



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0044435

(51)^{2021.01} C12N 1/12; C12P 23/00

(13) B

(21) 1-2022-03556

(22) 07/06/2022

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/12/2023 429A

(71) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Đặng Diễm Hồng (VN); Lê Thị Thơm (VN); Ngô Thị Hoài Thu (VN); Nguyễn Cẩm Hà (VN).

(54) CHỨNG VI TẢO BIẾN DỊ DƯỠNG AURANTIOCHYTRIUM SP. DDH1 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP AXIT BÉO KHÔNG BÃO HÒA ĐA NỐI ĐÔI DOCOSAHEXAENOIC (DHA), SQUALEN, CAROTENOIT, ASTAXANTHIN ỨNG DỤNG LÀM THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE CHO CON NGƯỜI VÀ THỨC ĂN TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

(21) 1-2022-03556

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi như axit béo docosahexaenoic (DHA), đồng thời có khả năng tổng hợp squalen, carotenoit, astaxanthin cao. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến việc nuôi cấy chủng vi tảo biển dị dưỡng này để thu sinh khối tảo có năng suất cao có chứa hàm lượng axit béo DHA cao - một axit béo omega-3 có vai trò quan trọng trong bảo vệ hệ tim mạch, chống viêm, chống ung thư, hỗ trợ cho mắt và phát triển trí não của trẻ em, chống suy giảm trí nhớ. Đồng thời, sáng chế cũng đề cập tới khả năng tích lũy cao của squalen, carotenoit và astaxanthin của chủng vi tảo biển dị dưỡng này cho thấy sinh khối chủng này có thể được sử dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe với tác dụng sinh học là cải thiện trí nhớ, khả năng học tập cho con người và làm thức ăn cho một số động vật nuôi trong nuôi trồng thủy sản.

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* sp. DDH1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi docosahexaenoic (DHA), đồng thời chủng này còn có khả năng tổng hợp squalen, carotenoit, astaxanthin ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người và thức ăn trong nuôi trồng thủy sản.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Được coi là một ngành công nghiệp tạo ra hàng tỷ đô la hàng năm, công nghệ sinh học vi tảo đang ngày càng mở ra nhiều lĩnh vực nghiên cứu mới. Mặc dù vậy, việc sử dụng vi tảo để nâng cao giá trị dinh dưỡng của thực phẩm cho người và thức ăn chăn nuôi vẫn là lĩnh vực chiếm ưu thế, có lợi nhuận cao và tương đối phát triển trong lịch sử. Trong những thập kỷ gần đây, axit béo không bão hòa đa nối đôi (Polyunsaturated fatty acids - PUFAs) đã được quan tâm đặc biệt trong nghiên cứu và ứng dụng trong dinh dưỡng và dược phẩm. PUFAs là các axit béo chuỗi dài (18 - 22 nguyên tử cacbon) có chứa hai hoặc nhiều liên kết cacbon đôi. Trong số các omega 3 (ω -3) PUFAs, axit eicosapentaenoic (EPA, C20: 5 ω -3) và axit docosahexaenoic (DHA, C22: 6 ω -3) đã thu hút được nhiều sự quan tâm nghiên cứu vì vai trò quan trọng của chúng trong việc điều hòa các chức năng sinh học, ngăn ngừa và điều trị một số bệnh liên quan đến hệ tim mạch, chống viêm và ung thư ở người. Dầu thực vật chỉ chứa axit béo có số cacbon ≤ 18 . Trong khi dầu thực vật như hạt lanh, hạt cải và đậu nành chứa ω -3 PUFAs chủ yếu là axit α -linolenic (ALA) nhưng omega 6 (ω - 6) PUFAs lại chiếm ưu thế ở các loại dầu khác như dầu ngô, dầu hạt bông, dầu nho.... Cần nhấn mạnh rằng axit béo ω -3 có số cacbon > 20 và 22 chủ yếu đến từ nguồn cá biển. Nguồn sản xuất ω -3 PUFAs trong ngành công nghiệp thực phẩm là dầu cá. Tuy nhiên, nguồn cung cấp này thường không ổn định về thành phần và chất lượng. Dầu cá cũng dễ bị nhiễm các hóa chất hữu cơ hòa tan trong chất béo có mặt trong các hệ sinh thái biển như các hợp chất halogen như polychlorinated biphenyl (PCB), polybromated diphenyl ether (PBDE) ... là những chất độc có tính ổn định cao. Chúng được tích lũy dần trong phân đoạn lipid của mô động vật. Do con người là mắt xích cuối cùng trong chuỗi thức ăn nên các chất này sẽ được chuyển vào cơ thể người qua đường thức ăn. Ngoài ra, việc sử dụng dầu cá không phổ biến vì có mùi vị không mong muốn, độ bền oxy hóa thấp và quá trình tinh sạch đắt tiền. Ngoài ra, mặc dù cá và động vật có vú ở biển có một số khả năng sinh tổng hợp ω -3 PUFAs nhưng hầu hết nguồn axit béo này đều từ thực phẩm. Cá sử dụng các sinh vật phù du biển như vi khuẩn, nấm, vi tảo... làm thức ăn. Những sinh vật này từ lâu đã được biết đến là những nhà máy sản xuất chính trong chuỗi thức ăn biển và

đóng một vai trò quan trọng trong việc tổng hợp các PUFAs sơ cấp (Đặng Diễm Hồng và Hoàng Thị Lan Anh, 2016).

Hiện nay, vi tảo biển dị dưỡng được xem là đối tượng có thể thay thế dầu cá trong việc cung cấp các ω -3 PUFAs. Việc sản xuất ω -3 PUFAs từ đối tượng này so với các loài vi tảo biển quang tự dưỡng truyền thống 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 tảo đạt cao (Bumbak và cs., 2011). 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 Hoàng Thị Lan Anh, 2016).

Ngành Labyrinthulomycota có lối sống dị dưỡng thâm thấu, được phân lập từ nhiều vùng sinh thái khác nhau trên thế giới nhưng chủ yếu là vùng nước mặn và vùng nước lợ. Chúng được coi là thành phần quan trọng trong quần xã vi sinh vật biển và vùng nước lợ. Nhiều chi vi tảo biển thuộc ngành này như *Aurantiochytrium*, *Labyrinthula*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* có khả năng tích lũy hàm lượng lipid cao (lên đến 70% sinh khối khô - SKK) và ω -3, ω -6 PUFAs như EPA, DHA và DPA (axit docosapentaenoic, C22: 5 ω -6) cao đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống con người từ nuôi trồng thủy sản, sản xuất thức ăn cho gia súc, gia cầm, thực phẩm chức năng, các chất có hoạt tính sinh học (như squalen dùng trong mỹ phẩm, dược phẩm), sản xuất nhiên liệu sinh học, dầu sinh học giàu axit béo ở dạng ω -3/ ω -6 PUFAs... Việc sản xuất ω -3 PUFAs đã và đang được thực hiện ở quy mô công nghiệp. Đã có nhiều sản phẩm thương mại có nguồn gốc từ nhóm tảo này. Ngoài ω -3 PUFAs, hiện nay nhiều chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học khác có ích cho sức khỏe con người như squalen, sắc tố carotenoid, enzym và polysaccharit ngoại bào... đang được nghiên cứu và khai thác, điều này đã phần nào cho thấy tiềm năng ứng dụng to lớn của những loài vi tảo này (Đặng Diễm Hồng và Hoàng Thị Lan Anh, 2016).

Việt Nam là một quốc gia biển, sở hữu một khu hệ động thực vật đa dạng về thành phần loài và giàu hợp chất sinh học quý. Khác với vi tảo biển quang tự dưỡng - đối tượng truyền thống đã được các nhà khoa học trong nước nghiên cứu với nhiều mục đích khác nhau từ lâu, vi tảo biển dị dưỡng như *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium* là đối tượng mới và chỉ được nghiên cứu ở Việt Nam từ năm 2005. Các chi này có khả năng tổng hợp các chất cần thiết cho cơ thể bằng nguồn cacbon hữu cơ, không cần ánh sáng; Việc nuôi cấy chúng có thể được thực hiện giống như các nuôi cấy vi sinh vật khác (bằng hệ thống lên men), do đó chi phí sản xuất sinh khối vi tảo biển dị dưỡng thấp hơn nhiều so với vi tảo quang dưỡng. Các chi này là nguồn tiềm năng để sản xuất công nghiệp một số chất thứ cấp có hoạt tính sinh học như PUFAs, carotenoid, squalen... và được ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người và nuôi trồng thủy sản (Đặng Diễm Hồng và Hoàng Thị Lan Anh, 2016).

Khả năng tổng hợp PUFAs cao như DHA, EPA, DPA từ vi tảo biển dị dưỡng: Một số chi vi tảo biển dị dưỡng được coi là nguồn cung cấp DHA rất tốt như các chủng *Thraustochytrium* sp. Sparrow và *Schizochytrium* sp. Goldstein và Belsky và *Aurantiochytrium* sp. Mutants thuộc họ Thraustochytrids. Các loài đại diện này cung cấp các

loại dầu giàu DHA ưu việt nhất cho các ngành công nghiệp, chúng được sử dụng trong thực phẩm, đặc biệt là trong sữa bột công thức cho trẻ sơ sinh (Raghukumar, 2008a; Nazir và cs., 2022; Raghukumar, 2008b). Theo nghiên cứu của Ward và Singh đã cho thấy *Schizochytrium* sp. có một số đặc điểm thuận lợi cho sản xuất thương mại bao gồm hàm lượng lipid cao, sức sản xuất DHA cao, tăng trưởng tốt trong nhân nuôi sinh khối với mật độ tế bào (MĐTB) cao. Một số chủng *Schizochytrium* nhất định có thể cung cấp DHA cao đạt 94% so với tổng số axit béo (TFA) (Ward and Singh, 2005). Manikan và cộng sự (2015) đã kết luận rằng *Aurantiochytrium* (tên gọi trước là *Schizochytrium*) là nguồn sản xuất các axit béo không bão hòa cao nhất, hàm lượng lipid chiếm 50% SKK và DHA chiếm 35 - 55% so với TFA và nó không có độc tố tảo (thông thường là axit domoic) (Manikan và cs., 2015; Nazir và cs., 2018). 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 glucoza 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 (Furlan và cs., 2017). *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 và cs., 2022). Theo Wang và cộng sự (2021) bằng cách kết hợp giữa các quá trình chuyển hóa axit béo thì chủng *Aurantiochytrium* sp. SD116 có hàm lượng DHA đạt 61% TFA và 331 mg/g SKK (Wang và cs., 2021).

Vai trò của PUFAs đối với sức khỏe con người. PUFAs tham gia vào sự điều hòa quá trình trao đổi lipid, vận chuyển và hướng tới các mô. PUFAs tham gia vào thành phần cấu trúc nên thành tế bào. Sự có mặt của chúng trong thành phần phospholipid góp phần tạo nên tính linh động của màng. Điều này góp phần quan trọng trong việc điều chỉnh hoạt động của các protein màng. PUFAs là thành phần quan trọng cấu tạo nên tế bào não, đặc biệt đối với trẻ nhỏ từ 0 - 2 tuổi. Axit béo này cũng có ảnh hưởng quan trọng theo hướng tích cực 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, não bộ không thể duy trì hoạt động nếu như không có những axit béo quan trọng này (Nagy and Tiuca, 2017). PUFAs 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 (Nagy and Tiuca, 2017). So với các cơ quan khác hàm lượng DHA trong não và mắt cao hơn. DHA đặc biệt tập trung vào chất xám của não và võng mạc. Hàm lượng DHA thấp làm giảm sự phát triển nhận thức và chức năng thị giác (Calder, 2016). Nhiều kết quả nghiên cứu đã công bố cho thấy 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 (Elshani và cs., 2019). Các axit béo ω - 6 như linoleic và DPA có tác dụng chống viêm dây thần kinh trong cơ thể người ở các mô hình về bệnh Alzheimer. Trong đó, axit linoleic ω - 6 có trong khẩu phần ăn sẽ làm tăng chất chuyển hóa DPA ω - 6 trong não và có tác dụng thúc đẩy quá trình chống viêm dây thần kinh dẫn đến làm giảm bệnh Alzheimer (Ma và cs., 2020). Ngoài ra, DPA ω - 6 đã được chứng minh có tác dụng chống viêm, giảm phù nề và tăng cường tác dụng khi kết hợp với DHA (Nauroth và cs., 2010), giảm co thắt mạch máu và kết tụ tiểu cầu (Saini và Keum, 2018). *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 (Bell và Moran, 2020).

Vai trò của PUFAs đối với nuôi trồng thủy sản (NTTS). PUFAs như axit EPA, ARA và DHA là cần thiết cho sự phát triển và biến thái của ấu trùng tôm, cá, cua và động vật thân mềm hai mảnh vỏ. Tuy nhiên, cần chú ý là tỷ lệ giữa DHA, EPA và ARA có thể 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, 2004). Trong một số nghiên cứu về làm giàu luân trùng *Brachionus plicatilis* và ấu trùng *Artemia salina* trong trại sản xuất giống thủy sản ở Ai Cập đã cho thấy khi sử dụng tảo *Tetraselmis chuii* có PUFAs với hàm lượng ARA đạt 5,50%; EPA - 4,80% và DHA - 5,00% so với TFA 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*. Do đó đã làm tăng khả năng sống sót và giúp cho ấu trùng nuôi phát triển tốt nhất (Khairy và El-Sayed, 2012). Hàm lượng axit béo ARA, ALA, DHA và EPA trong thịt cá đã tăng lên đáng kể sau khi bổ sung *Aurantiochytrium* sp. vào thức ăn. 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%. Thiếu DHA và EPA gây tỷ lệ chết cao, tốc độ sinh trưởng chậm ở ấu trùng và giai đoạn non của cá, tôm (Wang và cs., 2021).

Khả năng tổng hợp squalen cao. Một số loài vi tảo biển dị dưỡng như thraustochytrids được coi là nguồn tiềm năng để sản xuất các chất có giá trị cao bao gồm squalen. Thraustochytrids có thể phát triển nhanh chóng trong điều kiện khắc nghiệt khi cung cấp đầy đủ nguồn cacbon hữu cơ và tích lũy một lượng lớn squalen (Aasen và cs., 2016). Chúng *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 (Li và cs., 2009). Pora và cộng sự (2014) đã đưa ra quy trình sản xuất squalen từ loài vi tảo *Thraustochytrium* bằng cách bổ sung vào môi trường hỗn hợp vitamin B1, B6 và B12 ở nhiệt độ 30 °C, năng suất squalen có thể thu được từ 20 đến 120 mg/g sinh khối khô (Pora và cs., 2014). Hàm lượng squalen có thể được nâng cao và cải thiện ở nhiều loại vi sinh vật bằng cách; (1) sử dụng quá trình lên men với các điều kiện bổ sung được tối ưu hóa (Chen và cs., 2010; Fan và cs., 2010; Nakazawa và cs., 2012), (2) thao tác di truyền hoặc giới thiệu các gen tham gia trong tổng hợp squalen (Singh và cs., 2014, 2017; Valachovič và Hapala, 2017), và (3) bổ sung chất ức chế (ví dụ: terbinafine là chất ức chế enzym monooxygenase trong con đường tổng hợp sterol dẫn đến tích lũy squalen).

Squalen có vai trò sinh học quan trọng như một chất chống oxy hóa, chống ung thư, chất kháng khuẩn, chất hỗ trợ cho vắc-xin, chất vận chuyển thuốc và chất khử độc. Do đó, các ngành dược phẩm, công nghiệp mỹ phẩm, thực phẩm bổ sung đã bắt đầu sử dụng rộng rãi squalen (Gohil và cs., 2019; Ronco và Stéfani, 2013). Nhờ tính chất hòa tan trong chất béo và có sức căng bề mặt tuyệt vời, squalen đã được sử dụng rộng rãi để điều chế nhũ tương dầu trong nước ổn định nhằm mục đích cung cấp các hợp chất kỵ nước hoạt động (Gohil và cs., 2019). Công thức hạt nano lipid rắn có chứa squalen đã được thiết kế có khả năng khử trùng bằng hơi nước và đông khô, bảo quản ở dạng bột cùng với vắc-xin (Stelzner và cs., 2018).

Khả năng tổng hợp carotenoit cao. Carotenoit bao gồm beta - caroten, astaxanthin, canthaxanthin, lutein và violaxanthin được sản xuất bởi vi tảo nước ngọt và vi tảo biển. Carotenoit là một loại sắc tố terpenoit, có tác dụng tăng cường sức khỏe cho con người. Ngoài ra, các carotenoit hỗ trợ sức khỏe khác như fucoxanthin và zeaxanthin (Martin, 2015; Bourdon và cs., 2021). Một số thraustochytrids cũng tạo ra carotenoit. Số lượng và thành phần của carotenoit và PUFAs của lipid tổng số phụ thuộc vào loài và điều kiện phát triển của chúng (như thành phần môi trường và nhiệt độ). Các carotenoit có mặt trong thraustochytrids bao gồm ketocarotenoit như astaxanthin, canthaxanthin, phoenicoxanthin và echinenone (Leyton và cs., 2021). Park và cộng sự (2018) đã công bố khi nhiệt độ nuôi trồng thay đổi kết hợp chiếu ánh sáng trắng bằng đèn LED, *Schizochytrium* sp. SHG104 có sinh khối đạt 10,8 g/L và lipid đạt 45,8% SKK (trong đó DHA đạt 32,1% TFA) và astaxanthin 4,6 mg/L (Park và cs., 2018).

Vai trò của carotenoit trong vi tảo biển đã được biết khá rõ, chúng góp phần bảo vệ các tế bào chống lại các điều kiện bất lợi của môi trường (Leyton và cs., 2021). Carotenoit có thể hoạt động như tiền chất của Vitamin A, làm giảm các gốc tự do và có tác dụng làm lành nhánh chóng các tổn thương vông mạc nhánh. Hơn nữa, chúng cũng có thể làm giảm nguy cơ mắc một số bệnh vì chúng có đặc tính chống ung thư, chống viêm và chống béo phì. Do đó, carotenoit đã được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm và dược phẩm (Ren và cs., 2021). Ngoài ra, lutein và zeaxanthin là sắc tố điểm vàng rất quan trọng trong việc giảm sự khởi phát của các bệnh về mắt liên quan đến tuổi tác. Do đó, nhu cầu bổ sung carotenoit vào chế độ ăn uống ngày càng cao. Carotenoit là chất chống oxy hóa, trung hòa các gốc tự do và do đó ngăn ngừa hoặc làm chậm các bệnh mãn tính, tổn thương tế bào và lão hóa (Tharek và cs., 2021).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng không chỉ tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi như DHA cao mà còn đồng thời có khả năng tổng hợp cao squalen và carotenoit/astaxanthin cao ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người và thức ăn cho động vật nuôi trong nuôi trồng thủy sản.

Chủng vi tảo biển dị dưỡng theo sáng chế được phân lập từ mẫu lá đước *Rhizophora apiculata*, thuộc họ Đước Rhizophoraceae đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bãi rừng ngập mặn thuộc vùng biển Hải Hậu, Nam Định, Việt Nam năm 2008.

Chủng này đã được định tên dựa vào đặc điểm hình thái, việc đọc và so sánh trình tự gen 18S rARN có kích thước 1720 bp và có mức độ tương đồng 99,5% với trình tự tương ứng của chủng *Aurantiochytrium mangrovei* và được cấp mã số trên ngân hàng gen là ON125870 như được nêu trong trình tự SEQ ID NO:1, và có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi là axit docosahexaenoic (DHA) với tỉ lệ $32,97 \pm 0,93\%$ so với axit béo tổng số, đồng thời có khả năng sinh tổng hợp squalen với lượng $65,64 \pm 0,45$ mg/g sinh khối khô, carotenoit với lượng $34,48 \pm 1,15$ µg/g sinh khối khô và astaxanthin với lượng $7,20 \pm 0,34$ µg/g sinh khối khô ở điều kiện 28°C, độ mặn 1,5%, glucoza 3%, cao nấm men 1% và có thể ứng dụng làm

thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người và thức ăn cho các động vật nuôi khác nhau trong nuôi trồng thủy sản.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. thể hiện hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng DDH1 được nuôi cấy trên môi trường GPYc thạch dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại X400 lần.

Fig.2. thể hiện hình thái tế bào của chủng DDH1 được nuôi trồng trên môi trường GPYc lỏng dưới kính hiển vi điện tử SEM với độ phóng đại 20.000 lần.

Fig. 3. thể hiện sản phẩm PCR nhân gen từ ADN tổng số của chủng DDH1 bởi cặp mồi FA1 và RA3 thông qua điện di trên gel agarosa 0,8%. Nhân gen 18S rARN của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1. Trong đó, A: ADN tổng số của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1; B: Nhân gen 18S rARN của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 bằng cặp mồi FA1 và RA3; C: Tinh sạch gen 18S rARN của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1

Giếng 1: ADN tổng số của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1; Giếng 2, 3: Sản phẩm PCR nhân 18S rARN của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1; Giếng 4: Sản phẩm PCR tinh sạch của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1. Giếng M: Thang ADN chuẩn 1kb GeneRuler.

Fig. 4. thể hiện cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Aurantiochytrium* và chủng DDH1 dựa trên trình tự gen 18S rARN.

Fig. 5. thể hiện sắc ký đồ thành phần axit béo trong sinh khối chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 khi nuôi cấy trong môi trường M1.

Fig. 6. thể hiện ảnh hưởng của nồng độ terbinafine lên mật độ tế bào (A), sinh khối khô (B), hàm lượng lipid và squalen (C) của *Aurantiochytrium* sp. DDH1.

Fig. 7. thể hiện mô bệnh học vi thể gan, thận, lách thỏ sau 30 ngày ở lô ĐC (uống nước cất liều 0,5 mL/kg TLCT/ngày) (A, D, H), lô TN 1 (uống sinh khối chủng DDH1 liều 300 mg/kg TLCT/ngày) (B, E, I) và lô TN 2 (uống sinh khối chủng DDH1 liều 600 mg/kg TLCT/ngày) (C, G, K), tương ứng (HE, X 400). TLCT - trọng lượng cơ thể.

Fig. 8. thể hiện sự tăng trưởng, hàm lượng lipid và thành phần axit béo của quần thể luân trùng trong các công thức khác nhau. Trong đó: Lô 1- luân trùng nuôi bằng men bánh mì; Lô 2- luân trùng nuôi bằng tảo *C. gracilis*; Lô 3- luân trùng nuôi bằng sinh khối chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ mẫu lá đước *Rhizophora apiculate*, thuộc họ Đước Rhizophoraceae đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bờ rừng ngập mặn thuộc vùng biển Hải Hậu, Nam Định, Việt Nam năm 2008.

A. Phân lập và định danh chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium* sp. DDH1

Để phân lập các loài vi tảo biển dị dưỡng, chúng tôi sử dụng các mẫu lá có sống lá (lá cây đước *Rhizophora apiculate*, thuộc họ Đước Rhizophoraceae) đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bờ rừng ngập mặn ở vùng biển Hải Hậu, Nam Định, Việt Nam. Lá được rửa bằng nước biển, cho vào túi nilon, ghi địa điểm thu mẫu, bảo quản mẫu lá ở nhiệt độ mát.

Chuẩn bị môi trường: Môi trường dùng cho phân lập được ký hiệu là GPYc chứa glucoza (2 g/L), polypepton (1g/L), cao nấm men (0,5 g/L), aga (15g/L), muối biển nhân tạo (17,5 g/L) có nồng độ tương đương 1,5% NaCl, chloramphenicol với nồng độ 50 mg/L. Sau khi phân lập được chủng sạch, các khuẩn lạc được nuôi cấy trên môi trường cơ bản M1 có thành phần như sau: glucoza (30 g/L), cao nấm men (10 g/L), muối biển nhân tạo (17,5 g/L) được đựng trong các bình tam giác 250 mL ở 28°C và lắc 200 vòng/phút, trong tối.

Quy trình phân lập: 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 cho vào ống nghiệm có chứa 5 mL nước biển nhân tạo khử trùng đã được bổ sung phần thông (pine-pollen). Sau đó, các ống nghiệm được giữ 28°C trong tối. Sau 24 giờ, dùng que cấy platine thu lấy pine-pollen nổi trên bề mặt nước và cấy ria trên đĩa petteri chứa môi trường GPYc. Các đĩa này được đặt ở 28°C, trong tối. Sau 3 - 5 ngày các đĩa này được 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 phần 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.

Kết quả đã phân lập được chủng vi tảo biển dị dưỡng DDH1. Phân loại sơ bộ chủng vi tảo biển dị dưỡng DDH1 dựa vào đặc điểm hình thái của khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường thạch (Fig 1, 2). 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, động bào tử có dạng ovan hoặc dạng trứng, sinh trưởng bằng hình thức tế bào sinh dưỡng phân đôi liên tiếp tạo thành 4, 8 hoặc một cụm tế bào (có thể lên tới 100 tế bào). Cũng như nhiều chi thuộc ngành Heterokontophyta, trong chu trình sống của tế bào có giai đoạn hình thành động bào tử có hai roi lệch (Porter, 1990). Thành tế bào có chứa sulphate polysacharit với thành phần chủ yếu là galactose hoặc fructose 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 bothrosome hoặc sagenogenetosome (sagenogen) ở phía bề mặt ngoài tế bào (Porter, 1990). EN góp phần làm tăng vùng bề mặt tế bào, có chứa enzym thủy phân gắn trên bề mặt hoặc nằm chìm trong môi trường xung quanh đã giúp cho việc tiêu hóa dễ dàng các vật liệu hữu cơ. EN cũng gắn tế bào với môi trường và tiến hành phân hủy các cơ chất hữu cơ. Tế bào hầu như không sản xuất EN khi phát triển trên môi trường lỏng giàu dinh dưỡng, đặc biệt là trong điều kiện nuôi lắc (Raghukumar, 2008). Dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc có thể xếp chủng này vào chi *Aurantiochytrium*.

Tiến hành định tên khoa học chính xác chủng DDH1 dựa vào việc đọc và so sánh trình tự gen 18S rARN với cặp môi đặc hiệu FA1: 5'-AAAGATTAAGCCATGCATGT-3' (20 nu) và RA3: 5'-CAATCGGTAGGTGCGACGGGCGG-3' (23 nu) với kích thước dự kiến khoảng 1,7 Kb (Mo et al., 2002).

ADN tổng số thu được từ chủng DDH1 là một băng gọn, sáng và không bị đứt gãy với kích thước tương ứng khoảng 21 Kb (Fig. 3A), đạt chất lượng để tiến hành nhân gen 18S rARN bằng cặp môi đặc hiệu FA1 và RA3, có kích thước theo lý thuyết khoảng 1,7kb. Sản phẩm PCR thu được có một băng ADN với kích thước khoảng 1,7 kb đúng theo tính toán lý thuyết (Fig.

3B). Tiếp theo sản phẩm PCR 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 thời gel trên gel agarose 0,8% (Fig. 3C).

Thực tế gen 18S rARN của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu FA1 và RA3 có kích thước 1720 bp. Các loài *Phaeodactylum tricornutum* (có mã số đăng ký FR865506.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Z75578.1) được sử dụng làm nhóm ngoại cho chi *Aurantiochytrium* có tỉ lệ tương đồng so với các loài thuộc chi *Aurantiochytrium* dao động từ 77,0 đến 79,4% (Fig. 4). Mẫu *Aurantiochytrium* sp. DDH1 có tỉ lệ phần trăm tương đồng cao nhất với loài *Aurantiochytrium mangrovei* (DQ367049.1) đạt 99,5%, tiếp theo là loài *Aurantiochytrium limacinum* (AB810940.1) đạt 99,3% và thấp nhất là loài *Aurantiochytrium* sp.mh0186 (AB362211.1) đạt 91,1%. 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* (Fig. 4), chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 thuộc về loài *Aurantiochytrium mangrovei* có độ tương đồng đạt 99,5% so với chủng *A. mangrovei* (DQ367049.1) và trình tự gen 18S rARN đã được cấp mã số đăng ký trên ngân hàng gen là ON125870 như nêu trong trình tự SEQ ID NO:1.

B. Khả năng tổng hợp axit béo DHA cao

Sau khi có chủng sạch, chủng DDH1 được đánh giá khả năng tổng hợp PUFAs như DHA, EPA, DPA trên môi trường M1 dưới ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường như nhiệt độ, độ mặn, nguồn cacbon, nguồn nitơ (Bảng 1).

Nhiệt độ ảnh hưởng đáng kể lên sinh trưởng và tích lũy PUFAs ở vi tảo *Aurantiochytrium*. Ảnh hưởng của nhiệt độ trong khoảng từ 20-37°C lên sinh trưởng, tích lũy lipid và DHA của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 đã được nghiên cứu. Chủng này sinh trưởng tốt nhất ở 28°C với sinh khối khô, hàm lượng lipid tổng số và DHA đạt cao nhất, tương ứng là $11,29 \pm 0,32$ g/L, $37,89 \pm 1,04$ % sinh khối khô và $32,97 \pm 0,93$ % so với TFA (Bảng 1), có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về sinh trưởng, hàm lượng lipid và DHA của chủng DDH1 ở nhiệt độ 28°C và các công thức nhiệt độ còn lại. Khi nuôi trồng ở nhiệt độ quá thấp (< 25°C) hoặc quá cao (> 32°C), sinh trưởng và hàm lượng lipid của chủng này đều giảm mạnh. Hàm lượng DHA khi nuôi trồng chủng DDH1 ở các điều kiện khác nhau có sự khác biệt dao động từ $20,19 \pm 0,73$ đến $32,97 \pm 0,93$ % so với TFA.

Do nguồn gốc phân lập chủng DDH1 là những lá cây đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bờ rừng ngập mặn thuộc vùng biển Hải Hậu, Nam Định, Việt Nam nên độ mặn của nước biển nhân tạo là một thành phần quan trọng trong môi trường nuôi cấy các loài thuộc chi *Aurantiochytrium*. Nồng độ muối biển nhân tạo từ 0% đến 3% có trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sinh trưởng, hàm lượng lipid tổng số và DHA của chủng DDH1 được chỉ ra trên Bảng 1 cho thấy mặc dù chủng DDH1 có thể sống trong môi trường có nồng độ muối 0% nhưng SKK ($7,19 \pm 0,16$ g/L) và lipid tổng số, hàm lượng DHA có giá trị thấp thấp ($5,54 \pm 0,06$ % SKK; $15,07 \pm 1,23$ % so với TFA, tương ứng). Sinh khối khô và hàm lượng lipid tổng số và DHA đạt cao nhất ở nồng độ muối 1,5%, tương ứng là $12,46 \pm 0,21$ g/L, $36,74 \pm 1,13$ % SKK và $32,08 \pm 0,67$ % so với TFA.

Đối với các vi sinh vật có khả năng sống dị dưỡng nói chung, năng lượng được lấy từ việc oxi hóa các hợp chất hữu cơ cho sinh trưởng. Ảnh hưởng của 5 nguồn đường khác nhau bao gồm glucoza, saccharoza, maltoza, glycerol, fructoza đến sinh trưởng, tích lũy lipid và DHA ở chủng DDH1 được chỉ ra trên Bảng 1 cho thấy SKK, hàm lượng lipid tổng số và DHA đạt cao nhất khi sử dụng glucoza làm nguồn cacbon, tương ứng là $12,35 \pm 0,08$ g/L, $37,05 \pm 1,11$ % SKK và $32,53 \pm 0,26$ % so với TFA. Ngoài ra, chủng DDH1 cũng có thể sử dụng glycerol cho sinh trưởng, hàm lượng lipid tổng số và DHA tương ứng đạt $11,03 \pm 0,15$ g/L, $37,06 \pm 2,04$ % SKK và $30,15 \pm 0,05$ % so với TFA. Với các nguồn cacbon khác, chủng DDH1 sử dụng đều không có hiệu quả cho sinh trưởng, tích lũy lipid và DHA.

Bảng 1. Sinh trưởng, sự tích lũy lipid và DHA ở chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 khi nuôi cấy ở các nhiệt độ, nồng độ muối, nguồn cacbon và nguồn nitơ khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy

Yếu tố ảnh hưởng	Công thức thí nghiệm	Sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng lipid (% SKK)	Hàm lượng DHA (% so với TFA)
Nhiệt độ	20°C	$9,33 \pm 0,87$	$15,63 \pm 1,26$	$20,19 \pm 0,73$
	25°C	$10,24 \pm 0,45$	$28,54 \pm 2,67$	$28,57 \pm 0,05$
	28°C	$11,29 \pm 0,32$	$37,89 \pm 1,04$	$32,97 \pm 0,93$
	32°C	$10,53 \pm 0,09$	$25,63 \pm 1,26$	$31,36 \pm 0,45$
	37°C	$3,84 \pm 0,07$	$10,12 \pm 0,74$	$30,07 \pm 0,23$
Nồng độ muối (%)	0,00	$7,19 \pm 0,16$	$5,54 \pm 0,06$	$15,07 \pm 1,23$
	0,75	$10,63 \pm 0,54$	$25,89 \pm 1,67$	$30,65 \pm 1,78$
	1,50	$12,46 \pm 0,21$	$36,74 \pm 1,13$	$32,08 \pm 0,67$
	2,25	$10,81 \pm 0,17$	$33,95 \pm 2,12$	$31,05 \pm 1,27$
	3,00	$10,11 \pm 0,09$	$30,34 \pm 1,97$	$30,01 \pm 1,02$
Nguồn cacbon	Glucoza	$12,35 \pm 0,08$	$37,05 \pm 1,11$	$32,53 \pm 0,26$
	Saccharoza	$2,65 \pm 0,09$	$5,67 \pm 0,06$	$10,32 \pm 0,31$
	Maltoza	$2,78 \pm 0,12$	$9,04 \pm 0,31$	$12,05 \pm 0,47$
	Glycerol	$11,03 \pm 0,15$	$37,06 \pm 2,04$	$30,15 \pm 0,05$
	Fructoza	$2,96 \pm 0,13$	$15,45 \pm 0,37$	$20,19 \pm 0,38$
Nguồn nitơ	Cao nấm men	$12,15 \pm 0,04$	$37,01 \pm 2,17$	$32,51 \pm 0,02$
	(NH ₄) ₂ SO ₄	$2,96 \pm 0,02$	$3,74 \pm 0,12$	$6,32 \pm 0,07$
	CH ₃ COONH ₄	$10,67 \pm 0,13$	$19,54 \pm 0,67$	$14,56 \pm 0,06$
	NH ₄ NO ₃	$2,48 \pm 0,01$	$2,04 \pm 0,45$	$5,21 \pm 0,39$
	NaNO ₃	$10,89 \pm 0,34$	$17,06 \pm 1,09$	$10,11 \pm 0,25$
	phân N-P-K	$11,06 \pm 0,17$	$15,45 \pm 0,37$	$19,34 \pm 0,06$

Ảnh hưởng của 6 nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ bao gồm cao nấm men, (NH₄)₂SO₄, CH₃COONH₄, NH₄NO₃, NaNO₃ và phân N-P-K đến sinh trưởng, tích lũy lipid và DHA ở chủng DDH1 được chỉ ra trên Bảng 1 cho thấy sinh khối khô, hàm lượng lipid tổng số và DHA đạt cao nhất khi sử dụng cao nấm men làm nguồn nitơ, tương ứng là $12,15 \pm 0,04$ g/L, $37,01 \pm 2,17$ % SKK và $32,51 \pm 0,02$ % so với TFA. Bên cạnh cao nấm men, chủng DDH1 cũng có thể sử dụng

các nguồn nitơ NH_4NO_3 , NaNO_3 và phân N-P-K cho sinh trưởng gần tương đương khi sử dụng cao nấm men nhưng hàm lượng lipid và DHA đạt giá trị thấp hơn.

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 có khả năng tổng hợp DHA tốt nhất trong các điều kiện nhiệt độ: 28°C , độ mặn: 1,5%, nguồn cacbon là glucoza và nguồn nitơ là cao nấm men.

Fig. 5. là sắc ký đồ thành phần axit béo trong sinh khối chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 khi nuôi cấy trong môi trường M1. Trên Fig. 5, DHA có hàm lượng rất cao, chiếm đến trên 30% so với tổng số TFA.

C. Khả năng tổng hợp squalen cao

Khả năng tổng hợp squalen của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được đánh giá bằng cách sử dụng chất ức chế terbinafine ở các nồng độ khác nhau. Terbinafine là một chất ức chế enzym squalen monooxygenaza có vai trò xúc tác quá trình oxy hóa squalen thành 2,3 oxidosqualen trong sự có mặt của phân tử oxy và NADH (Ono, 2002; Ryder, 1992) trong con đường sinh tổng hợp sterol và dẫn đến việc tổng hợp squalen sẽ tăng. Khi nồng độ terbinafine tăng từ 0,1 lên 200 $\mu\text{g/mL}$ đã làm giảm đáng kể MĐTB và SKK sau 5 ngày nuôi từ $112,32 \pm 2,36$ xuống $34,15 \pm 0,15 \times 10^6$ tế bào/mL và $11,92 \pm 0,14$ xuống $4,51 \pm 0,11$ g/L so với công thức đối chứng $121,23 \pm 2,74 \times 10^6$ tế bào/mL và $12,89 \pm 0,07$ g/L, tương ứng (Fig.6.). Mặc dù sinh trưởng giảm nhưng hàm lượng lipid và squalen lại tăng lên đáng kể. Lipid tăng từ $28,09 \pm 1,21$ % SKK ở công thức đối chứng lên $(40,42 \pm 1,05)\%$ SKK khi nồng độ terbinafine từ 0,1-200 $\mu\text{g/mL}$ sau 5 ngày nuôi (Fig.6). Hàm lượng squalen của chủng DDH1 tăng từ $65,64 \pm 0,45$ mg/g SKK lên $99,43 \pm 1,75$ mg/g SKK, tương ứng khi tăng nồng độ terbinafine đạt tới 100 $\mu\text{g/mL}$ và sau đó hầu như không thay đổi khi nồng độ terbinafine tăng từ 150-200 $\mu\text{g/mL}$. Hàm lượng squalen thay đổi không đáng kể khi tăng nồng độ terbinafine lên 10 lần (từ 0,1 $\mu\text{g/mL}$ lên 1 $\mu\text{g/mL}$). Khi nồng độ terbinafine trong môi trường tăng lên 1000 lần (100 $\mu\text{g/mL}$) thì hàm lượng squalen đạt cực đại $(99,43 \pm 1,75)$ mg/g SKK sau 5 ngày nuôi cấy. Như vậy việc bổ sung terbinafine vào môi trường nuôi có thể tăng tích lũy squalen nhưng làm giảm sinh trưởng tảo ở nồng độ cao. Như vậy, chủng DDH1 là một chủng tiềm năng cho sản xuất squalen phục vụ cho y dược và mỹ phẩm.

D. Khả năng tổng hợp carotenit cao

Chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được xác định khả năng tổng hợp carotenit theo công bố của Furlan et al., (2019) và hàm lượng astaxanthin theo phương pháp của Strickland & Parson, 1972.

Bảng 2. Sinh trưởng, hàm lượng carotenit và astaxanthin trong sinh khối của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 ở bình tam giác

	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
Sinh khối khô (g/L)	$3,86 \pm 0,03$	$9,54 \pm 0,76$	$12,28 \pm 1,12$	$11,05 \pm 1,23$
Carotenit ($\mu\text{g/g}$ SKK)	$12,56 \pm 0,38$	$20,39 \pm 1,01$	$34,38 \pm 1,15$	$32,15 \pm 2,54$
Astaxanthin ($\mu\text{g/g}$ SKK)	$2,13 \pm 0,05$	$2,47 \pm 0,03$	$7,20 \pm 0,34$	$6,14 \pm 0,47$

Chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được nuôi cấy trong bình tam giác 500 mL chứa 200 mL môi trường M1 trong 7 ngày. Trong đó, mẫu được thu tại các ngày 1, 3, 5, và 7 bằng li

tâm 3.000 vòng/phút, 4°C, trong 5 phút để xác định carotenoit và astaxanthin (Bảng 2). Sinh trưởng của chủng DDH1 tăng dần qua các ngày nuôi cấy và đạt cực đại $12,28 \pm 1,12$ g/L ở ngày thứ 5. Hàm lượng carotenoit và astaxanthin tăng tỉ lệ thuận với sinh khối và đạt cực đại $34,48 \pm 1,15$ và $7,20 \pm 0,34$ µg/g SKK sau 5 ngày nuôi và giảm dần ở các ngày tiếp theo. Như vậy, chủng DDH1 có tiềm năng to lớn cho sản xuất carotenoit và astaxanthin.

E. Làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người

Để sử dụng sinh khối chủng DDH1 làm thực phẩm chức năng, sinh khối chủng này cần phải được kiểm tra về độc tính cấp và bán trường diễn trên mô hình động vật thực nghiệm.

Nghiên cứu tính an toàn của sinh khối chủng Aurantiochytrium sp. DDH1

Tính an toàn của sinh khối chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được thể hiện ở tất cả chuột nhắt trắng đã dùng sinh khối tảo đến mức liều cao nhất 50 g/kg TLCT có thể chứa trong dạ dày và theo dõi trong 72 giờ đều không có chuột nhắt trắng nào chết (Bảng 3.), chưa tìm được liều LD₅₀. Điều này chứng tỏ sinh khối chủng DDH1 an toàn và không độc.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu tính an toàn của sinh khối chủng DDH1

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Tổng khối lượng sinh khối/1kg TLCT	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

Ghi chú: TLCT - trọng lượng cơ thể

Độc tính bán trường diễn của sinh khối chủng DDH1 được nghiên cứu trên thỏ nhà được uống sinh khối chủng DDH1 với 2 mức liều 300 và 600 mg/kg TLCT 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 thí nghiệm đã được xác định.

Ảnh hưởng của sinh khối chủng Aurantiochytrium sp. DDH1 lên khối lượng cơ thể thỏ thí nghiệm: Bảng 4 cho thấy khối lượng cơ thể thỏ giữa các lô dùng sinh khối chủng DDH1 (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 DDH1 liên tục trong 30 ngày không gây ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường về khối lượng cơ thể của thỏ.

Ảnh hưởng của sinh khối chủng Aurantiochytrium sp. DDH1 lên khối lượng một số chỉ tiêu huyết học thỏ thí nghiệm: Khi thỏ uống sinh khối chủng DDH1 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 4). Như vậy, sinh khối chủng DDH1 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 thử thí nghiệm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của sinh khối chủng DDH1 lên trọng lượng cơ thể thử (n = 6, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm xét nghiệm	Trọng lượng cơ thể (g)			
	Lô ĐC (1)	Lô TN 1 (2)	Lô TN 2 (3)	Pso sánh giữa các lô
Trước thí nghiệm (a)	2,02 ± 0,16	1,98 ± 0,34	2,05 ± 0,53	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	2,16 ± 0,51	2,28 ± 0,42	2,21 ± 0,65	$p_{3-1} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	2,25 ± 0,28	2,34 ± 0,51	2,35 ± 0,33	$p_{3-2} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} < 0,01; p_{c-b} < 0,01$			
Số lượng hồng cầu thử (x10 ¹² /g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	4,35 ± 0,46	5,42 ± 0,42	5,15 ± 0,27	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	4,25 ± 0,83	5,49 ± 0,27	5,25 ± 0,24	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	4,56 ± 0,32	5,78 ± 0,36	5,45 ± 0,48	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-
Hàm lượng bạch cầu (10 ⁹ /L)				
Trước thí nghiệm (a)	9,41 ± 1,25	9,19 ± 1,38	6,34 ± 10,22	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	7,21 ± 1,02	8,52 ± 1,34	6,68 ± 10,31	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	7,35 ± 0,56	7,35 ± 1,73	7,75 ± 11,36	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-
Hb (g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	105,11 ± 13,20	117,53 ± 8,11	128,26 ± 9,12	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	109,32 ± 13,15	114,49 ± 6,01	125,37 ± 7,06	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	124,15 ± 6,57	125,42 ± 5,97	127,25 ± 6,16	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-
Số lượng tiểu cầu (10 ⁹ /L)				
Trước thí nghiệm (a)	360,12 ± 39,48	344,08 ± 64,35	311,84 ± 63,11	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	416,41 ± 38,34	378,46 ± 52,11	315,41 ± 87,47	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	289,39 ± 36,28	283,64 ± 44,53	396,76 ± 31,04	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			
Số lượng tiểu cầu (g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	364,16 ± 52,56	341,36 ± 61,34	379,11 ± 43,05	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 2 tuần (b)	414,35 ± 42,47	398,05 ± 52,48	399,45 ± 56,07	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	288,32 ± 48,61	279,35 ± 52,51	301,83 ± 65,18	$p_{3-1} > 0,05$
Pso sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Ghi chú: - Lô ĐC: uống nước cất liều 0,5 mL/kg TLCT/ngày; Lô TN 1: uống sinh khối tảo liều 300 mg/kg TLCT/ngày; Lô TN 2: uống sinh khối tảo liều 600 mg/kg TLCT/ngày; TLCT - trọng lượng cơ thể

Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan, chức năng gan và chức năng thận của thử khi dùng sinh khối chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 dài ngày

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của sinh khối chủng DDH1 đến hoạt độ của các enzym Aspartate transaminase (AST) và Alanine transaminase (ALT), creatinin của thỏ trong thí nghiệm thu được được thể hiện ở Bảng 5. Kết quả cho thấy hoạt độ của AST, ALT và creatinin của thỏ sau khi dùng sinh khối chủng DDH1 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 DDH1 không gây ảnh hưởng đến chức năng gan, thận của thỏ.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chủng DDH1 lên các chỉ số hoạt độ AST, ALT, creatinin trong máu thỏ

(n = 06, $\bar{X} \pm SD$)				
Thời điểm xét nghiệm	Lô ĐC (1)	Lô TN 1 (2)	Lô TN 2 (3)	p _{so} sánh giữa các lô
Hoạt độ AST (UI/L)				
Trước thí nghiệm (a)	270,46 ± 17,34	276,34 ± 21,42	285,53 ± 17,31	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	305,71 ± 21,22	317,62 ± 21,06	318,26 ± 21,48	$p_{3-2} > 0,05$
				$p_{3-1} > 0,05$
p _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b-a} > 0,05$			-
Hoạt độ ALT (UI/L)				
Trước thí nghiệm (a)	191,04 ± 20,32	211,47 ± 12,38	223,72 ± 20,67	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	198,74 ± 21,61	216,34 ± 11,11	225,64 ± 10,30	$p_{3-2} > 0,05$
				$p_{3-1} > 0,05$
p _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b-a} > 0,05$			-
Creatinin (μmol/L)				
Trước thí nghiệm (a)	54,11 ± 6,21	62,42 ± 10,56	60,24 ± 11,22	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 4 tuần (c)	57,43 ± 6,73	61,48 ± 8,36	66,27 ± 12,41	$p_{3-2} > 0,05$
				$p_{3-1} > 0,05$
p _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b-a} > 0,05$			-

Ghi chú: - Lô ĐC: uống nước cất liều 0,5 mL/kg TLCT/ngày; Lô TN 1: uống sinh khối tảo liều 300 mg/kg TLCT/ngày; Lô TN 2: uống sinh khối tảo liều 600 mg/kg TLCT/ngày; TLCT - trọng lượng cơ thể

Giải phẫu mô bệnh học gan, thận, lách của thỏ

Sau 30 ngày theo dõi, tiến hành giải phẫu thỏ cho thấy bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy màu sắc, hình thái của gan, thận, lách ở hai lô dùng sinh khối DDH1 không khác so với đối chứng (Fig. 7). Fig. 7 cho thấy vi thể gan, thận, lách dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của CCT ở lô TN 1 và lô TN 2 không có khác biệt so với hình ảnh vi thể gan, thận, lách thỏ ở lô ĐC. Cấu trúc các bè gan bình thường, không thấy hình ảnh hoại tử, thoái hóa tế bào gan. Cấu trúc các tế bào ống thận và các vùng chức năng khác của thận bình thường. Trên hình ảnh lách thấy vùng tủy trắng bắt màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn. Vùng tủy đỏ có màu xanh đỏ, với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào. Không thấy ổ xuất huyết hoặc hoại tử. Kết quả nghiên cứu mô bệnh học gan, thận, lách thỏ cho thấy sinh khối chủng DDH1 giàu DHA, squalen và carotenoid, astaxanthin khi dùng đường uống với liều 300 mg và 600 mg/kg TLCT/ngày liên tục trong 30 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của thỏ.

Như vậy, thỏ cho uống sinh khối chủng DDH1 giàu DHA, squalen, carotenoid 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 thử nghiệm.

Nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập của sinh khối chủng DDH1 của chuột nhắt trắng

Tác dụng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập của sinh khối chủng DDH1 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. 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 DDH1 liên tục trong 30 ngày với 2 mức liều 1250 và 5.000 mg/kg TLCT (Bảng 6). 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 để thực hiện phản xạ cả 2 lô thí nghiệm được uống sinh khối chủng DDH1 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 DDH1 giàu DHA, squalen, carotenoit và astxanthin có tác dụng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập trên động vật thực nghiệm (chuột nhắt trắng), cung cấp cơ sở khoa học cho việc sử dụng sinh khối chủng DDH1 làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người.

Bảng 6. Kết quả đo phản xạ tìm kiếm thức ăn trong mê lộ trên CNT

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	$19,71 \pm 2,15$	$18,93 \pm 2,03$	$37,35 \pm 1,67$
Lô TN1	$12,34 \pm 2,01$	$14,21 \pm 2,11$	$22,69 \pm 1,87$
Lô TN2	$12,56 \pm 2,24$	$14,42 \pm 1,97$	$21,37 \pm 2,10$

Ghi chú: - Lô ĐC: uống nước cất liều 0,5 mL/kg TLCT/ngày; Lô TN 1: uống sinh khối tảo liều 1250 mg/kg TLCT/ngày; Lô TN 2: uống sinh khối tảo liều 5000 mg/kg TLCT/ngày; TLCT - trọng lượng cơ thể

F. Làm thức ăn trong nuôi trồng thủy sản

Thí nghiệm được tiến hành khi sử dụng sinh khối tươi chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 để làm thức ăn cho luân trùng *Brachionus plicatilis*. Thí nghiệm được tiến hành với các công thức: luân trùng được cho ăn men bánh mì (công thức 1: CT1), luân trùng được cho ăn vi tảo biển quang tự dưỡng *Chaetoceros gracilis* (công thức 2: CT2), luân trùng được cho ăn sinh khối tươi *Aurantiochytrium* sp. DDH1 (công thức 3: CT3). Kết quả thu được được thể hiện ở Fig. 8.

Sinh khối chủng DDH1 có thể thay thế men bánh mì và vi tảo quang tự dưỡng truyền thống (như *Chaetoceros gracilis*) để nuôi luân trùng. Sử dụng thức ăn là sinh khối chủng DDH1 có thể rút ngắn được thời gian nuôi luân trùng. Ở cả 3 công thức đều có sự tăng trưởng liên tục của quần thể luân trùng từ ngày nuôi thứ nhất đến ngày thứ 9. Tuy nhiên, đối với CT1 và CT2, có thời gian đạt mật độ luân trùng cực đại dài hơn hẳn so với CT3 (6 ngày ở CT3 so với 8 ngày

ở CT2 và 10 ngày ở CT1). Mật độ luân trùng ở công thức 1, 2, 3 đạt cực đại tương ứng là 64, 76, 81 cá thể/mL. Công thức 2 và 3 sau 8 ngày nuôi có dấu hiệu suy giảm mật độ, song vẫn dao động ở mức 75 - 79 cá thể/mL. Hàm lượng lipid, axit béo tổng số và PUFAs trong CT3 cao hơn so với các công thức còn lại đạt $125,63 \pm 6,41$; $61,47 \pm 2,18$ và $35,42 \pm 1,13$ mg/g SKK, tương ứng. Hàm lượng PUFAs omega 3-6 trong luân trùng ở CT3 đạt cao nhất chiếm tới $57,95 \pm 3,81\%$ so với TFA. Kết quả thu được đã cho thấy sinh khối chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 có thể thay thế các thức ăn truyền thống như vi tảo quang tự dưỡng, nấm men bánh mì trong nuôi luân trùng *B. plicatilis* sử dụng trong ương nuôi ấu trùng cá bống bóp và một số ấu trùng tôm, cua và cá khác để nâng cao chất lượng con giống đáp ứng nhu cầu phát triển bền vững của thị trường thủy, hải sản biển của Việt Nam.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Khả năng tổng hợp DHA cao

Thí nghiệm được tiến hành khi nuôi cấy chủng DDH1 trên môi trường M1 dưới ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường như nhiệt độ, độ mặn, nguồn cacbon, nguồn nitơ khác nhau trong 5 ngày. Trong đó ảnh hưởng của các điều kiện nhiệt độ bao gồm (20, 25, 28, 32 và 37°C), độ mặn bao gồm (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,25 và 3,0 ‰), nguồn cacbon (glucoza, saccharoza, maltoza, glycerol, fructoza), nguồn nitơ bao gồm (cao nấm men, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 và phân N-P-K). Kết quả được trình bày trên Bảng 1. Chủng DDH1 có khả năng tổng hợp PUFAs, đặc biệt là DHA cao. Dưới điều kiện 28°C, độ mặn 1,5‰, glucoza 3‰, cao nấm men 1‰, chủng DDH1 có sinh trưởng tốt nhất, hàm lượng lipid tổng số và DHA đạt cao nhất tương ứng là $11,29 \pm 0,32$ g/L, $37,89 \pm 1,04$ % SKK và $32,97 \pm 0,93$ % so với TFA. Hàm lượng DHA khi nuôi trồng chủng DDH1 ở các điều kiện khác nhau có sự khác biệt dao động từ $20,19 \pm 0,73$ đến $32,97 \pm 0,93$ % so với TFA.

Ví dụ 2. Khả năng tổng hợp squalen cao

Chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được nuôi cấy và tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng tổng hợp squalen bằng cách sử dụng chất ức chế terbinafine ở các nồng độ khác nhau từ 0,1 đến 200 µg/mL được bổ sung vào môi trường nuôi. Kết quả cho thấy sau 5 ngày nuôi cấy mật độ tế bào và sinh khối khô giảm so với đối chứng nhưng hàm lượng lipid và squalen tăng lên đáng kể. Mật độ tế bào và sinh khối khô giảm từ $112,32 \pm 2,36$ xuống $34,15 \pm 0,15 \times 10^6$ tế bào/mL và $11,92 \pm 0,14$ xuống $4,51 \pm 0,11$ g/L so với công thức đối chứng ($121,23 \pm 2,74 \times 10^6$ tế bào/mL và $12,89 \pm 0,07$ g/L, tương ứng). Hàm lượng lipid tăng từ $28,09 \pm 1,21$ % sinh khối khô (đối chứng) lên $40,42 \pm 1,05$ % sinh khối khô khi chủng DDH1 được nuôi trong môi trường có bổ sung 200 µg/mL terbinafine sau 5 ngày nuôi. Hàm lượng squalen của chủng DDH1 tăng từ $65,64 \pm 0,45$ lên $99,43 \pm 1,75$ mg/g sinh khối khô, tương ứng khi tăng nồng độ terbinafine từ 0 lên 100 µg/mL. Như vậy, việc bổ sung terbinafine ở nồng độ cao vào môi trường nuôi có thể tăng tích lũy squalen nhưng làm giảm sinh trưởng tảo.

Ví dụ 3. Khả năng tổng hợp carotenoit cao

Chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được nuôi cấy trong môi trường M1. Chủng này đã được xác định có khả năng tổng hợp carotenoit, đặc biệt là astaxanthin cao.

Khả năng tích lũy carotenoit của chủng DDH1 được xác định như sau: nuôi cấy chủng DDH1 trong bình tam giác 500 mL chứa 200 mL môi trường M1, nuôi cấy trong 7 ngày, thu mẫu tại các ngày 1, 3, 5, và 7. Dịch sinh khối được ly tâm ở 3.000 vòng/phút, 4°C, trong 5 phút. Kết quả thu được ở Bảng 2 cho thấy sinh trưởng của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 tăng dần qua các ngày nuôi cấy và đạt cực đại $12,28 \pm 1,12$ g/L sau 5 ngày cấy. Hàm lượng carotenoit và astaxanthin cũng tăng tỉ lệ thuận với sinh khối và đạt cực đại $34,48 \pm 1,15$ và $7,20 \pm 0,34$ µg/g SKK sau 5 ngày nuôi. Do đó, sinh khối của chủng DDH1 có khả năng tích lũy carotenoit và astaxanthin cao khi nuôi cấy chủng này trong môi trường M1.

Ví dụ 4. Làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người

Sinh khối chủng DDH1 có chứa các axit béo omega - 3 đặc biệt là DHA đã được tiến hành nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn trên mô hình động vật.

Nghiên cứu độc tính cấp: Chuột nhắt trắng đã dùng dầu tảo đến mức liều 50 g/kg TLCT mà không có con nào chết cho thấy chưa tìm được liều LD₅₀. Điều này chứng tỏ sinh khối chủng DDH1 là an toàn và không độc.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn: thử cho uống sinh khối chủng DDH1 ở các mức liều 300 mg và 600 mg/kg TLCT/ngày liên tục trong 30 ngày. Kết quả thu được trình bày trên Bảng 4 và 5, Fig. 7.

Kết quả cho thấy ở các mức liều 300 mg và 600 mg/kg TLCT/ngày liên tục trong 30 ngày 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 thử thí nghiệm. Sinh khối chủng DDH1 có tác dụng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập trên mô hình động vật thực nghiệm. Kết quả này đã cung cấp cơ sở khoa học cho việc sử dụng sinh khối chủng DDH1 làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người với tác dụng sinh học là cải thiện trí nhớ, khả năng học tập.

Ví dụ 5. Làm thức ăn trong nuôi trồng thủy sản

Sinh khối tươi *Aurantiochytrium* sp. DDH1 đã được sử dụng để làm thức ăn cho luân trùng *Brachionus plicatilis*. Thí nghiệm được tiến hành với các công thức: luân trùng được cho ăn men bánh mì (công thức 1: CT1), luân trùng được cho ăn vi tảo biến quang tự dưỡng truyền thống *Chaetoceros gracilis* (công thức 2: CT2), luân trùng được cho ăn sinh khối tươi DDH1 (công thức 3: CT3).

Kết quả thu được cho thấy sinh khối DDH1 có thể thay thế men bánh mì và vi tảo quang tự dưỡng để nuôi luân trùng. Sử dụng thức ăn là sinh khối DDH1 có thể rút ngắn được thời gian nuôi luân trùng và mật độ luân trùng cũng cao hơn so với các công thức còn lại. CT3 có mật độ luân trùng cao nhất 81 cá thể/mL sau 6 ngày, cao hơn so với CT1 và CT3 có mật độ luân trùng và thời gian nuôi tương ứng là 64 cá thể/mL trong 10 ngày và 76 cá thể trong 8 ngày. Hàm lượng lipid, axit béo tổng số và PUFAs trong luân trùng ở CT3 cao hơn so với các công thức còn lại đạt $125,63 \pm 6,41$; $61,47 \pm 2,18$ và $35,42 \pm 1,13$ mg/g sinh khối khô, tương ứng (Fig. 8). Kết quả thu được đã cho thấy sinh khối từ DDH1 có thể thay thế các thức ăn truyền thống như vi tảo quang tự dưỡng, nấm men bánh mì trong nuôi luân trùng *B. plicatilis* sử dụng trong ương nuôi ấu trùng cá bống bóp, các loại cá khác cũng như ấu trùng tôm, cua và động vật thân mềm

hai mảng vỏ để nâng cao chất lượng con giống đáp ứng nhu cầu của thị trường sản phẩm biển bền vững và sạch bệnh của Việt Nam.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 được phân lập từ mẫu lá được *Rhizophora apiculate*, thuộc họ Đước Rhizophoraceae đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bờ rừng ngập mặn thuộc vùng biển Hải Hậu, Nam Định, Việt Nam, năm 2008. Chủng này có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi DHA, squalen, carotenoid, astaxanthin cao ngay trong quá trình tăng trưởng về sinh khối. Đây là một ưu điểm nổi trội quan trọng của chủng này, cho phép có thể nhân nuôi được sinh khối chủng DDH1 có năng suất sinh khối cao và sinh khối lại giàu các chất có hoạt tính sinh học nêu trên. Sinh khối chủng DDH1 là nguồn cung cấp PUFAs ω -3 (DHA), squalen và carotenoid/astaxanthin có một số ưu điểm như sau: nhân nuôi sinh khối vi tảo biển dị dưỡng dễ dàng trong các hệ thống bình lên men nên có thể sản xuất sinh khối tảo quanh năm, không phụ thuộc vào mùa vụ và nhiệt độ vì không sử dụng ánh sáng mặt trời; có thể kiểm soát tốt mọi thông số cần thiết trong suốt quá trình nhân nuôi sinh khối; sinh khối tảo có hàm lượng axit béo đơn giản, chủ yếu là DHA có hàm lượng cao được tích lũy song song cùng với tăng trưởng sinh khối cao. Chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 có năng suất sinh khối, hàm lượng lipid, DHA, squalen, carotenoid và astaxanthin đạt cao nhất tương ứng là $11,29 \pm 0,32$ g/L, $37,89 \pm 1,04$ % sinh khối khô, $32,97 \pm 0,93$ % so với axit béo tổng số (TFA), $99,43 \pm 1,75$ mg/g sinh khối khô, $34,48 \pm 1,15$ μ g/g sinh khối khô và $7,20 \pm 0,34$ μ g/g sinh khối khô. Do vậy, sinh khối của chủng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 có thể ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người và thức ăn cho các động vật nuôi nhau trong nuôi trồng thủy sản.

Tài liệu tham khảo

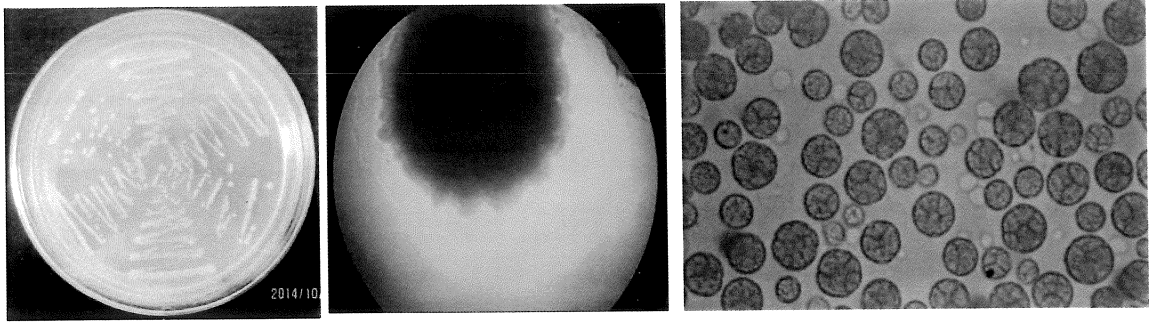
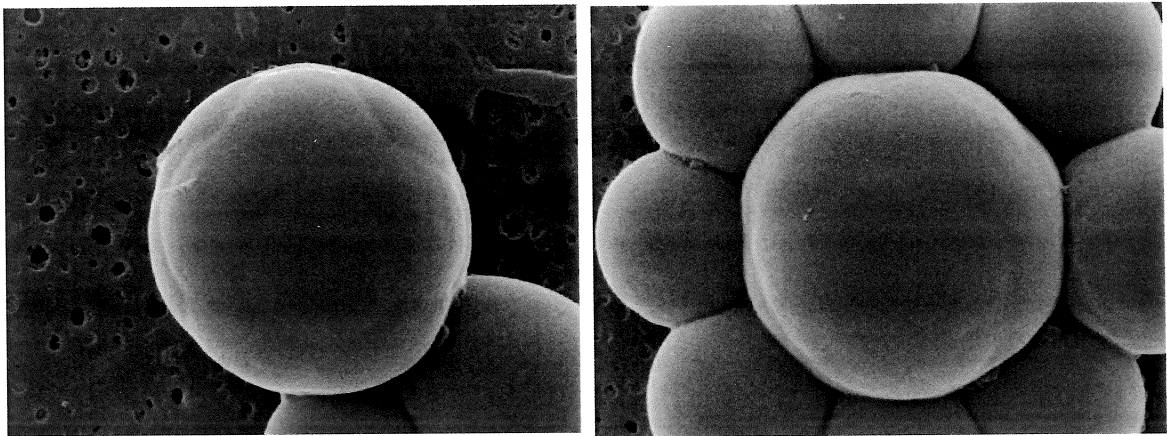
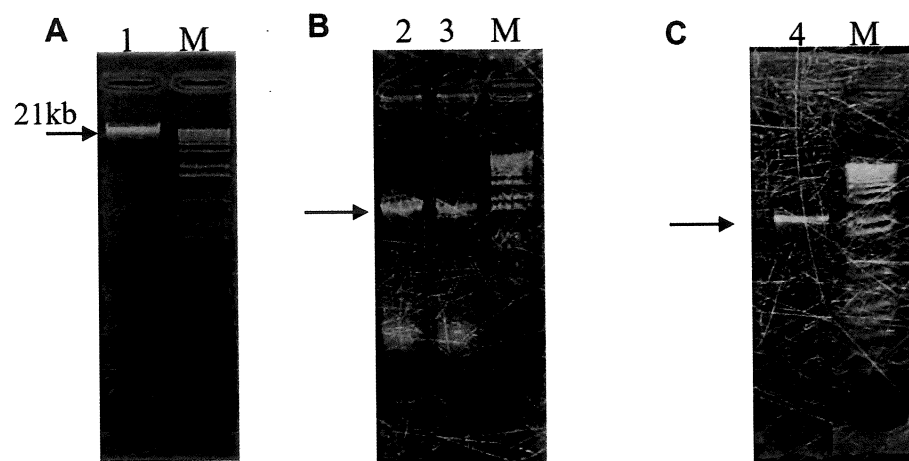
1. Aasen IM, Ertesvåg H, Heggeset TM, Liu B, Brautaset T, Vadstein O, Ellingsen TE. Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016;100(10):4309-4221.
2. Becker W. Microalgae for aquaculture. The nutritional value of microalgae for aquaculture, In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*, 2004:380-391.
3. Bell AN, Moran CA. Identity and Safety of a Novel *Aurantiochytrium* sp. for Terrestrial Heterotrophic Docosahexaenoic Acid Production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2020;11(12):489-509.
4. Bourdon L, Jensen AA, Kavanagh JM, McClure DD. Microalgal production of zeaxanthin. *Algal Research*. 2021;55:102266.
5. Bumbak F, Cook S, Zachleder V, Hauser S, Kovar K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;91(1):31-46.
6. Calder PC. Docosahexaenoic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2016;69(1):8-21.
7. Chen G, Fan KW, Lu FP, Li Q, Aki T, Chen F, Jiang Y. Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. *New biotechnology*. 2010;27(4):382-9.
8. Caamano E, Loperena Kyliam, Hinzpeter I, Pradel P, Gordillo F, Corsini G, Tello M, Lavin P. Gonzalez. Isolation and molecular characterization of *Thraustochytrium* strain isolated from Antarctic Peninsula and its biotechnological potential in the production of fatty acids. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017;48(4): 671-679.
9. Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Lan Anh. 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. 2016. 625 trang.
10. Elshani B, Kotori V, Daci A. 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*. 2021;34(1):124-36.
11. Fan KW, Aki T, Chen F, Jiang Y. Enhanced production of squalene in the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;26(7):1303-1309.
12. Furlan VJ, Maus V, Batista I, Bandarra NM. Production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium* sp. ATCC PRA-276. *Brazilian journal of microbiology*. 2017;48:359-365.
13. Furlan VJ, Batista I, Bandarra N, Mendes R, Cardoso C. Conditions for the Production of Carotenoids by *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185 and *Aurantiochytrium* sp. ATCC PRA-276. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2019;28(5):465-77.
14. Gohil N, Bhattacharjee G, Khambhati K, Braddick D, Singh V. Engineering strategies in microorganisms for the enhanced production of squalene: advances, challenges and opportunities. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019;7:50.
15. Khairy HM, El-Sayed HS. Effect of enriched *Brachionus plicatilis* and *Artemia salina* nauplii by microalga *Tetraselmis chuii* (Bücher) grown on four different culture media on the growth and survival of *Sparus aurata* larvae. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(2):399-415.

16. Leyton A, Flores L, Shene C, Chisti Y, Larama G, Asenjo JA, Armenta RE. Antarctic thraustochytrids as sources of carotenoids and high-value fatty acids. *Marine drugs*. 2021;19(7):386.
17. Li Q, Chen GQ, Fan KW, Lu FP, Aki T, Jiang Y. Screening and characterization of squalene-producing thraustochytrids from Hong Kong mangroves. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(10):4267-4272.
18. Ma QL, Zhu C, Morselli M, Su T, Pelligrini M, Lu Z, Jones M, Denver P, Castro D, Gu X, Relampagos F. The Novel Omega-6 Fatty Acid Docosapentaenoic Acid Positively Modulates Brain Innate Immune Response for Resolving Neuroinflammation at Early and Late Stages of Humanized APOE-Based Alzheimer's Disease Models. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:2364.
19. Manikan V, Nazir MY, Kalil MS, Isa MH, Kader AJ, Yusoff WM, Hamid AA. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. *Algal Research*. 2015 May 1;9:40-7.
20. Martin LJ. Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment. *Marine drugs*. 2015;13(8):4784-4798.
21. Mo C, Douek J, Rinkevich B. Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S rDNA sequence. *Marine Biology*. 2002;140: 883–889.
22. Nagy K, Tiuca ID. Importance of fatty acids in physiopathology of human body. In *Fatty acids*. IntechOpen. 2017.
23. Nakazawa A, Matsuura H, Kose R, Kato S, Honda D, Inouye I, Kaya K, Watanabe MM. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Bioresource Technology*. 2012;109:287-291.
24. Nauroth JM, Liu YC, Van Elswyk M, Bell R, Hall EB, Chung G, Arterburn LM. Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPAn-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema in vivo. *Lipids*. 2010;45(5):375-384.
25. Nazir Y, Phabakaran P, Halim H, Mohamed H, Naz T, Abdul Hamid A and Song Y. Strategic Development of *Aurantiochytrium* sp. Mutants With Superior Oxidative Stress Tolerance and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity for Enhanced DHA Production Through Plasma Mutagenesis Coupled With Chemical Screening. *Front. Nutr*. 2022;9:876649.
26. Nazir Y, Shuib S, Kalil MS, Song Y, Hamid AA. Optimization of culture conditions for enhanced growth, lipid and docosahexaenoic acid (DHA) production of *Aurantiochytrium* SW1 by response surface methodology. *Scientific reports*. 2018;8(1):8909.
27. Ono T. The first step of oxygenation in cholesterol biosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;292(5):1283-8.
28. Park H, Kwak M, Seo J, Ju J, Heo S, Park S, Hong W. Enhanced production of carotenoids using a Thraustochytrid microalgal strain containing high levels of docosahexaenoic acid-rich oil. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2018;41(9):1355-70. DOI: 10.1007/s00449-018-1963-7
29. Pora B, Qian Y, Caulier B, Comini S, Looten P, Segueilha L, Lille AL. Method for the Preparation and Extraction of Squalene From Microalgae. U.S. Patent Appl. 14/118,641. Bucharest: Printech Publishing House. 2014.

30. Porter D. Phylum Labyrinthulomycota. In: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M & Chapman DJ (eds.): Handbook of Protoctista. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 1990.
31. Raghukumar S. Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. Marine biotechnol. 2008;10: 631-640
32. Raghukumar S. Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. Marine biotechnology. 2008b, 10, 631-640.
33. Ren Y, Sun H, Deng J, Huang J, Chen F. Carotenoid production from microalgae: Biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies. Marine Drugs. 2021;19(12):713.
34. Ronco AL, De Stéfani E. Squalene: a multi-task link in the crossroads of cancer and aging. Functional Foods in Health and Disease. 2013;3(12):462-476.
35. Ryder NS. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. British Journal of Dermatology. 1992;126:2-7.
36. Saini RK, Keum YS. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. Life sciences. 2018;203:255-67.
37. Singh V, Braddick D, Dhar PK. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. Gene. 2017; 599: 1–18.
38. Singh V. Recent advancements in synthetic biology: current status and challenges. Gene. 2014;535(1):1-11.
39. Stelzner JJ, Behrens M, Behrens SE, Mäder K. Squalene containing solid lipid nanoparticles, a promising adjuvant system for yeast vaccines. Vaccine. 2018; 36(17): 2314–2320.
40. Strickland J. D. H., Parsons T. R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin No. 167. Hardcover - January 1, 1972.
41. Tharek A, Yahya A, Salleh MM, Jamaluddin H, Yoshizaki S, Hara H, Iwamoto K, Suzuki I, Mohamad SE. Improvement and screening of astaxanthin producing mutants of newly isolated *Coelastrum* sp. using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis technique. Biotechnology Reports. 2021;32:e00673.
42. Valachovic M, Hapala I. Biosynthetic approaches to squalene production: The case of yeast. Methods in molecular biology. 2017; 95-106.
43. Wang Q, Jin W, Han W, Song K, Chen Y, Chen C, Jiang G, Zhou X. Enhancement of DHA production from *Aurantiochytrium* sp. by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis aided with microbial microdroplet culture screening. Biomass Conversion and Biorefinery. 2022;6:1-2.
44. Wang Z, Wang S, Feng Y, Wan W, Zhang H, Bai X, Cui Q, Song X. Obtaining high-purity docosahexaenoic acid oil in thraustochytrid *Aurantiochytrium* through a combined metabolic engineering strategy. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2021;69(35):10215-22.
45. Ward OP, Singh A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. Process biochemistry. 2005;40(12):3627-3652.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chủng vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium* sp. DDH1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu lá đước *Rhizophora apiculate*, thuộc họ Đước Rhizophoraceae đang trong giai đoạn phân hủy và trôi dạt ở ven bờ rừng ngập mặn thuộc vùng biển Hải Hậu, Nam Định, trong đó chủng này có trình tự gen 18S rARN với kích thước 1720 và đã được cấp mã số đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế - GenBank là ON125870 được nêu trong trình tự SEQ ID NO:1, và có khả năng tổng hợp axit béo không bão hòa đa nối đôi là axit docosahexaenoic (DHA) với tỉ lệ $32,97 \pm 0,93\%$ so với axit béo tổng số, đồng thời có khả năng sinh tổng hợp squalen với lượng $65,64 \pm 0,45$ mg/g sinh khối khô, carotenoit với lượng $34,48 \pm 1,15$ µg/g sinh khối khô và astaxanthin với lượng $7,20 \pm 0,34$ µg/g sinh khối khô ở điều kiện 28°C, độ mặn 1,5%, glucoza 3%, cao nấm men 1% và có thể ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người và thức ăn cho các động vật nuôi khác nhau trong nuôi trồng thủy sản.

**Fig. 1****Fig. 2****Fig. 3**



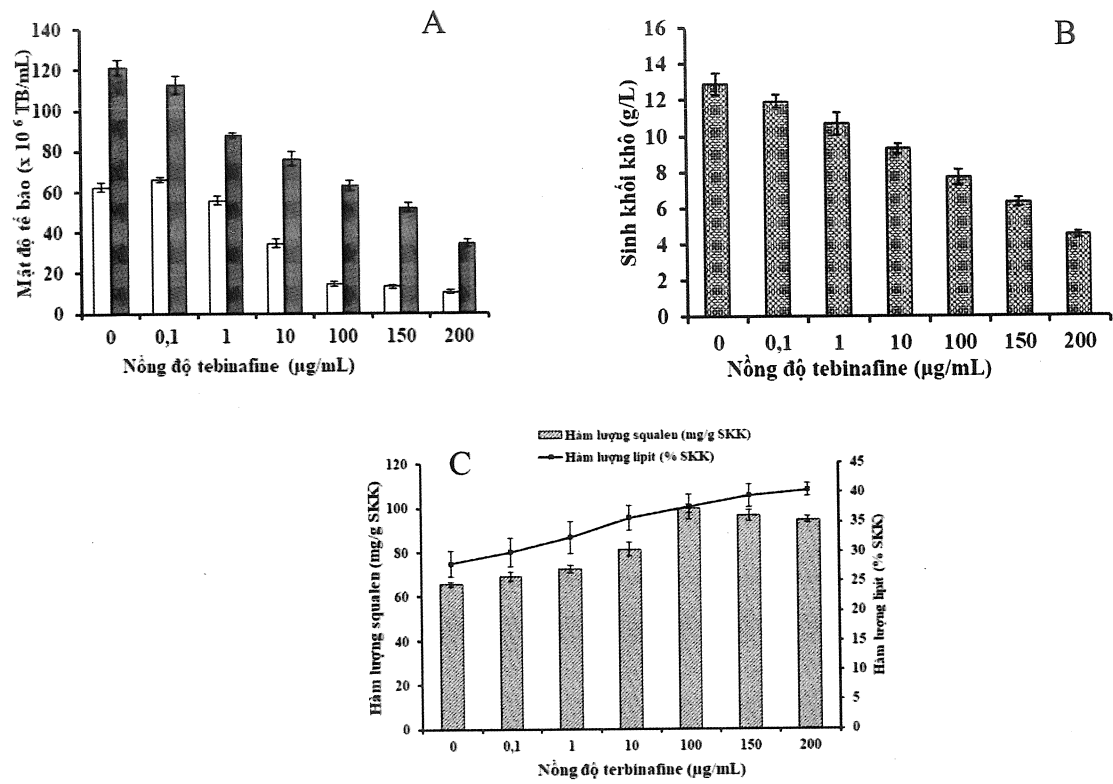


Fig. 6

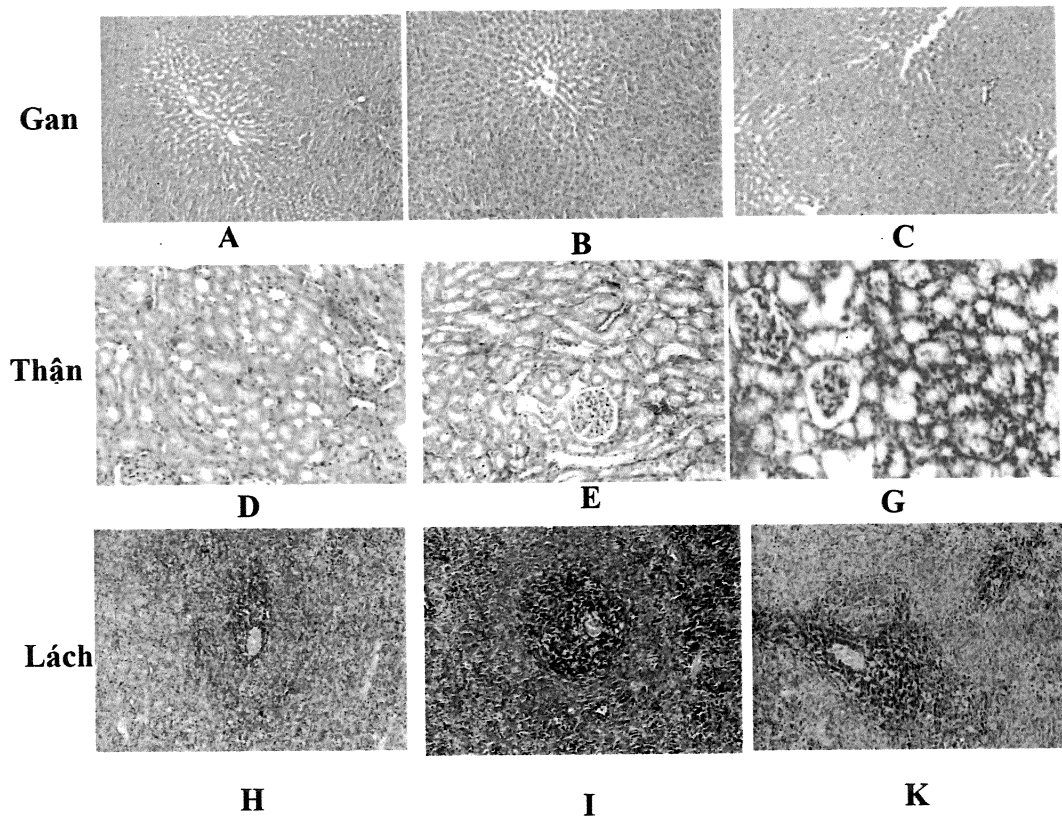


Fig. 7

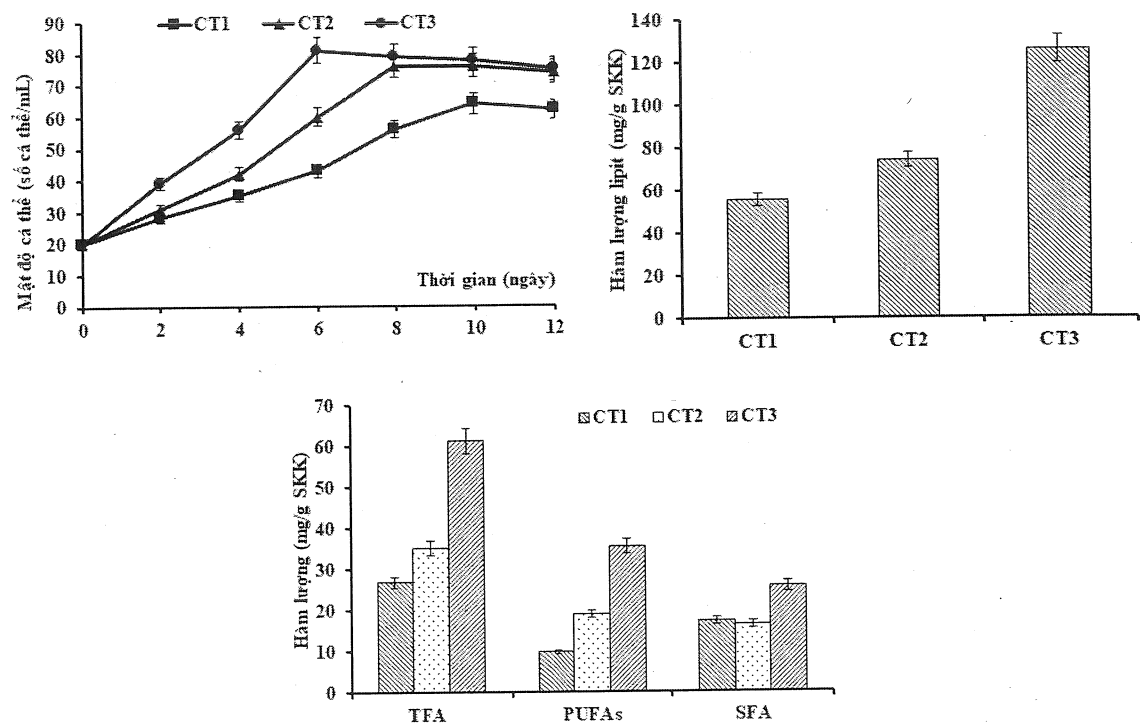


Fig. 8

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* sp. DDH1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tổng hợp axit béo không bão hoà đa nối đôi docosaheptaenoic (DHA), squalen, carotenoit, astaxanthin ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khoẻ cho con người và thức ăn trong nuôi trồng thuỷ sản

<160> 1

<210> 1

<211> 1720

<212> ADN

<213> *Aurantiochytrium* sp.

<400> 1

1	gtctcaaaga	ttaagccatg	catgtgtaag	tataagcgat	tgtactgtga	gactgcgaac	60
61	ggctcattat	atcagtaata	atttccttcg	tagtttcttt	tatatggata	cctgcagtaa	120
121	ttctggaaat	aatacatgct	gtaagagccc	tgatggggc	tgacttatt	agattgaagc	180
181	cgatttttatt	ggtgaatcat	gataattgag	cagattgact	tttttggtcg	atgaatcggt	240
241	tgagtttctg	ccccatcagt	tgctgcaggt	agtgtattgg	actacggtga	ctataacggg	300
301	tgacggagag	ttagggctcg	actccggaga	gggagcctga	gagacggcta	ccatatccaa	360
361	ggatagcagc	aggcgcgtaa	attacccact	gtggactcca	cgaggtagtg	acgagaaata	420
421	tcgatgcgaa	gcgtgtatgc	gttttgctat	cggaatgaga	gcaatgtaa	accctcatcg	480
481	aggatcaact	ggagggcaag	tctggtgcc	gcagccgagg	taattccagc	tccagaagca	540
541	tatgctaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaat	ttctggcatg	ggcgaccggg	600
601	gctttccctg	aatggggatt	gattgtctgt	gttgcccttg	ccatctttct	catgctgtta	660
661	ttggtatgag	atctttcact	gtaatcaaag	cagagtgttc	caagcaggtc	gtatgaccgg	720
721	tatgttttatt	atgggatgat	aagataggac	ttgggtgcta	ttttgttggt	ttgcacgcct	780
781	gagtaatggt	taataggaac	agttgggggt	attcgtatct	aggagctaga	ggtgaaattc	840
841	ttggatttcc	gaaagacgaa	ctagagcgaa	ggcatttacc	aagcatgttt	tcattaatca	900
901	agaacgaaag	tctggggatc	gaagatgatt	agataccatc	gtagtctaga	ccgtaaacga	960
961	tgccgacttg	cgattgttgg	gtgctttttt	atgggcctca	gcagcagcac	atgagaaatc	1020
1021	aaagtctttg	ggttccgggg	ggagtatggt	cgcaaggctg	aaacttaaag	gaattgacgg	1080
1081	aagggcacca	ccaggagtgg	agctgcggct	taatttgact	caacacggga	aaacttacca	1140
1141	ggtccagaca	taggtaggat	tgacagattg	agagctcttt	catgattcta	tggttggttg	1200
1201	tgcatggccg	ttcttagttg	gtggagtgat	ttgtctgggt	aattccgtta	acgaacgaga	1260
1261	cctcggccta	ctaaatagtg	cgtggtatgg	caacatagta	cgtttttaac	ttcttagagg	1320
1321	gacatgtccg	gtttacgggc	aggaagtctg	aggcaataac	aggtctgtga	tgcccttaga	1380
1381	tgttctgggc	cgcacgcgcg	ctacactgat	gggttcatcg	ggttttaatt	tcaatttttg	1440
1441	gaattgagtg	cttggtcgga	aggcctggct	aatccttgga	acgctcatcg	tgctggggct	1500
1501	agattttttg	aatttttaat	ctccaacgag	gaattcctag	taaacgcaag	tcatcagctt	1560
1561	gcattgaata	cgtccctgcc	ctttgtacac	accgcccgtc	gcacctaccg	attgaacggg	1620
1621	ccgatgaaac	catgggatgt	ttctgttttg	attaattttt	ggacagaggg	agaactcggg	1680
1681	tgaatcttat	tgtttagagg	aagtaaaagt	cgtaacaagg			1720