằm là rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập, trong đó chủng này được phân lập từ lá được *Rhizophora apiculate* đang trong giai đoạn phân hủy tại rừng ngập mặn An Thới, Phú Quốc, Kiên Giang, Việt Nam. Trong đó, các mẫu lá cây được *Rhizophora apiculate*, thuộc họ Đước Rhizophoraceae đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bờ rừng ngập mặn An Thới, Phú Quốc, Kiên Giang, Việt Nam được thu thập, rửa bằng nước biển, cho vào túi nilon, bảo quản mẫu lá ở nhiệt độ mát để làm mẫu phân lập.

Môi trường dùng cho phân lập là môi trường GPYc bao gồm glucoza: 2 g/L, polypepton: 1 g/L, cao nấm men: 0,5 g/L, aga: 15 g/L, muối biển nhân tạo: 17,5 g/L (tương đương 1,5% NaCl), chloramphenicol: 50 mg/L. Sau khi phân lập thu các khuẩn lạc và tinh sạch được các chủng sạch, các khuẩn lạc được nuôi cấy trên môi trường cơ bản M1 có thành phần bao gồm: glucoza: 30 g/L, cao nấm men: 10 g/L, muối biển nhân tạo: 17,5 g/L.

Quá trình nuôi được thực tiến hành với các bình tam giác 250 mL, nhiệt độ nuôi được duy trì từ 25 đến 28°C trong điều kiện tối và lắc 200 vòng/phút. Các chủng phân lập được nuôi cấy trong hệ thống lên men tự tạo 30 lít chứa môi trường M2 bao gồm glucoza: 90 g/L, cao nấm men: 10 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 9,47 g/L, CaCl_2 : 1 g/L, Na_2SO_4 : 3,50 g/L, KCl : 0,59 g/L, NaHCO_3 : 1,7 g/L, NaCl : 20,47 g/L, KBr : 0,085 g/L, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$: 0,034 g/L, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,02 g/L, NaF : 0,003 g/L và $\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,001 g/L.

Kết quả phân lập và chọn lọc chủng vi tảo biển dị dưỡng theo hiệu quả sản xuất polysacarit ngoại bào, tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi bao gồm axit docosahexaenoic (DHA), axit eicosapentaenoic (EPA) và axit docosapentaenoic (DPA) cũng như khả năng sinh tổng hợp squalen, carotenoit và axtasanthin. Kết quả thu được chủng vi tảo biển dị dưỡng ký hiệu KG145 với các khuẩn lạc có dạng hình tròn, tập trung thành từng cụm, khuẩn lạc màu trắng, trơn, mạng lưới ngoại chất rất phát triển, khuẩn lạc sinh dưỡng lớn. Thành tế bào có chứa sulphat polysacarit với thành phần chủ yếu là galactosa hoặc fructosa và protein. Hệ thống mạng lưới ngoại chất (EN) được sinh ra từ một hoặc nhiều điểm trên thành tế bào. EN hình thành nên một mạng lưới nhánh của màng sinh chất kéo dài, liên quan đến một bào quan gọi là bothrosom hoặc sagenogenetosom (sagenogen) ở phía bề mặt ngoài tế bào. Dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc có thể xếp chủng này vào chi *Aurantiochytrium*.

Tiến hành định danh tên khoa học chính xác chủng KG145 trên cơ sở giải trình tự gen 18S rARN với cặp mồi đặc hiệu gồm mồi xuôi FA1 nêu trong SEQ ID NO.2 và mồi ngược RA3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 sau:

FA1: 5'-AAAGATTAAGCCATGCATGT-3' SEQ ID NO.2

RA3: 5'-CAATCGGTAGGTGCGACGGGCGG-3' SEQ ID NO.3

Kết quả PCR thu được có một băng ADN có kích thước khoảng 1,7 kb. Sản phẩm này được tinh sạch và thu bằng Gene JET Purification Kit của hãng Thermo Fisher Scientific. Sau tinh sạch, sản phẩm PCR được điện di kiểm tra chất lượng và hiệu suất quá trình thôi gel trên gel agaroza 0,8%.

Kết quả gen 18S rARN của chủng ký hiệu KG145 được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu FA1 và RA3 nêu trên có kích thước 1714 bp nêu trong SEQ ID NO.1. Kết quả so sánh trên Ngân hàng gen (genbank) với các loài *Phaeodactylum tricornutum* (mã số

đăng ký FR865506.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Z75578.1) đã được sử dụng làm nhóm ngoại cho chi *Aurantiochytrium* có tỉ lệ tương đồng so với các loài thuộc chi *Aurantiochytrium* dao động từ 76,4 đến 81,5% (Hình 4). Mẫu *Aurantiochytrium* sp. KG145 có tỉ lệ phần trăm tương đồng cao nhất với loài *Aurantiochytrium mangrovei* (DQ367049.1) đạt 99,3%, tiếp theo là loài *Aurantiochytrium limacinum* (AB810940.1) đạt 98,9% và thấp nhất là loài *Aurantiochytrium* sp. OH4(AB900161.1) đạt 98,1%. Do vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái, tỷ lệ phần trăm tương đồng và cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Aurantiochytrium* (Hình 4).

Kết quả phân loại cho thấy chủng *Aurantiochytrium* sp. KG145 thuộc về loài *Aurantiochytrium mangrovei* có độ tương đồng đạt 99,3% so với loài *Aurantiochytrium mangrovei* (DQ367049.1). Trình tự 18S rARN (SEQ ID NO.1) được đăng ký trên Ngân hàng gen (Genbank) với mã đăng ký OR047929.

Chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập theo sáng chế chứa trình tự 18S rARN nêu trong SEQ ID NO.1 có kích thước 1714bp và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ KG145.

Kết quả đánh giá cho thấy, vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập theo sáng chế có khả năng sản xuất polysacarit ngoại bào với protein đạt $21,21 \pm 0,43\%$, lipit đạt $15,76 \pm 0,76\%$ và cacbohydrat đạt $28,03 \pm 1,25\%$ (theo trọng lượng) so với tổng polysacarit ngoại bào.

Ngoài ra, vi tảo vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập theo sáng chế có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi so với axit béo tổng số bao gồm axit docosahexaenoic (DHA) đạt 32,34%, axit eicosapentaenoic (EPA) đạt 0,79% và axit docosapentaenoic (DPA) đạt 5,77% (theo trọng lượng); và

Chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập theo sáng chế còn có khả năng sinh tổng hợp squalen lên tới $85,15 \pm 0,43$ mg/g sinh khối khô, carotenoit lên tới $32,15 \pm 0,62$ µg/g sinh khối khô và axtasanthin lên tới $8,52 \pm 0,39$ µg/g sinh khối khô ở điều kiện 25 °C, độ mặn 15‰, glucoza 9‰, cao nấm men 1‰.

Với khả năng sinh sản xuất tổng hợp polysacarit ngoại bào, tổng hợp axit béo không bão hòa đa nổi trội so với axit béo tổng số bao gồm axit docosahexaenoic (DHA) đạt 32,34%, axit eicosapentaenoic (EPA) đạt 0,79% và axit docosapentaenoic (DPA) đạt 5,77% (theo trọng lượng) Chúng vi tảo theo sáng chế thích hợp nuôi cấy thu sinh khối ứng dụng làm thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, dược phẩm, nhiên liệu sinh học cũng như thức ăn bổ sung cho động vật nuôi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Phân lập vi tảo sản xuất polysacarit ngoại bào và axit béo không bão hòa đa nổi trội

Mẫu lá được *Rhizophora apiculate* đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bờ rừng ngập mặn rừng ngập mặn An Thới, Phú Quốc, Kiên Giang, Việt Nam được thu thập, sau khi rửa sạch các mẫu lá bằng nước biển, cắt 3 mảnh lá với kích thước dài x rộng là 0,5 cm x 0,5 cm. Mẫu được cho vào ống nghiệm có chứa 5 mL nước biển nhân tạo khử trùng đã được bổ sung phấn thông (pine-pollen).

Các ống nghiệm được giữ 28°C trong tối, sau 24 giờ, dùng que cấy platin thu lấy phấn thông nổi trên bề mặt nước và cấy rĩa trên đĩa chứa môi trường GPYc. Các đĩa này được đặt ở 28°C, trong tối. Sau 5 ngày, quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100 lần. Quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào *Aurantiochytrium* có dạng hình tròn, tập trung thành từng cụm xung quanh hạt phấn thông, khuẩn lạc màu trắng, trơn. Việc cấy chuyển trên môi trường GPYc nhiều lần cho phép thu được các khuẩn lạc sạch vi khuẩn và nấm để chọn lọc các chủng vi nấm có khả năng sinh sản xuất polysacarit ngoại bào, khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nổi trội bao gồm axit docosahexaenoic (DHA), axit eicosapentaenoic (EPA) và axit docosapentaenoic (DPA) cũng như khả năng sinh tổng hợp squalen, carotenoit và axtasanthin.

Kết quả đã phân lập và chọn lọc được chủng vi tảo biển dị dưỡng ký hiệu KG145. Ảnh chụp khuẩn lạc dưới kính hiển vi quang học của chủng vi tảo biển KG145 thể hiện trên Hình 1; (A) hình thái khuẩn lạc trên môi trường GPYc thạch; (B) hình thái khuẩn lạc ở độ phóng đại 400 lần; (C) hình thái khuẩn lạc ở độ phóng đại 12.000 lần. Hình 2 là ảnh chụp hình thái tế bào của chủng vi tảo biển KG145 được nuôi trồng trên môi trường GPYc lỏng; (A) hình thái tế bào với độ phóng đại 1.200 lần; (B) hình thái tế bào với độ phóng đại 20.000 lần.

Tiến hành phân lập ADN tổng số và định danh tên khoa học chính xác chủng vi tảo biển KG145 bằng cách giải trình tự gen 18S rARN với cặp mồi đặc hiệu gồm mồi xuôi FA1 nêu trong SEQ ID NO.2 và mồi ngược RA3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 sau:

FA1: 5'-AAAGATTAAGCCATGCATGT-3' SEQ ID NO.2

RA3: 5'-CAATCGGTAGGTGCGACGGGCGG-3' SEQ ID NO.3

Kết quả được thể hiện trên Hình 3 là ảnh chụp kết quả điện di kết quả gen 18S trên gel agarosa 0,8% của chủng vi tảo biển KG145 với; (A) ADN tổng số; (B) gen 18S nhân bằng cặp mồi FA1 và RA3; (C) gen 18S rARN tinh sạch.

Kết quả PCR thu được có một băng ADN có kích thước khoảng 1,7 kb. Sản phẩm này được tinh sạch và thu bằng Gene JET Purification Kit của hãng Thermo Fisher Scientific. Sau tinh sạch, sản phẩm PCR được điện di kiểm tra chất lượng và hiệu suất quá trình thổi gel trên gel agarosa 0,8% (Hình 3). Kết quả gen 18S rARN của chủng vi tảo biển ký hiệu KG145 được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu FA1 và RA3 nêu trên có kích thước 1714 bp (Hình 3C) nêu trong SEQ ID NO.1, đăng ký trên ngân hàng gen với mã số OR047929.

Tiến hành so sánh trên Ngân hàng gen (genbank) với các loài *Phaeodactylum tricornutum* (mã số đăng ký FR865506.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Z75578.1) đã được sử dụng làm nhóm ngoại cho chi *Aurantiochytrium* có tỉ lệ tương đồng so với các loài thuộc chi *Aurantiochytrium* dao động từ 76,4 đến 81,5% (Hình 4). Mẫu *Aurantiochytrium* sp. KG145 có tỉ lệ phần trăm tương đồng cao nhất với loài *Aurantiochytrium mangrovei* (DQ367049.1) đạt 99,3%, tiếp theo là loài *Aurantiochytrium limacinum* (AB810940.1) đạt 98,9% và thấp nhất là loài *Aurantiochytrium* sp. OH4(AB900161.1) đạt 98,1%. Do vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái, tỷ lệ phần trăm tương đồng và cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Aurantiochytrium* (Hình 4).

Như vậy chủng vi tảo biển dị dưỡng ký hiệu KG145 thuộc loài *Aurantiochytrium mangrovei* có tên là *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 chứa trình tự 18S rARN nêu trong SEQ ID NO.1 có kích thước 1714bp. Chủng này được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ KG145, còn được gọi tắt là chủng KG145.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng tổng hợp polysacarit ngoại bào (EPS)

Thử nghiệm về khả năng tổng hợp polysacarit ngoại bào, tiến hành nuôi cấy chủng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 trong môi trường M1 trong các bình tam giác 1 lít có chứa 350 mL môi trường. Sau 5 ngày nuôi cấy, tiến hành ly tâm 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Loại sinh khối và thu dịch môi trường, dịch nuôi cấy tiếp tục được rửa bằng cồn, hòa tan mẫu trong nước cất, đệm glycin, pH=4,0, đệm phosphat pH 7,0, đệm borat pH 9,0 và dung dịch đệm bicarbonat pH 10,5. Kết quả xác định hàm lượng các thành phần chính trong EPS bao gồm protein, lipid và cacbohydrat đạt $21,21 \pm 0,43\%$, $15,76 \pm 0,76\%$ và $28,03 \pm 1,25\%$ EPSs) được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần polysacarit ngoại bào (EPS) được sản xuất bởi chủng KG145

Thành phần	Hàm lượng
EPS (g/L dịch nuôi)	$1,02 \pm 0,06$
Protein (% EPS)	$21,21 \pm 0,43$
Lipit (% EPS)	$15,76 \pm 0,76$
Cacbohydrat (% EPS)	$28,03 \pm 1,25$

Kết quả

thể hiện trên

Bảng 1 cho thấy polysacarit ngoại bào (EPS) của chủng KG145 tiết ra môi trường đạt 1,02 g/L. Trong đó, hàm lượng các thành phần chính trong EPS này bao gồm protein, lipid và cacbohydrat đạt lần lượt $21,21 \pm 0,43\%$, $15,76 \pm 0,76\%$ và $28,03 \pm 1,25\%$ (theo khối lượng). Mặc dù thành tế bào chứa hàm lượng galactosa cao hơn nhiều so với glucoza, nhưng EPS lại chứa nhiều glucoza hơn nhiều lần so với galactosa. Ngoài ra, EPS không chứa xyloza, chất đã được chứng minh là có trong thành tế bào. Các gốc không đường của EPS được xem là quan trọng đối với cấu trúc bậc ba và tính chất vật lý của EPS. Các thành phần này thường ở dạng dư lượng và các nhóm bên của chuỗi polysacarit và chứa nhiều loại nhóm cacboxyl, amino, và sulfat. Như vậy, khả năng sản xuất EPS của chủng KG145 cho phép mở ra một hướng nghiên cứu về khả năng kết dính, khả năng giữ ẩm, chất chống đông máu và các hợp chất chống virus.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi (EPA, DPA, DHA)

Thử nghiệm đánh giá khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi như EPA, DPA và DHA được tiến hành với chủng *A. mangrovei* KG145 bằng cách nuôi cấy trên môi trường M1 trong một số điều kiện môi trường như nguồn cacbon, nguồn nitơ, nhiệt độ, độ mặn, chế độ lắc khác nhau trong 5 ngày. Trong đó ảnh hưởng của các điều kiện nguồn cacbon (saccaroza, glucoza, maltoza, glycerol), nguồn nitơ bao gồm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, cao nấm men, NaNO_3 và phân N-P-K), nhiệt độ bao gồm (15, 20, 25, 30 và 35°C), độ mặn bao gồm (0, 5, 10, 15 và 20 ‰), chế độ lắc bao gồm (tĩnh, 100, 200 và 300 vòng/phút). Kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng và tích lũy chất béo ở chủng *A. mangrovei* KG145 nuôi cấy ở các điều kiện nuôi khác nhau sau 5 ngày

Yếu tố ảnh hưởng	Công thức	Sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng chất béo (% SKK)
Nguồn cacbon	Sacaroza	$4,15 \pm 0,37^c$	$7,34 \pm 0,05^d$
	Glucoza	$11,21 \pm 0,42^a$	$38,23 \pm 0,27^a$
	Maltoza	$4,01 \pm 0,11^c$	$8,21 \pm 0,34^c$
	Glycerol	$8,73 \pm 0,65^b$	$25,16 \pm 1,02^b$
Nguồn nitơ	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$3,04 \pm 0,10^e$	$12,24 \pm 0,53^e$
	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	$5,21 \pm 0,18^d$	$19,87 \pm 0,19^c$
	Cao nấm men	$12,05 \pm 0,17^a$	$38,76 \pm 1,38^a$
	NaNO_3	$8,64 \pm 0,32^b$	$23,02 \pm 0,15^b$
	phân N-P-K	$6,18 \pm 0,29^d$	$15,31 \pm 0,67^d$
Nhiệt độ	15 °C	$4,23 \pm 0,18^d$	$17,73 \pm 0,15^e$
	20°C	$7,31 \pm 0,05^c$	$19,01 \pm 0,51^c$
	25°C	$12,54 \pm 1,38^a$	$39,14 \pm 0,06^a$
	30°C	$10,13 \pm 0,21^b$	$29,22 \pm 1,27^b$
	35°C	$3,15 \pm 0,23^e$	$12,01 \pm 0,03^d$
Nồng độ muối (‰)	0,00	$2,18 \pm 0,71^d$	$15,32 \pm 0,68^e$
	5	$8,34 \pm 0,28^c$	$26,75 \pm 1,83^d$
	10	$10,05 \pm 0,81^b$	$34,17 \pm 1,38^b$
	15	$12,67 \pm 0,12^a$	$40,04 \pm 0,15^a$
	20	$9,14 \pm 0,65^{bc}$	$30,11 \pm 1,15^c$
Chế độ lắc	Tĩnh	$1,53 \pm 0,37^c$	$5,08 \pm 0,61^c$
	100 vòng/phút	$7,68 \pm 0,21^b$	$25,06 \pm 1,24^b$

	200 vòng/phút	$13,42 \pm 0,33^a$	$40,16 \pm 1,35^a$
	300 vòng/phút	$13,46 \pm 0,14^a$	$39,67 \pm 1,13^a$

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau a, b, c, d, e trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả thể hiện trên Bảng 2 cho thấy, sau 5 ngày nuôi cấy lượng sinh khối khô (SKK) và hàm lượng axit béo tổng số đạt cao nhất khi sử dụng glucoza làm nguồn cacbon, tương ứng là $11,21 \pm 0,42$ g/L, $38,23 \pm 0,27$ % trọng lượng sinh khối khô. Nghiên cứu đánh giá tác động đối với các nguồn cacbon khác như sacaroza, maltoza, glycerol đối với sự sinh trưởng và hàm lượng chất béo của chủng KG145 đã cho thấy sinh khối khô giảm rõ rệt dao động từ $4,01 \pm 0,11$ đến $8,73 \pm 0,65$ g/L và hàm lượng lipid chỉ đạt $7,34 \pm 0,05$ đến $25,16 \pm 1,02\%$ trọng lượng sinh khối khô. Do đó, glucoza được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo.

Đối với nguồn nitơ, tiến hành khảo sát nguồn nitơ bao gồm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, cao nấm men, NaNO_3 và phân N-P-K đối với sự sinh trưởng và tích lũy chất béo của chủng KG145. Kết quả trên Bảng 2 cho thấy sinh khối khô, hàm lượng chất béo tổng số đạt cao nhất khi sử dụng cao nấm men làm nguồn nitơ, tương ứng là $12,05 \pm 0,17$ g/L, $38,76 \pm 1,38$ % sinh khối khô. Các nguồn nitơ khác làm giảm đáng kể khả năng sinh trưởng và hàm lượng chất béo của chủng KG145 so với sinh khối khô và hàm lượng chất béo chỉ dao động trong khoảng $3,04 \pm 0,10$ đến $8,64 \pm 0,32$ g/L và $12,24 \pm 0,53$ đến $23,02 \pm 0,15$ % trọng lượng sinh khối khô, tương ứng.

Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đối với khả năng sinh trưởng và tích lũy chất béo của chủng *A. mangrovei* KG145 cũng được khảo sát. Chủng này sinh trưởng tốt nhất ở 25°C với sinh khối khô, hàm lượng chất béo tổng số đạt cao nhất $12,54 \pm 1,38$ g/L và $39,14 \pm 0,06$ % trọng lượng sinh khối khô, tương ứng, sau 5 ngày nuôi (Bảng 2). Sự sai khác về sinh trưởng và hàm lượng chất béo có ý nghĩa thống kê giữa nhiệt độ 28°C và các nhiệt độ khảo sát. Khi nuôi trồng ở nhiệt độ quá thấp (15°C) hoặc quá cao (35°C), khả năng sinh trưởng và hàm lượng chất béo của chủng này đều giảm mạnh. Do đó, nhiệt độ 25°C là nhiệt độ tối ưu để cho chủng *A. mangrovei* KG145 phát triển.

Khảo sát độ mặn trong môi trường nuôi cấy từ 0‰ đến 20‰ đến sinh trưởng, hàm lượng chất béo tổng số của chủng KG145 được thể hiện trong Bảng 2. Kết quả Bảng 2 cho thấy mặc dù chủng KG145 có thể sống trong môi trường có độ mặn 0‰, nhưng sinh

khối khô ($2,18 \pm 0,71$ g/L) và lipit tổng số ($15,32 \pm 0,68$ % trọng lượng sinh khối khô) có giá trị rất thấp. Sinh khối khô và hàm lượng chất béo tổng số đạt cao nhất ở độ mặn 15‰ lần lượt là $12,67 \pm 0,12$ g/L và $40,04 \pm 0,15$ % trọng lượng sinh khối khô, tương ứng, sau 5 ngày nuôi cấy. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa độ mặn 15‰ với các độ mặn thử nghiệm khác ($p < 0,05$). Như vậy, độ mặn 15‰ là thích hợp nhất cho sinh trưởng và tích lũy chất béo của chủng KG145.

Khảo sát ảnh hưởng của chế độ lắc (tĩnh và nuôi lắc 100, 200, 300 vòng/phút) đến sinh trưởng và tích lũy chất béo của chủng KG145 được thể hiện trên Bảng 2. Kết quả Bảng 2 đã cho thấy điều kiện lắc có ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng và tích lũy lipit của chủng KG145. Khi nuôi tĩnh, chủng KG145 sinh trưởng rất chậm sau 5 ngày nuôi SKK chỉ đạt $1,53 \pm 0,37$ g/L và hàm lượng lipit đạt $5,08 \pm 0,61$ % trọng lượng sinh khối khô. Trong khi đó, khi nuôi lắc với tốc độ 100, 200 và 300 vòng/phút thì sinh trưởng và hàm lượng chất béo đạt lần lượt là $7,68 \pm 0,21$; $13,42 \pm 0,33$; $13,46 \pm 0,14$ g/L và $25,06 \pm 1,24$; $40,16 \pm 1,35$; $39,67 \pm 1,13$ % trọng lượng sinh khối khô, tương ứng. Không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa 2 tốc độ lắc 200 và 300 vòng/phút. Không có sự khác nhau này vì sinh khối và hàm lượng chất béo còn phụ thuộc vào môi trường dinh dưỡng và thể tích nuôi. Do đó, việc nuôi lắc 200 vòng/phút để nuôi cấy chủng KG145 trong bình tam giác và lắc 300 vòng/phút khi nuôi cấy trong bình lên men được đề xuất.

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy chủng *A. mangrovei* KG145 có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong các điều kiện nguồn cacbon là glucoza, nguồn nitơ là cao nấm men, nhiệt độ 25°C, độ mặn 15‰ và chế độ nuôi lắc 200 vòng/phút. Sinh khối khô và hàm lượng chất béo cao nhất đạt $13,42 \pm 0,33$ g/L và $40,16 \pm 1,35$ % trọng lượng sinh khối khô, tương ứng, sau 5 ngày nuôi cấy.

Đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng KG145 trong hệ thống lên men 30 Lít, môi trường M2 có nồng độ glucoza 9%, cao nấm men 1% và chế độ khuấy sục 300 vòng/phút. Kết quả sinh trưởng và hàm lượng chất béo của chủng KG145 sau 5 ngày nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng và tích lũy chất béo ở chủng *A. mangrovei* KG145 khi nuôi cấy trong hệ thống lên men 30 Lít sau 6 ngày

Ngày	MĐTB ($\times 10^6$ TB/mL)	SKK (g/L)	Hàm lượng chất béo (% SKK)
------	-----------------------------	-----------	----------------------------

1	$24,27 \pm 0,02$	$4,34 \pm 0,17$	$7,85 \pm 0,01$
2	$48,96 \pm 0,37$	$10,96 \pm 0,51$	$12,84 \pm 0,09$
3	$112,04 \pm 1,25$	$24,81 \pm 0,34$	$30,69 \pm 0,18$
4	$138,15 \pm 1,63$	$30,75 \pm 0,39$	$45,70 \pm 0,54$
5	$160,24 \pm 0,51$	$33,16 \pm 0,72$	$72,06 \pm 0,08$
6	$152,26 \pm 1,28$	$30,15 \pm 0,07$	$66,33 \pm 0,15$

Kết quả Bảng 3 cho thấy khả năng sinh trưởng và hàm lượng chất béo tăng dần qua các ngày nuôi cấy và đạt cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy. Mật độ tế bào, sinh khối khô và hàm lượng chất béo của chủng KG145 cao nhất đạt $160,24 \pm 0,51 \times 10^6$ TB/mL, $33,16 \pm 0,72$ g/L và $72,06 \pm 0,08$ % trọng lượng sinh khối khô, tương ứng.

Sinh khối thu được sau 5 ngày nuôi cấy được gửi đi phân tích thành phần axit béo tại Trung tâm UPSCIENCE VIETNAM (Khu phố 1B, Phường An Phú, Thành phố Thuận An, Tỉnh Bình Dương, Việt Nam). Phụ lục kết quả phân tích số: UVN2302781. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Thành phần axit béo của chủng *A. mangrovei* KG145 sau 5 ngày

STT	Axit béo	Hàm lượng axit béo (% TFA)	Hàm lượng axit béo (mg/100g)
1	C12: 0	0,19	87,45
2	C14: 0	5,07	2280,29
3	C15: 0	4,14	1844,62
4	C16: 0	47,28	20892,31
5	C16: 1 ω -9	0,13	56,99
6	C16: 1 ω -7	0,42	184,13
7	C16: 4	0,04	17,12
8	C17: 0	1,13	495,66
9	C18: 0	0,16	69,72
10	C18: 1 Cis	0,53	229,32
11	C18: 2 trans	0,07	30,07
12	C18: 2 ω -6	0,07	30,07
13	C18: 3 ω -6	0,04	17,06
14	C18: 2 ω -3	0,08	34,12
15	C18: 4 ω -3	0,18	76,21
16	C20: 0	0,19	81,86

17	C20: 3 ω -6	0,17	71,83
18	C20: 4 ω -6	0,13	54,57
19	C20: 4 ω -3	0,65	272,83
20	C20: 5 ω -3 (EPA)	0,79	329,40
21	C22: 0	0,11	46,95
22	C22: 1 ω -7	0,22	93,35
23	C22: 5 ω -6 (DPA)	5,62	2327,88
24	C22: 5 ω -3 (DPA)	0,15	62,13
25	C22: 6 ω -3 (DHA)	32,34	13313,97
26	C24: 0	0,10	42,35
Tổng axit béo omega - 3		34,19	14088,66
Tổng axit béo omega - 6		6,03	2501,41
Tổng axit béo omega - 9		0,27	117,57
Tổng axit béo dạng trans		0,07	30,07
Tổng axit béo bão hòa		58,37	25841,23
Tổng axit béo bão hòa một nối đôi (MUFA)		1,30	563,79
Tổng axit béo không bão hòa đa nối đôi (PUFA)		40,33	16637,26
Tổng các axit béo		100,00	43042,28

Kết quả Bảng 4 cho thấy sinh khối của chủng KG145 giàu các axit béo không bão hòa đa nối đôi (PUFA) chiếm 40,33 % so với TFA. Hàm lượng các axit béo omega 3, 6 và 9 lần lượt chiếm 34,19; 6,03 và 0,27 % so với TFA, tương ứng. Trong đó, thành phần axit béo có chứa chủ yếu là các axit béo C16:0 (47,28 % so với TFA), DHA (32,34 % so với TFA), EPA (0,79 % so với TFA), DPA (5,77% so với TFA).

Ví dụ 3. Đánh giá khả năng tổng hợp squalen, carotenoit và astaxathin

Để đánh giá khả năng tổng hợp squalen, carotenoit và astaxanthin, tiến hành nuôi cấy chủng *A. mangrovei* KG145 trong hệ thống lên men 30 lít, môi trường M2. Kết quả được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng squalen, carotenoit và astaxanthin trong sinh khối của chủng *A. mangrovei* KG145 ở hệ thống lên men 30 Lít

	1 ngày	3 ngày	5 ngày	6 ngày
Squalen (mg/g SKK)	85,15 $\pm$ 0,43	62,76 $\pm$ 1,53	45,27 $\pm$ 0,28	30,01 $\pm$ 1,08

Carotenoit ($\mu\text{g/g SKK}$)	$12,06 \pm 0,35$	$23,87 \pm 0,69$	$32,15 \pm 0,62$	$30,09 \pm 1,01$
Astaxanthin ($\mu\text{g SKK}$)	$1,22 \pm 0,06$	$2,98 \pm 0,75$	$8,52 \pm 0,39$	$5,57 \pm 0,32$

Kết quả trên Bảng 5 cho thấy hàm lượng squalen có xu hướng giảm dần qua các ngày nuôi cấy, trong khi đó hàm lượng carotenoit và astaxanthin lại tăng dần tỉ lệ thuận với sinh khối. Hàm lượng squalen cao nhất đạt $85,15 \pm 0,43$ mg/g sinh khối khô sau 1 ngày nuôi cấy. Hàm lượng carotenoit và astaxanthin cao nhất đạt $32,15 \pm 0,62$ và $8,52 \pm 0,39$ μg /g sinh khối khô, tương ứng, sau 5 ngày nuôi cấy và giảm dần ở các ngày tiếp theo. Như vậy, chủng KG145 có tiềm năng cho sản xuất squalen, carotenoit và astaxanthin với hàm lượng tích lũy cao.

Ví dụ 4. Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn chứng người

Sinh khối chủng KG145 có chứa các axit béo omega – 3, như DHA, EPA và DPA thu được từ quá trình nuôi cấy được thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn trên mô hình động vật.

+ Đánh giá độc tính cấp:

Đánh giá về tính an toàn của sinh khối chủng *A. mangrovei* KG145 được tiến hành đánh giá độc tính cấp bằng cách tiến hành thử nghiệm với chuột nhắt trắng. Chuột nhắt trắng khỏe mạnh được chia ngẫu nhiên thành 7 lô và cho sử dụng sinh khối *A. mangrovei* KG145 ở liều cao 50 g/kg thể trọng bằng cách cho chuột ăn sinh khối và theo dõi trong 72 giờ để tìm LD₅₀. Kết quả thể hiện trên bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độc tính cấp của sinh khối chủng KG145 trên chuột

Lô chuột	Số chuột thử nghiệm	Tổng khối lượng sinh khối/1kg thể trọng	Số chuột sống/chết sau 72 giờ
Lô 1	12	20	12/0
Lô 2	12	25	12/0
Lô 3	12	30	12/0
Lô 4	12	35	12/0
Lô 5	12	40	12/0
Lô 6	12	45	12/0
Lô 7	12	50	12/0

Kết quả thể hiện trên Bảng 6 cho thấy, chưa tìm được liều LD₅₀. Điều này chứng tỏ sinh khối chủng KG145 an toàn và không gây độc cho động vật.

+ *Đánh giá độc tính bán trường diễn:*

Tiến hành đánh giá độc tính bán trường diễn của sinh khối chủng KG145, thử nghiệm được thực hiện trên đối tượng là thỏ. Thỏ nhà được phân thành các lô thử nghiệm, mỗi lô 6 con bao gồm lô ĐC (uống nước cất), lô TN1 và lô TN2 được uống sinh khối chủng KG145 với 2 mức liều 300 mg/kg thể trọng (TN1) và 600 mg/kg thể trọng (TN2) liên tục trong 30 ngày. Sau đó, các thông số như khối lượng cơ thể, chỉ số huyết học, chức năng gan, thận và tim thỏ thử nghiệm đã được xác định. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của sinh khối chủng KG145 lên trọng lượng cơ thể thỏ

Thời điểm xét nghiệm	Thể trọng (g)			
	Lô ĐC (1)	Lô TN 1 (2)	Lô TN 2 (3)	p _{so} sánh giữa các lô
Trước thử nghiệm (a)	2,08 ± 0,11	2,03 ± 0,21	2,05 ± 0,42	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	2,23 ± 0,14	2,32 ± 0,34	2,24 ± 0,51	p ₃₋₁ > 0,05
Sau 4 tuần (c)	2,27 ± 0,25	2,36 ± 0,51	2,39 ± 0,24	p ₃₋₂ > 0,05
p _{so} sánh trong cùng lô	p _{b, c-a} < 0,01; p _{c-b} < 0,01			
Số lượng hồng cầu thỏ (x10 ¹² g/L)				
Trước thử nghiệm (a)	4,41 ± 0,31	5,57 ± 0,45	5,16 ± 0,27	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	4,38 ± 0,62	5,64 ± 0,20	5,30 ± 0,25	p ₃₋₂ > 0,05
Sau 4 tuần (c)	4,59 ± 0,38	5,85 ± 0,38	5,47 ± 0,39	p ₃₋₁ > 0,05
p _{so} sánh trong cùng lô	p _{b, c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-
Hàm lượng bạch cầu (10 ⁹ /L)				
Trước thử nghiệm (a)	9,46 ± 1,17	9,13 ± 1,22	6,41 ± 10,20	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	7,24 ± 1,19	8,61 ± 1,44	6,75 ± 10,31	p ₃₋₂ > 0,05
Sau 4 tuần (c)	7,42 ± 0,57	7,40 ± 1,78	7,79 ± 11,35	p ₃₋₁ > 0,05
p _{so} sánh trong cùng lô	p _{b, c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-
Hb (g/L)				
Trước thử nghiệm (a)	106,01 ± 12,58	118,20 ± 8,09	126,30 ± 8,22	p ₂₋₁ > 0,05
Sau 2 tuần (b)	110,32 ± 12,91	115,77 ± 6,08	123,28 ± 7,68	p ₃₋₂ > 0,05
Sau 4 tuần (c)	125,26 ± 6,01	126,38 ± 5,76	125,10 ± 6,01	p ₃₋₁ > 0,05
p _{so} sánh trong cùng lô	p _{b, c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05			-

Số lượng tiểu cầu ($10^9/L$)				
Trước thử nghiệm (a)	$358,42 \pm 38,71$	$346,37 \pm 63,84$	$309,32 \pm 61,28$	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	$416,39 \pm 38,21$	$377,23 \pm 50,25$	$312,51 \pm 84,53$	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	$291,62 \pm 35,50$	$284,21 \pm 43,45$	$392,89 \pm 31,35$	$p_{3-1} > 0,05$
$p_{\text{so sánh}}$ trong cùng lô	$p_{b, c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			
Số lượng tiểu cầu (g/L)				
Trước thử nghiệm (a)	$364,25 \pm 50,39$	$339,46 \pm 61,15$	$381,24 \pm 41,19$	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	$413,21 \pm 40,10$	$398,12 \pm 54,51$	$398,81 \pm 56,13$	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	$287,35 \pm 48,57$	$276,35 \pm 51,45$	$301,45 \pm 62,56$	$p_{3-1} > 0,05$
$p_{\text{so sánh}}$ trong cùng lô	$p_{b, c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả trên Bảng 7 cho thấy khối lượng cơ thể thỏ giữa các lô dùng sinh khối chủng KG145 (liều 1: 300 mg/kg TLCT, liều 2: 600 mg/kg TLCT) và nhóm đối chứng (uống nước cất liều 0,5 mL/kg TLCT/ngày) trong 30 ngày liên tục đã không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh tại cùng thời điểm ($p > 0,05$). Như vậy, việc dùng sinh khối chủng KG145 liên tục trong 30 ngày không gây ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường về khối lượng cơ thể của thỏ.

Khi thỏ uống sinh khối chủng KG145 với các mức liều 300 và 600 mg/kg TLCT/ngày liên tục trong 30 ngày, các chỉ tiêu chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, bạch cầu, hemoglobin) khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng ($p > 0,05$) (Bảng 7). Như vậy, sinh khối chủng KG145 giàu DHA được sử dụng ở các mức liều 300 và 600 mg/kg TLCT/ngày liên tục trong 30 ngày không làm thay đổi các chỉ tiêu chức năng tạo máu của thỏ thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của sinh khối chủng KG145 đến hoạt độ của các enzym aspartate transaminaza (AST) và alanine transaminaza (ALT), creatinin của thỏ trong thí nghiệm thu được được thể hiện ở Bảng 8. Kết quả cho thấy hoạt độ của AST, ALT và creatinin của thỏ sau khi dùng sinh khối chủng KG145 ở các mức liều trong thí nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Do đó, có thể kết luận sinh khối chủng KG145 không gây ảnh hưởng đến chức năng gan, thận của thỏ.

Bảng 8. Ảnh hưởng của chủng KG145 lên các chỉ số hoạt độ AST, ALT, creatinin trong máu thỏ

Thời điểm xét nghiệm	Lô ĐC (1)	Lô TN 1 (2)	Lô TN 2 (3)	Pso sánh giữa các lô
Hoạt độ AST (UI/L)				
Trước thí nghiệm (a)	270,34 ± 19,05	27485 ± 21,11	285,75 ± 16,37	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	305,65 ± 22,31	315,24 ± 21,15	318,54 ± 21,15	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b-a} > 0,05$			-
Hoạt độ ALT (UI/L)				
Trước thí nghiệm (a)	191,43 ± 19,87	213,48 ± 11,27	225,45 ± 19,34	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	198,71 ± 20,04	216,39 ± 10,96	227,57 ± 12,57	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b-a} > 0,05$			-
Creatinin (μmol/L)				
Trước thí nghiệm (a)	53,48 ± 5,88	61,43 ± 9,78	63,05 ± 10,01	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	56,37 ± 5,69	60,28 ± 9,17	65,43 ± 11,54	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b-a} > 0,05$			-

Như vậy, thỏ cho uống sinh khối chủng KG145 giàu DHA, EPA, DPA, squalen, carotennoit và astaxanthin ở các mức liều 300 mg và 600 g/kg TLCT/ngày trong 30 ngày liên tục đảm bảo an toàn, không làm thay đổi các chỉ số huyết học, không làm tổn thương tế bào gan, chức năng gan và thận ở thỏ thí nghiệm.

Ví dụ 5. Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập của chuột nhắt trắng khi sử dụng sinh khối KG145

Để đánh giá hiệu quả cải thiện trí nhớ, khả năng học tập trên chuột khi sử dụng sinh khối chủng KG145. Các thử nghiệm được đánh giá trên khả năng xử lý thông tin, tập tính phản xạ tìm kiếm thức ăn trong mê lộ của chuột nhắt trắng. Sự hình thành phản xạ bền vững và dập tắt các phản xạ ở chuột nhắt trắng được hình thành trong quá trình tìm kiếm thức ăn trong mê lộ.

Chuột được phân thành các lô với ô ĐC cho uống nước cất liều 0,5 mL/kg thể trọng/ngày; Lô TN 1: uống sinh khối tảo liều 1250 mg/kg thể trọng/ngày; Lô TN 2: uống

sinh khối tảo liều 5000 mg/kg thể trọng/ngày. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả đo phản xạ tìm kiếm thức ăn trong mê lộ trên chuột nhắt trắng

Lô	Số lần tập để có phản xạ bền vững	Số lần tập không củng cố để dập tắt phản xạ	Thời gian thực hiện phản xạ (giây)
ĐC	19,20 ± 2,58	20, 01 ± 2,15	38,21 ± 2,18
Lô TN1	11,75 ± 2,65	14,35 ± 2,41	21,09 ± 1,15
Lô TN2	11,81 ± 2,43	14,14 ± 1,43	21,67 ± 2,34

Kết quả được đánh giá bằng thời gian để chuột nhắt trắng chạy đến đích (nơi có thức ăn) mà không dừng ở dọc đường sau khi chuột được uống sinh khối chủng KG145 liên tục trong 30 ngày với 2 mức liều 1250 và 5.000 mg/kg thể trọng. Khi so sánh về sự hình thành phản xạ bền vững và dập tắt phản xạ ở chuột nhắt trắng ở lô TN1 và lô TN2 có số lần tập để có phản xạ bền vững nhanh hơn so với lô đối chứng, sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Khi khảo sát số lần tập để dập tắt phản xạ khi cắt bỏ tín hiệu có điều kiện, sự khác biệt giữa các lô nghiên cứu có ý nghĩa thống kê so với lô đối chứng. Thời gian cần thiết để thực hiện phản xạ cả 2 lô thí nghiệm được uống sinh khối chủng KG145 đều nhanh hơn so với đối chứng khi thử trong cùng điều kiện và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Như vậy, sinh khối chủng KG145 giàu DPA, DHA, squalen, carotenoit và astaxanthin có tác dụng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập trên động vật thử nghiệm (chuột nhắt trắng), cung cấp cơ sở khoa học cho việc sử dụng sinh khối chủng KG145 làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

Như vậy, các kết quả thu được đã cho thấy sử dụng sinh khối tảo chủng KG145 liên tục trong 30 ngày là an toàn và có tác dụng tốt cho trao đổi lipid máu, có tác dụng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập. Các kết quả này cho phép khẳng định có thể sử dụng sinh khối tảo chủng KG145 theo định hướng làm nguyên liệu cho dược phẩm.

Ví dụ 6. Đánh giá tác dụng giảm lipid máu

Từ sinh khối nuôi cấy chủng KG145, tiến hành phân lập squalen bằng phương pháp sắc ký cột để thu squalen với độ tinh sạch > 90%. Thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của squalen lên hàm lượng lipid nội bào (cholesterol và triglycerit) trên dòng tế bào HepG2 được thực hiện. Tế bào HepG2 được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng trong thời gian 24 giờ và sau đó được ủ với squalen ở các nồng độ khác nhau (50 đến 100 μM),

fenofibrat (10 μM), 0,1 % DMSO trong vòng từ 24 đến 72 giờ. Hàm lượng lipid nội bào (cholesterol và triglycerit) được xác định bằng phương pháp enzym và đo trên máy phân tích tự động Olympus AU400 (Olympus Analyzers, Tokyo, Japan). Kết quả được trình bày ở Bảng 10.

Bảng 10. Ảnh hưởng của squalen thu được từ chủng KG145 đối với sự tích lũy hàm lượng cholesterol (A); triglycerit (B) trong tế bào HepG2.

	Mức độ biểu hiện (%)	
	Cholesterol	Triglycerit
Đối chứng (-) (0,01% DMSO)	100	100
Đối chứng (+) (fenofibrat 10 μM)	80	70
Squalen - 50 μM	70	83
Squalen - 100 μM	78	65

Kết quả thể hiện trên bảng 10 cho thấy, nồng độ cholesterol nội bào giảm trong các tế bào được ủ với squalen hoặc fenofibrat (chất chuẩn điều trị giảm rối loạn lipid máu) khi so sánh với đối chứng. Tế bào được ủ với 100 μM squalen có tác dụng giảm mức độ biểu hiện của cholesterol xuống còn 88% khi so sánh với đối chứng. Khi tế bào được ủ với 50 và 100 μM squalen cũng làm giảm mức độ biểu hiện của TG nội bào tương ứng xuống 83 và 65% khi so sánh với đối chứng ($p < 0,05$). Do đó, squalen thu được từ sinh khối KG145 có tác dụng giảm cholesterol và TG trong tế bào gan HepG2. Do đó, chủng KG145 có thể nuôi cấy sinh khối để thu squalen để cung cấp nguyên liệu cho dược phẩm trong điều trị giảm lipid máu.

Ví dụ 7. Đánh giá khả năng phát triển nhiên liệu sinh học

Theo kết quả phân tích thành phần axit béo của chủng *A. mangrovei* KG145 trong hệ thống lên men 30 lít sau 5 ngày (Bảng 4) cho thấy trong sinh khối chủng KG145 có chứa lượng lớn các axit béo không bão hòa chiếm 40,33% TFA. Bên cạnh đó, chúng cũng có chứa các axit béo bão hòa chiếm 58,37% TFA. Vì vậy, tiến hành tách chiết các axit béo không bão hòa (PUFA) ra khỏi các axit béo bão hòa (SFA) bằng các phương pháp hóa học. Sinh khối chủng KG145 được tiến hành phản ứng chuyển vị este với dung môi metanol và chất xúc tác axit, tỉ lệ dung môi: sinh khối là 10:1 (v/w), phản ứng ở điều kiện 70 °C, 3 giờ. Lọc bỏ bã sinh khối và tách chiết axit béo tổng số (TFA) bằng dung môi n-hexan. Kết quả đã thu được hàm lượng TFA chiếm 45% sinh khối khô.

Tiến hành làm phản ứng tạo phức TFA với hỗn hợp urê hòa tan trong metanol, tỉ lệ TFA: urê: dung môi là 1:4: 20 (w/w/v), phản ứng ở 4°C, 12 giờ, hỗn hợp phân thành 2 pha. Lọc tách pha, thu pha rắn là hỗn hợp urê có SFAs và PUFAs, pha lỏng chứa hỗn hợp PUFAs. Hòa tan pha rắn trong nước và tách chiết SFA.

Kết quả đã thu được hỗn hợp SFAs (chiếm 63% TFA) và hỗn hợp PUFAs (chiếm 31% TFA). Kết quả phân tích thành phần axit béo của hỗn hợp SFAs được trình bày ở Bảng 11.

Bảng 11. Thành phần axit béo của hỗn hợp SFAs sau quá trình tạo phức với urê

STT	Axit béo	Hàm lượng axit béo (% TFA)
1	C7: 0	0,42
2	C14: 0	8,12
3	C15: 1 n-5	6,53
4	C16: 0	68,75
5	C17: 0	2,13
6	C18: 0	3,48
7	C18: 1 n-9	3,54
8	C18: 2 ω-6-t	1,75
9	C19: 0	0,39
10	C20: 4 ω-6	1,76
11	C22: 6 ω-3	3,06
Tổng axit béo bão hòa		83,29
Tổng axit béo bão hòa một nối đôi		10,07
Tổng axit béo không bão hòa đa nối đôi		6,57
Mức độ không bão hòa		0,39

Ghi chú: Mức độ không bão hòa = $[1 \times (\% \text{ monene}) + 2 \times (\% \text{ diene}) + 3 \times (\% \text{ Triene}) \dots] / 100$

Kết quả Bảng 11 cho thấy, hỗn hợp SFA có chứa chủ yếu là các axit béo bão hòa chiếm 83,29% TFA. Hàm lượng các axit béo không bão hòa 1 nối đôi và đa nối đôi chiếm lần lượt là 10,07 và 6,57% TFA, tương ứng. Từ đó, đã xác định được các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm diesel.

Kết quả chỉ tiêu chất lượng diesel sinh học từ Bảng 12 cho thấy, sản xuất biodiesel từ sinh khối chủng KG145 đạt 5/5 chỉ tiêu chính đều đạt tiêu chuẩn của Hoa Kỳ và châu

Âu đối với dầu diesel sinh học (B100). Các SFA có chứa chủ yếu các axit béo bão hòa có tiềm năng sử dụng để sản xuất nhiên liệu sinh học.

Bảng 12. Kết quả xác định chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm diesel sinh học

STT	Các chỉ tiêu của diesel sinh học	Phương trình lý thuyết	Diesel sinh học từ KG145	Mức cho phép (theo US và EP) B100
1	Trọng lượng riêng ở 15 °C (kg/m ³)	$Y = 0,0055X + 0,8726;$ ($R^2 = 0,6644$)	875	860 - 900
2	Độ nhớt động học ở 40 °C	$Y = -0,631X + 5,2065;$ ($R^2 = 0,6704$)	4,96	1,9 - 6,0
3	Điểm chớp cháy cốc kín	$Y = 31,598X + 118,71;$ ($R^2 = 0,6364$)	131,03	Min 130
4	Chỉ số iod (g I ₂ /100 g)	$Y = 74,373X + 12,71;$ ($R^2 = 0,9484$)	41,72	Max 120
5	Trị số xetan	$Y = -6,6684X + 62,876;$ ($R^2 = 0,8049$)	65,477	Min 47

Ghi chú: X: mức độ không bão hòa của các axit béo chứa sản phẩm FAME. Y: chỉ tiêu đặc trưng cho tính chất của sản phẩm diesel sinh học.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập theo sáng chế có khả năng sản xuất polysacarit ngoại bào, tổng hợp các axit béo không bão hòa đa nối đôi DHA, EPA, DPA, squalen, carotenoit và astaxanthin cao ngay trong quá trình tăng trưởng về sinh khối. Chủng này có ưu điểm là có thể sản xuất sinh khối tảo này quanh năm, không phụ thuộc vào mùa vụ và nhiệt độ trong năm vì không sử dụng ánh sáng mặt trời. Quá trình nuôi vi tảo dễ dàng kiểm soát các thông số cần thiết trong suốt quá trình nhân nuôi sinh khối, từ đó chủ động cho việc phát triển các sản phẩm sinh học cần thiết.

Sinh khối tảo *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 có hàm lượng axit béo đơn giản, nhân nuôi sinh khối dễ dàng trong các hệ thống lên men, có tiềm năng cho sản xuất sinh khối giàu các axit béo không bão hòa đa nối đôi, đặc biệt là các axit béo như DHA, EPA và DPA trên quy mô công nghiệp. Các axit béo DHA, EPA và DPA là các axit béo omega - 3 và omega - 6 quan trọng cần thiết sự phát triển của trí não, hệ thần kinh, hệ tim mạch của con người, cần thiết làm thức ăn cho nuôi trồng thủy sản, gia súc gia cầm

nên cho phép phát triển các nguồn dưỡng chất cho người và động vật, để làm thực phẩm chức năng và thức ăn bổ sung.

Trong quá trình nuôi cấy thử nghiệm, chủng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 có năng suất sinh khối, hàm lượng chất béo đạt $33,16 \pm 0,72$ g/L, $72,06 \pm 0,08$ % sinh khối khô, tương ứng. Hàm lượng EPS (bao gồm protein, lipid và cacbohydrat đạt $21,21 \pm 0,43\%$, $15,76 \pm 0,76\%$ và $28,03 \pm 1,25\%$ trọng lượng EPS, tương ứng). Hàm lượng DHA, EPA, DPA, squalen, carotenoit và astaxanthin cao nhất đạt 32,34 % so với TFA, 0,79 % so với TFA, 5,77% so với trọng lượng TFA, $85,15 \pm 0,43$ mg/g sinh khối khô, $32,15 \pm 0,62$ và $8,52 \pm 0,39$ $\mu\text{g/g}$ sinh khối khô. Như vậy, chủng này có hiệu quả vượt trội trong việc tổng hợp các chất béo, axit béo không bão hòa đa nối đôi so với các chủng tiềm năng sản xuất axit béo PUFA được công bố.

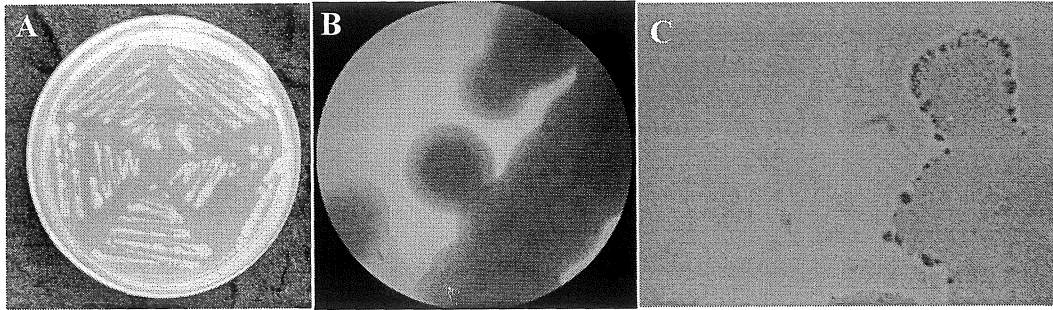
Sinh khối của chủng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 có thể ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người, mỹ phẩm, dược phẩm, nhiên liệu sinh học và thức ăn cho động vật nuôi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

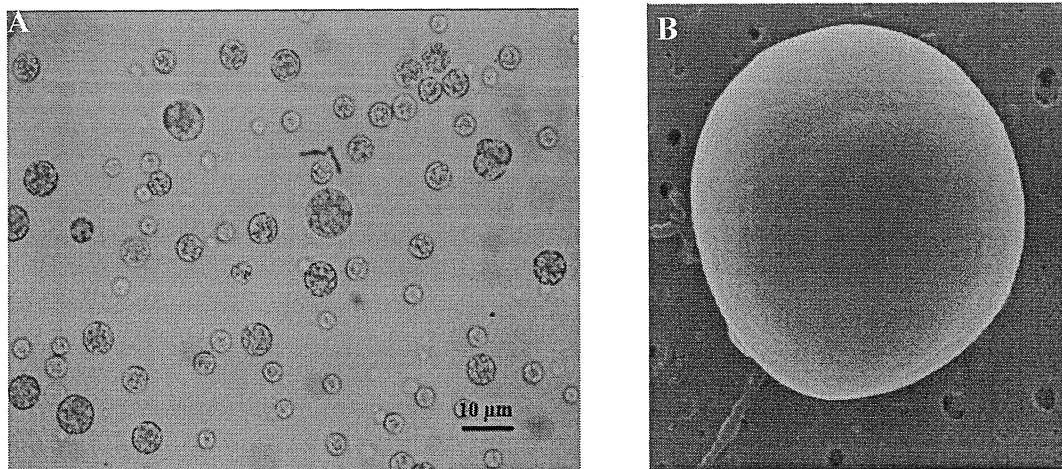
1. Chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập, trong đó chủng này:

- chứa trình tự 18S rARN nêu trong SEQ ID NO.1 có kích thước 1714bp và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số lưu giữ KG145;
- có khả năng sản xuất polysacarit ngoại bào với protein đạt $21,21 \pm 0,43\%$, lipid đạt $15,76 \pm 0,76\%$ và cacbohydrat đạt $28,03 \pm 1,25\%$ (theo trọng lượng) so với tổng polysacarit ngoại bào;
- có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi so với axit béo tổng số bao gồm axit docosahexaenoic (DHA) đạt 32,34%, axit eicosapentaenoic (EPA) đạt 0,79% và axit docosapentaenoic (DPA) đạt 5,77% (theo trọng lượng); và
- có khả năng sinh tổng hợp squalen lên tới $85,15 \pm 0,43$ mg/g sinh khối khô, carotenoid lên tới $32,15 \pm 0,62$ µg/g sinh khối khô và axtasanthin lên tới $8,52 \pm 0,39$ µg/g sinh khối khô ở điều kiện 25 °C, độ mặn 15‰, glucoza 9%, cao nấm men 1%.

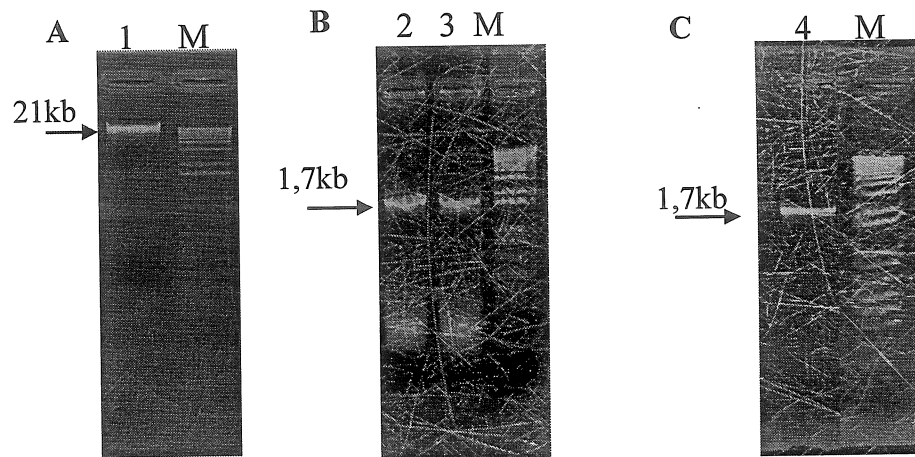
HÌNH 1



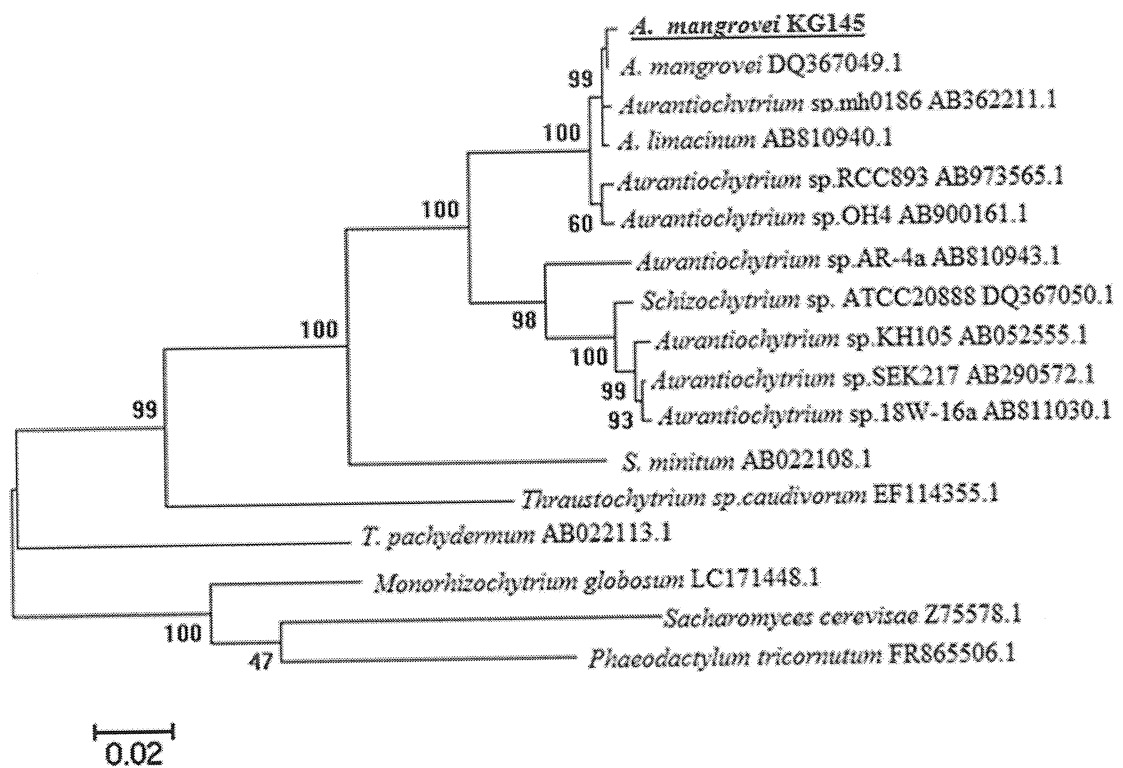
HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4



HÌNH 5







ANALYTICAL REPORT

(REV20240701)

ADH Aida - Aqua team
7th Floor, Tower 1, Saigon Center, 65 Le Loi street, District 1, HCM City

Tel. - Fax:
Address: Ph. Vao

SAMPLE INFORMATION

Sample name: ALGA PHAUCUR

Date of report: 06/05/2024
Order ref: 00000000000000000000
Client Code: CL0001
Issue No.: 1

Sample condition: SAMPLE IN PLASTIC BAG

Date of reception: 06/05/2024
Analysis start: 06/05/2024
Analysis completion: 06/05/2024

Sample condition: SAMPLE IN PLASTIC BAG

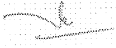
Quantity (g/l): 600.00

TEST RESULTS

Specification(s)	Method	Unit	Result
Extr. act (g/l)	ISO 12256-2:2017 (C1)	-	See additional(5)
Crude fiber	AOAC 84-65 (C1)	g/100g	7.94
Crude fat (g/kg)	AOAC 94-16 (C1); 2001 (S0)	g/100g	12.61
Crude protein (g/kg)	AOAC 94-16 (C1)	g/100g	0.81
Total Phosphorus	AOAC 2005-11 (C1)	g/100g	14.72
Phenol	EC 1522:2005 (C1)	g/100g	16.38

TECHNICAL COMMENTS

APPROVAL


Pham Tran Pham Tran
Laboratory Operations Manager

(*) Substrate used and (b) When accepted and (f) Description of chemical product and additional test (s). This is Description of chemical product

This report shall not be reproduced except in full, without the written approval of the laboratory.

ISSUED BY: CHAMP
(Print name, Position and Date, Stamp of the Lab, Stamp of the Testing Lab, Stamp of the Client, Stamp of the Analyst, Stamp of the Laboratory)

Page 1 of 1

Page 1 of 1

upsscience
LAB EQUIPMENT

Annex N° : UVN2302781

Observations :	Date of test :	08.02.23
	Tested by :	015865

FATTY ACIDS PROFILE

Expression in % relative fat* and in "mg/100 g of sample"

Fatty acids		% rel	mg/100 g
Butyric acid	C 4:0	nd	nd
Valeric acid	C 5:0	nd	nd
Caproic acid	C 6:0	nd	nd
Heptanoic acid	C 7:0	nd	nd
Caprylic acid	C 8:0	nd	nd
Pelargonic acid	C 9:0	nd	nd
Capric acid	C 10:0	nd	nd
Caproleic acid	C 10:1	nd	nd
Undecanoic acid	C 11:0	nd	nd
Lauroic acid	C 12:0	0.19	87.45
Lauroleic acid	C 12:1	nd	nd
11-methyl dodecanoic acid	C 13:0 iso	nd	nd
10-methyl dodecanoic acid	C 13:0 anteiso	nd	nd
	Sum of C 13:0	0.00	0.00
Isomylstic acid	C 14:0 iso	nd	nd
Myristic acid	C 14:0	5.07	2280.2
	Sum of C 14:0	5.07	2280.2
Myristoleic acid	C 14:1 n-5	nd	nd
13-methyl tetradecanoic acid	C 15:0 iso	nd	nd
12-methyl tetradecanoic acid	C 15:0 anteiso	nd	nd
Pentadecanoic acid	C 15:0	4.14	1344.5
	Sum of C 15:0	4.14	1344.5
Cis-15-pentadecenoic acid	C 15:1 n-5	nd	nd
Isopalmitic acid	C 16:0 iso	nd	nd
Palmitic acid	C 16:0	47.28	20892.3
	Sum of C 16:0	47.28	20892.3
Hypogelcic acid	C 16:1 n-9	0.13	56.5
Palmitoleic acid	C 16:1 n-7	0.42	184.4
	C 16:1	nd	nd
Hexadecenoic acid (8 other isomers)	C 16:1	0.55	241.1
	Sum of C 16:1	0.55	241.1
Hexadecadienoic acid	C 16:2	nd	nd
Hexadecatrienoic acid	C 16:3	nd	nd
Hexadecatetraenoic acid	C 16:4	0.04	17.1

Annex N° : UJVN2302781				(cont.)
FATTY ACIDS PROFILE				
Expression in " % relative fat" and in "mg/100 g of sample"				
Fatty acids		% rel	mg/100 g	
...				
Isomargaric acid	C 17:0 iso	nd	nd	
14-methyl hexadecanoic acid	C 17:0 anteiso	nd	nd	
Vaccenic acid	C 17:1	1.13	495.66	
	Sum of C 17:0	1.13	495.66	
14-methyl cis-8-heptadecenoic acid	C 17:1 n-8	nd	nd	
9-cis-heptadecenoic acid	C 17:1 n-8	nd	nd	
	Sum of C 17:1	0.00	0.00	
Isostearic acid	C 18:0 iso	nd	nd	
Stearic acid	C 18:0	0.16	69.72	
	Sum of C 18:0	0.16	69.72	
Trans-4-octadecenoic acid	C 18:1 t4	nd	nd	
Trans-5-octadecenoic acid	C 18:1 n5	nd	nd	
Trans-6-8-octadecenoic acid	C 18:1 n6-8	nd	nd	
Elaidic acid	C 18:1 n9	nd	nd	
Trans-10-octadecenoic acid	C 18:1 n10	nd	nd	
Trans-vaccenic acid	C 18:1 n11	nd	nd	
Trans-12-octadecenoic acid	C 18:1 n12	nd	nd	
	Sum of C 18:1 trans	0.00	0.00	
oleic acid*	C 18:1 c9	0.14	66.97	
Cis-10-octadecenoic acid*	C 18:1 c10	0.97	30.29	
Cis-vaccenic acid	C 18:1 c11	0.32	128.45	
Cis-12-octadecenoic acid	C 18:1 c12	nd	nd	
Cis-13-octadecenoic acid	C 18:1 c13	nd	nd	
Cis-14-octadecenoic acid*	C 18:1 c14	nd	nd	
Cis-15-octadecenoic acid	C 18:1 c15	nd	nd	
Cis-16-octadecenoic acid	C 18:1 c16	nd	nd	
	Sum of C 18:1 cis	0.53	229.32	
	Sum of C 18:1	0.53	229.32	
Linolelaidic acid	C 18:2 n-6 trans	nd	nd	
Octadecadienoic acid (S others trans isomers)	C 18:2 trans	0.07	30.07	
	Sum of C 18:2 trans	0.07	30.07	
Linoleic acid	C 18:2 n-6	0.97	30.07	
Octadecadienoic acid (S others cis isomers)	C 18:2 cis	nd	nd	
	Sum of C 18:2	0.97	30.07	
Ruminic acid (CLA)	CLA c9t11	nd	nd	
Conjugated linoleic acid (CLA)	CLA t9t12c	nd	nd	
Conjugated linoleic acid (CLA + others isomers)	CLA	0.00	0.00	
	Sum of CLA	0.00	0.00	
l-linolenic acid	C 18:3 n-3	0.14	68.14	
l-linolenic acid	C 18:3 n-3	0.04	17.69	
Octatridecenoic acid (S others isomers)	C 18:3 n-3	0.06	34.12	
	Sum of C 18:3	0.24	99.95	
Stearidonic acid	C 18:4 n-3	0.18	75.21	
Octadecatetraenoic acid (S others isomers)	C 18:4	nd	nd	
	Sum of C 18:4	0.18	75.21	
Nonadecanoic acid	C 19:0	nd	nd	
Nonadecanoic acid	C 19:1	nd	nd	

Annex N° : IUVN2302781				(Conti)
FATTY ACIDS PROFILE				
Expression in % relative fat ^a and in mg/100 g of sample ^b				
Fatty acids		% rel	mg/100 g	
Arachidic acid	C 22:0	0.19	81.86	
18:3- α -linolenic acid	C 20:1 n-5	nd		
18:4- α -linolenic acid	C 20:1 n-12	nd		
Stearic acid	C 22:0 n-9	nd		
	Sum of C 20:1	0.00	0.00	
Cis-11,14-eicosadienoic acid	C 23:2 n-6	nd		
Eicosadienoic acid (8 others isomers)	C 20:2	nd		
	Sum of C 20:2	0.00	0.00	
Cis-5,8,11-eicosatrienoic acid	C 23:3 n-9	nd		
Cis-8,11,14-eicosatrienoic acid	C 20:3 n-6	0.17	71.83	
Cis-11,14,17-eicosatrienoic acid	C 20:3 n-3	nd		
	Sum of C 20:3	0.17	71.83	
Arachidonic acid	C 20:4 n-6	0.15	54.87	
Cis-8,11,14,17-eicosatetraenoic acid	C 20:4 n-3	0.85	327.40	
	Sum of C 20:4	0.78	327.40	
Cis-5, 8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (HPLC)	C 20:5 n-3	0.11	46.95	
Behenic acid	C 22:1 n-11	nd		
Cetoleic acid	C 22:1 n-9	nd		
Erucic acid	C 22:1 n-7	0.22	93.38	
Cis-15-docosenoic acid	C 22:1	0.22	93.38	
	Sum of C 22:1	0.22	93.38	
Cis-12,16-docosahexaenoic acid	C 22:2 n-6	nd		
Cis-10,13,15-docosatrienoic acid	C 22:3 n-6	nd		
Cis-10,13,16,19-tetracosatetraenoic acid	C 22:3 n-3	nd		
	Sum of C 22:3	0.00	0.00	
Cis-7,10,13,16-docosapentaeic acid	C 22:4 n-6	nd		
Cis-7,10,13,16,19-pentacosapentaeic acid	C 22:4 n-3	nd		
	Sum of C 22:4	0.00	0.00	
Cis-4,7,10,13,16,19-hexacosapentaeic acid	C 22:5 n-6	0.63	237.67	
Cis-7,10,13,16,19-hexacosapentaeic acid (DPA)	C 22:5 n-3	0.15	62.13	
	Sum of C 22:5	0.77	300.00	
Cis-7,10,13,16,19,21-heptacosahexaenoic acid (HPLC)	C 22:6 n-3	32.34	13319.87	
Tricosanoic acid	C 23:0	nd		
Lignoceric acid	C 24:0	0.10	42.24	
Nervonic acid	C 24:1 n-9	nd		
SUMMARY				
Sum of omega-3	n-3	34.19	14088.64	
Sum of omega-6	n-6	0.03	2501.47	
Sum of omega-9	n-9	0.27	1172.58	
Sum of omega-7	n-7	0.01	39.29	
Sum of Trans 11	n-11	58.31	2554.12	
Saturated fatty acids		1.50	663.73	
Unsaturated fatty acids (MUFA)		40.33	16497.77	
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)		36.00	14849.86	
Total fatty acids		100.00	43042.24	

nd : not present on the chromatogram
 p : Value less than 0.05 % relative or 0.5 mg/100 g
 may contain others isomers

End report

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
 <120> Chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium mangrovei* KG145 được phân lập có khả năng sản xuất polysacarit ngoại bào và axit béo không bão hòa đa nối đôi

<130>

<160> 3

<170>

<210> 1

<211> 1714

<212> ADN

<213> *Aurantiochytrium mangrovei*

<220>

<223> 18S

<400> 1

gtctcaaaga ttaagccatg catgtgtaag tataagcgat tgtactgtga tactgcgaac	60
ggctcatgat atcagtaata tttcttcggt agtttctttt atatggatac ctgcagtaat	120
tctggaaata atacatgctg taagagccct gtatggggct gcacttatta gattgaagcc	180
gattttattg gtgaatcatg ataattgagc agattgactt tttggtcgat gatcgtttga	240
gtttctgccc catcagtggc cgacggtagt gtattggact acggtgacta taacgggtga	300
cggagagtta gggctcgact ccggagaggg agcctgagag acggctacca tatccaagga	360
tagcagcagg cgcgtaaat acccactgtg gactccacga ggtagtgacg agaaatatcg	420
atgcgaagcg tgtatgcgtt ttgctatcgg aatgagagca atgtaaaacc ctcatcgagt	480
atcaactgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcc agaagcatat	540
gctaaagttg ttgcagttaa aaagctcgta gttgaatttc tggcatgggc gaccggtgct	600
ttccctgaat gggattgatt gtctgtgttg ccttgcccat ctttctcatg ctgttattgg	660
tatgagatct ttcactgtaa tcaaagcaga gtgttccaag cgggtcgtat gaccggtatg	720
tttattatgg gatgataaga taggacttgg gtgctatttt gttggtttgc acgcctgagt	780
aatggttaat aggaacagtt gggggatttc gtatttagga gctagagggtg aaattccttg	840
atctccgaaa gacgaactag agcgaaggca tttaccaagc atgttttcgt taatcaagaa	900
cgaaggtctg gggatcgaag atgattagat accatcgtag tctagaccgt aaacgatgcc	960
gacttgcgat tggtgggtgc ttttatgggc ctccagcagca gcacatgaga aatcaaagtc	1020
tttgggttcc ggggggagta tggctcgcaag gctgaaactt aaaggaattg acggaagggc	1080
accaccagga gtggagctgc ggcttaattt gactcaacac gggaaaactt accaggtcca	1140
gacataggta gggttgacag attgagagct ctttcatgat tctattgttg gtggtgcatg	1200
gccgttctta gttggtggag tgatttgtct ggttaattcc gttaacgaac gagacctcgg	1260
cctactaaat agtgcggtgt atggcaacat agtacgtttt taacttctta gagggacatg	1320
tccggtttac gggcaggaag ttcgaggcaa taacagggtc gtgatgccct tagatgttct	1380
gggccgcacg cgcgctacac tgatgggttc atcgggtttt aatttcaatt tttggaattg	1440

agtgccttgggt gggaaggcct ggctaatacct tggaacgctc atcgtgctgg ggctagattt	1500
ttgcaatttt taatctccaa cgaggaattc ctagtaaacg caagtcatca gcttgcattg	1560
tatacgctccc tgccctttgt acacaccgcc cgtcgcacct accgattgaa cgggccgatg	1620
aaaccatggg atgtttctgt ttggattaat ttaggacag aggcagaact cgggtgaatc	1680
ttattgttta gaggaagtaa aagtcgtaac aagg	1714

<210> 2

<211> 20

<212> Nhân tạo

<213> Đoạn mỗi

<220>

<400> 2

AAAGATTAAG CCATGCATGT	20
-----------------------	----

<210> 3

<211> 23

<212> Nhân tạo

<213> Đoạn mỗi

<220>

<400> 1

CAATCGGTAG GTGCGACGGG CGG	23
---------------------------	----