

ẢNH HƯỞNG CỦA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY LÊN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ SẢN SINH DOCOSAHEXAENOIC AXÍT (DHA) CỦA *SCHIZOCHYTRIUM MANGROVEI* (B072)

¹Phạm Thị Miên, ²Cornel Verduyn

¹*Viện Hải dương học, Nha Trang*

²*Trường Đại học Mahidol, Thái Lan*

Tóm tắt *Schizochytrium* sp. là một loài vi sinh vật biển có khả năng sinh docosahexaenoic axít (DHA) với hàm lượng cao, sử dụng tốt cho người và động vật. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá tỷ lệ các bon (C) và nitơ (N) trong thành phần môi trường lên sự sinh trưởng và sản sinh DHA. Đánh giá ảnh hưởng của nguyên tố manganese ($MnCl_2$) và nguồn natri (Na) để thay thế cho muối biển nhằm tối ưu hóa môi trường cho việc sinh trưởng và sản sinh DHA từ *Schizochytrium mangrovei* (B072). Chúng này được nuôi cấy trong một số môi trường chọn lọc, sinh khối được thu và định lượng sau khi đông cô. Tổng số axít được tách và phân tích qua máy sắc ký khí. Kết quả cho thấy, trong môi trường đường cao nấm men bổ sung $MnCl_2$, B072 có khả năng tạo được 4,92 g/l DHA và 22,5 g/l sinh khối. Trong môi trường dùng nguồn natri (Na_2SO_4) thay thế cho muối biển nhân tạo (ASS) sau 5 ngày nuôi cấy B072 sinh được 0,52 g/l DHA và 11,25 g/l sinh khối. Trong khi ở môi trường dùng thành phần muối biển thay thế cho ASS, B072 sinh được 3,12 g/l DHA và 21,58 g/l sinh khối. Kết luận, manganese ($MnCl_2$) có ảnh hưởng lên sự sinh trưởng và sinh DHA từ *Schizochytrium mangrovei* (B072), thành phần muối biển với giá thành thấp hơn ASS có thể thay thế cho ASS với hàm lượng DHA và sinh khối tương tự như trong môi trường dùng ASS.

EFFECT OF CULTIVATED MEDIA TO THE GROWTH AND DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA) PRODUCTION OF *SCHIZOCHYTRIUM MANGROVEI* (B072)

¹Pham Thi Mien, ²Cornel Verduyn

¹*Institute of Oceanography, 01 Cauda, Vinh Nguyen,*

Nhatrang City, Vietnam

²*Mahidol University, Thailand*

Abstract Docosahexaenoic acid or DHA plays a very important role in biological functions and be beneficial for human and animal. Traditional sources of DHA are fish and fish oil. Because of disadvantages of fish and fish oil such as marine pollution and variable composition, alternative new suitable sources for DHA need to be investigated. *Schizochytrium* sp. was reported as good candidate for

DHA production. The objective of this study is to examine the effect of carbon to nitrogen ratio (C/N ratio) and sodium sources on growth ability and DHA-production of *Schizochytrium mangrovei* (B072). The strain was cultivated in selected media and dry weight of cells was determined. Total fatty acids were extracted and separated by gas chromatography. The results showed that this strain yielded 4.92 g/l DHA and reached a maximum of 22.5 g/l biomass in glucose yeast extract (GYE) medium with added manganese chloride ($MgCl_2$). In the medium with sodium sulfate ($NaSO_4$) was replaced for artificial sea salts (ASS) this strain gave a maxima of 0.52 g/l DHA and 11.25 g/l of biomass after 5 cultivated days, while in the medium with sea salt component was replaced for ASS, B072 yielded a maxima of 3.12 g/l DHA and 21.58 g/l biomass. In summary, manganese had a positive effect on growth and DHA production of *S. mangrovei* (B072) and sea salt components could be replaced for ASS.

I. GIỚI THIỆU

Axít béo omega 3, đặc biệt là docosahexaenoic acid viết tắt là DHA có ảnh hưởng rất tích cực lên người và động vật. Ví dụ: DHA có trong thành phần màng tế bào, trong một số mô tế bào người, DHA chiếm tới hơn 60% tổng số axít béo trong tế bào võng mạc (SanGiovani & Chen, 2005). Omega 3 sẽ làm giảm những nguy cơ về các bệnh tim mạch nếu được bổ sung vào khẩu phần ăn hàng ngày (Jacobson, 2006). Thông thường DHA được sản xuất từ cá biển và dầu cá, nhưng hiện nay nguồn sản xuất DHA từ cá biển và dầu cá đang phải đối đầu với nhiều khó khăn vì nguồn ô nhiễm biển, hàm lượng DHA trong cá theo thời vụ không ổn định và do mùi dầu cá... cùng với nhiều lý do khác mà việc tìm kiếm một nguồn sản xuất DHA hiệu quả hơn đang được quan tâm nghiên cứu (Ward & Singh, 2005). Bản thân cá biển không sinh DHA, DHA có trong dầu cá nhờ thức ăn: cá biển đã tiêu thụ các loài sinh vật trong đó có các vi sinh vật được coi là sinh vật sơ cấp trong chuỗi thức ăn. Đó chính là lý do hợp lý để đưa ra giả thiết rằng có thể sản xuất DHA từ vi sinh vật biển hay không?. Trên thực tế, hiện có hai nhóm vi sinh vật đang được chú ý nghiên cứu cho mục đích sinh sản DHA: một nhóm là tảo Silic biển thuộc họ *Cryptheconidiaceae* và nhóm còn lại là *Thraustochytriidae* (marine protist). *S. mangrovei* (B072) là một loài thuộc *Thraustochytriidae* được cung cấp bởi TS. Somtawin Jaritkuan (Đại học tổng hợp Burapha-Thái Lan). B072 được công bố là một chủng có khả năng sinh sản một lượng lớn DHA và sinh khối cao so với các chủng *Thraustochytriidae* đã công bố (Unagul, 2005). Trong nghiên cứu này, B072 được nuôi trong một số môi trường chọn lọc để nghiên cứu tác động của tỷ lệ các bon /nitơ, ảnh hưởng của mangan ($MnCl_2$) và các thành phần muối biển thay thế muối biển nhân tạo lên sự sinh trưởng và sản sinh DHA.

II. TÀI LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Công tác chuẩn bị

B072 được nuôi trong môi trường GPY ở 25°C trong hai ngày, môi trường GPY bao gồm các thành phần: glucose 10 g/lít, peptone (Difco) 1 g/lít, cao nấm men (Difco) 1 g/lít, agar 15 g/lít, và muối biển 15 g/lít pH = 6,5. 1 ml nước muối biển 15‰ có chứa bào tử sẽ được cấy truyền sang môi trường GPY không thạch và nuôi cấy trong máy lắc ổn nhiệt ở 25°C, 200 rpm và 24 giờ (Fan và cs, 2000; Unagul và cs, 2006).

2. Nuôi cấy thu sinh khối

Thu toàn bộ dịch nuôi cấy trong bình nuôi cấy chuẩn bị ở bước 1, ly tâm 5.000 rpm trong 10 phút và rửa phần kết tủa với axit 2-morpholino ethanesulfonic (MES). Lấy 5 ml tế bào để cấy vào 100 ml môi trường dùng nghiên cứu. Thành phần môi trường được trình bày trong bảng 1 và bảng 2. Tất cả các môi trường đều được khử trùng ở 121°C trong 15 phút, glucose được khử trùng ở 110°C trong 15 phút và sau đó bổ sung vào môi trường. Nuôi cấy B072 trong các môi trường khác nhau ở cùng một máy lắc ổn nhiệt ở 25°C, 200 rpm.

Bảng 1. Môi trường nuôi cấy thí nghiệm 1

Thành phần (g/l)	1A	1B	1C	1D
Glucose	60	60	60	60
DYE	10	10	10	10
MnCl ₂	-	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
ASS	15	15	3,5	70
pH ban đầu	6,5	6,5	6,5	6,5

3. Xác định sinh khối

Hàng ngày, 3 ml dịch nuôi được lấy vào các ống eppendorf đã biết trước trọng lượng (W1i) sau đó ly tâm ở 12.000 rpm trong 10 phút. Thu sinh khối tế bào rửa với nước cất và ly tâm đến sạch, sau đó để lạnh đông cô trong vòng 24 - 48 giờ. Cân trọng lượng các ống eppendorf (W2i) và xác định sinh khối X theo công thức $X = \text{Sum}(W2i - W1i) / 3$ (i=1, 2, 3). Dịch ly tâm đầu tiên dùng để xác định hàm lượng glucose (Fan và cs, 2000; Unagul và cs, 2006).

Bảng 2. Môi trường nuôi cấy thí nghiệm 2

Thành phần (g/l)	2A	2B	2C	2D
Glucose	60	60	60	60
DYE	30	30	10	10
ASS	15	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	15,43	15,43	15,43
MnCl ₂	-	-	1 mg/l	1 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	3,08

4. Phân tích axit béo

Cân sinh khối đã làm lạnh đông cô vào các ống nhỏ tối màu có nắp đậy kín, sau đó methyl hóa bằng 2 ml 4% H₂SO₄ trong methanol, thêm 0,1 g/l chất chống oxy hóa butylated hydroxytoluence (BHT), axit heptadecanoic hay C17 (100 µl của 0,01%) dùng làm chuẩn, lắc đều và đặt vào bồn nước nóng 90°C trong vòng 1 giờ. Sau đó đặt ở nhiệt độ phòng cho đến khi nguội hẳn rồi thêm vào 1ml hexane, 1 ml nước cất. Chất chiết sẽ được chuyển sang một dụng cụ tối màu có chứa một ít Na₂SO₄ để hút nước lẫn trong dịch chiết. Dùng 1 µl chất chiết để chạy sắc ký (GC 17 A-Nhật Bản). Hàm lượng các axit béo sẽ được tính bằng cách so sánh với hàm lượng axit béo 17 (Bligh and Dyer, 1959; Lepage and Claude, 1986).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong môi trường GYE có MnCl₂, B072 sinh trưởng tốt và đạt đến sinh khối cao nhất với 22,5 g/l sau 3 ngày nuôi cấy. Giống như trong môi trường 1A, sinh khối đạt giá trị cao nhất vào thời điểm lượng glucose được tiêu thụ gần như cạn kiệt. Vào ngày nuôi cấy thứ 4, glucose trong cả hai môi trường < 2 g/l thì sinh khối cũng giảm. Trong môi trường có MnCl₂ palmitic axit vẫn là thành phần axit béo chiếm tỷ lệ cao nhất, sau đó đến DHA với tối đa là 32,6 % tổng số axit béo ngoài ra B072 cũng sinh ra các axit béo khác như C15, C14, DPA và C18. Tổng số axit béo B072 sinh ra trong môi trường 1B (67,5 % w/w) cao hơn hẳn so với tổng số axit béo trong môi trường 1A (37,3 % w/w) với DHA chiếm đến 22% w/w do đó sản sinh được 4,95 g/l. Vai trò của manganse đối với sự phát triển của *Schizochytrium mangrovei* chưa được xác minh cụ thể nhưng Unagul chỉ ra nếu thiếu hụt nguyên tố này thì các tế bào rất dễ dàng bị thủy phân (Unagul và cs, 2006).

Bảng 3. Sinh khối và thành phần axit béo của B072 trong môi trường GYE không có MnCl₂ (môi trường 1A)

1A B072	1A B072 d1	1A B072 d2	1A B072 d3	1A B072 d4
Biomass (g/l)	5,60	12,10	21,90	19,70
TFA (g/l)	0,42	3,03	8,16	6,89
DHA (g/l)	0,12	0,63	2,42	1,21
TFA (%w/w)	7,48	25,01	37,27	34,98
DHA (%w/w)	2,08	5,24	11,04	6,15
Thành phần axit béo (% của tổng số axit béo)				
Myristic (C14)	27,92	4,55	2,39	4,26
Pentadecanoic (C15)	10,99	11,75	5,11	7,09
Palmitic (C16)	33,30	56,79	54,99	67,68
Stearic(C18)	0,00	1,27	1,22	0,00
Eicosatrienoic (C20:3n3)	0,00	0,00	0,87	0,00
Docosapentaenoic (DPA)	0,00	4,69	5,80	3,38
Docosahexaenoic (DHA)	27,79	20,97	29,63	17,59

B072 – *Schizochytrium mangrovei*, d: ngày nuôi cấy., TFA: Tổng số axit béo.

Trong môi trường 1A, B072 sinh trưởng đều và đạt đến cao nhất ở 21,9 g/l sinh khối sau 3 ngày nuôi cấy, thành phần axit béo no palmitic axit hay (C16) chiếm đa số tổng các axit béo, sau đó đến pentadecanoic axit (C15) và myristic axit (C14). Omêga - 6 DPA chiếm khoảng 6% và một lượng rất ít khoảng nhỏ hơn 1% eicosatrienoic - một omêga - 3 khác ngoài DHA với gần 30% tổng số axit được hình thành. Tổng số axit béo chiếm đến 37,3% w/w hay 8,2 g/l trong đó DHA đạt giá trị cực đại với 2,4 g/l.

So sánh thành phần các axit béo sinh ra bởi B072 trong môi trường DYE 3% và GYE, trong môi trường chứa 3% DYE hay cao nấm men (Difco) B072 sinh trưởng chậm hơn so với trong môi trường GYE, đồng thời sinh nhiều axit béo hơn (Bảng 5). Trong đó C15 chiếm 13 đến 41% tổng số axit béo (trên DYE 3%) trong khi con số này chỉ chiếm cao nhất là 11,8% (1A) và 3,4% (1B). Tuy có nhiều thành phần các axit béo khác nhưng chúng đều chiếm một tỷ lệ rất nhỏ (< 1%), phần trăm của C16, C14 và DPA gần như không thay đổi so với trong môi trường GYE, nhưng DHA chỉ chiếm tối đa 27,7% tổng số axit béo. Như vậy, trong môi trường DYE 3%, B072 sinh nhiều C15 và ít DHA hơn so

với trong môi trường GYE. B072 đạt được tối đa sinh khối với 26,7 g/l vào ngày glucose gần cạn kiệt (< 2g/l- ngày thứ năm nuôi cấy) sau đó theo thông thường sinh khối giảm khi nguồn thức ăn đã được tiêu thụ hết. B072 sản sinh ra 13 g/l tổng số các axit béo trong đó DHA là 2,3 g/l.

Bảng 4. Sinh khối và thành phần axit béo của B072 trong môi trường GYE có MnCl₂ (môi trường 1B)

1B B072	1B B072 d1	1B B072 d2	1B B072 d3	1B B072 d4
Biomass (g/l)	1,95	11,88	22,50	21,78
TFA (g/l)	0,20	5,69	15,18	13,45
DHA (g/l)	0,05	1,42	4,95	3,20
TFA (%w/w)	10,22	47,92	67,48	61,75
DHA (%w/w)	2,75	11,93	22,00	14,71
<i>Thành phần axit béo (% của tổng số axit béo)</i>				
Lauric (C12)	0,00	0,00	0,24	0,00
C14	0,00	6,33	6,05	7,48
C15	0,00	7,34	3,14	3,59
C16	73,06	55,03	49,63	59,02
C18	0,00	0,94	0,94	0,96
Eicosatrienoic (C20:3n3)	0,00	0,40	0,48	0,00
Arachidonic (C20:4n6)	0,00	0,00	0,39	0,00
DPA	0,00	5,06	6,53	5,14
DHA	26,94	24,90	32,61	23,81

Nuôi cấy B072 trong môi trường DYE 3% với Na₂SO₄ thay thế muối biển nhân tạo (môi trường 2B), giống như trong môi trường 2A, B072 sinh trưởng chậm hơn so với trong môi trường GYE, đồng thời sinh nhiều axit béo hơn (Bảng 6), C15, C16 chiếm đa số bên cạnh các axit béo không no khác như C18: 3n6, C20: 3n3 và C20: 5n3. Tuy có nhiều thành phần các axit béo nhưng chúng đều chiếm một tỷ lệ rất nhỏ (< 1%), B072 nuôi trong 2B cũng sinh ra C16, C14 và DPA với tỷ lệ phần trăm gần như không thay đổi so với trong môi trường GYE, nhưng DHA chỉ chiếm tối đa 26% tổng số axit béo. Như vậy, trong môi trường DYE 3% với Na₂SO₄, B072 sinh nhiều C15 và ít DHA hơn so với trong môi trường GYE. B072 nuôi trong môi trường 2B đạt tối đa sinh khối là 22,2 g/l vào ngày nuôi cấy thứ 6 tại thời điểm đó glucose gần như đã

được tiêu thụ hết (hàm lượng glucose < 2g/l). B072 có thể sản sinh tối đa 8 g/l tổng số axit béo trong đó DHA là 2,1 g/l.

Bảng 5. Sinh khối và thành phần axit béo của B072 trong môi trường 3% DYE (môi trường số 2A)

2A B072	2A B072 d1	2A B072 d2	2AB072 d3	2A B072 d4	2A B072 d5	2A B072 d6
Biomass (g/l)	4,70	9,40	15,50	22,20	26,70	26,60
TFA (g/l)	0,34	1,59	4,12	6,48	13,01	8,24
DHA (g/l)	0,06	0,18	0,73	1,79	2,26	1,92
TFA (%w/w)	7,25	16,90	26,55	29,20	48,74	30,96
DHA (%w/w)	1,36	1,88	4,72	8,09	8,48	7,23
<i>Thành phần axit béo (% của tổng số axit béo)</i>						
Capric (C10)	0,00	0,00	0,00	0,16	0,44	0,00
Lauric (C12)	0,00	0,00	0,00	0,51	1,23	0,00
C14	0,00	3,35	4,40	3,92	7,16	5,27
C15	13,91	32,10	41,08	17,47	18,12	18,23
C16	67,29	50,32	32,83	39,23	48,93	48,08
C18	0,00	0,00	0,00	0,01	0,96	0,00
Oleic (C18:1n9c)	0,00	0,00	0,00	0,71	0,00	0,00
Gamma -linolenic (C18:3n6)	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00
Alpha -linolenic (C18:3n3)	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
Eicosaenoic (C20)	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00
Eicosadienoic (C20:2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,00
Eicosatrienoic (C20:3n6)	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00
Eicosatrienoic (C20:3n3)	0,00	0,00	0,00	0,86	0,34	0,00
Arachidonic (C20:4n6)	0,00	0,00	0,00	0,53	0,00	0,00
Eicosapentaenoic (C20:5n3)	0,00	0,00	0,00	0,34	0,39	0,00
DPA	0,00	3,08	3,90	6,02	4,09	5,05
DHA	18,80	11,13	17,79	27,69	17,40	23,37
Tricosanoic (C23)	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
Tetracosanoic (C24)	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00

Kết quả cho thấy trong môi trường 2A (DYE 3% với ASS) thì B072 có khả năng sinh trưởng tốt hơn và sinh được lượng sinh khối cao hơn so với trong môi trường DYE 3% với Na₂SO₄, có sự khác biệt nhưng không đáng kể về hàm lượng DHA do đó ta thấy Na₂SO₄ có thể thay thế muối biển nhân tạo (ASS) cho mục đích DHA nhưng không phải cho mục đích sinh khối. Trong thí nghiệm với môi trường 2A và 2B cho thấy ở môi trường 2B tốc độ sinh trưởng của B072 chậm và sản sinh một lượng sinh khối ít hơn so với môi trường 2A. B072 là một loài vi sinh khó tính, nó đòi hỏi một số vitamin thiết yếu cho sinh sản và sinh trưởng (Iida, 1996).

Bảng 6. Sinh khối và thành phần axit béo của B072 trong môi trường 3% DYE với Na₂SO₄ thay thế muối biển nhân tạo (môi trường số 2B)

2B B072	2B B072 d2	2B B072 d3	2B B072 d4	2B B072 d5	2B B072 d6	2B B072 d7
Biomass (g/l)	3,76	10,90	18,55	20,63	22,18	21,7
TFA (g/l)	0,37	1,62	5,34	7,13	8,04	5,64
DHA (g/l)	0,04	0,17	1,42	1,34	2,09	0,93
TFA (%w/w)	9,74	14,84	28,78	34,57	36,26	25,98
DHA (%w/w)	1,01	1,59	7,67	6,49	9,42	4,27
<i>Thành phần axit béo (% của tổng số axit béo)</i>						
C12	1,96	0,00	0,63	0,79	0,71	0,00
C14	3,35	2,21	2,32	3,49	2,98	3,53
C15	39,55	61,79	24,78	21,06	14,09	17,04
C16	42,40	23,01	38,63	50,58	47,70	59,12
C18	0,00	0,00	0,77	0,86	0,97	0,00
C18:3n6	0,00	0,00	0,00	0,42	0,25	0,00
C20:3n3	0,00	0,00	0,84	0,00	0,68	0,00
C20:5n3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	0,00
DPA	2,36	2,25	5,39	4,04	5,45	3,85
DHA	10,40	10,73	26,64	18,76	25,97	16,45
C24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00

Muối biển nhân tạo (ASS) có đủ các hàm lượng nguyên tố vi lượng và đa lượng có trong nước biển tự nhiên (Sigma information sheet - thông tin sản phẩm của nhà sản xuất) và theo thông tin sản phẩm của Difco, cao nấm men của hãng này chỉ chứa một lượng rất nhỏ manganese do đó khi nuôi cấy B072 trong môi trường 2B (nguồn natri là Na₂SO₄) thì sinh khối thu được là thấp hơn

hẳn khi nuôi cấy trong cùng môi trường nhưng dùng nguồn natri là ASS (môi trường 2A). Vì hàm lượng DHA thay đổi không đáng kể (môi trường 2A và 2B) do đó có thể dùng Na_2SO_4 thay thế cho ASS để điều chỉnh môi trường nhằm thu được ít nhất là sinh khối không giảm hoặc tăng hơn.

Bảng 7. Sinh khối và thành phần axit béo của B072 trong môi trường GYE, Na_2SO_4 thay thế muối biển nhân tạo (ASS) và MnCl_2 (môi trường 2C)

2C B072	2C B072 d3	2C B072 d4	2C B072 d5
Biomass (g/l)	0,81	3,98	11,25
TFA (g/l)	0,20	0,62	2,38
DHA (g/l)	0,03	0,10	0,52
TFA (%w/w)	24,09	15,65	21,12
DHA (%w/w)	3,24	2,53	4,64
Thành phần axit béo (% của tổng số axit béo)			
C14	0,00	3,77	4,61
C15	0,00	32,71	15,91
C16	86,54	43,63	52,82
DPA	0,00	3,71	4,70
DHA	13,46	16,19	21,97

Theo kết quả thí nghiệm trong môi trường 1A và 1B, MnCl_2 có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và tạo DHA. B072 được nuôi trong môi trường 2C-là môi trường 1B trong đó Na_2SO_4 được thay thế cho ASS, kết quả trên bảng 7 cho thấy B072 sinh trưởng tương đối chậm trong môi trường 2C với sinh khối cao nhất đạt được là 11,25 g/l sau 5 ngày nuôi cấy. Tổng số axit béo chỉ đạt được 2,38 g/l trong đó DHA chiếm tối đa 0,52 g/l. Trong môi trường 2C tỷ lệ cacbon và nitơ là cao hơn so với môi trường 2A và 2B. Theo Bowles (1999), tỷ lệ C/N ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và sản sinh DHA, kết quả này có thể giải thích rằng để sinh trưởng và sản sinh ra DHA, chủng B072 cần một hay một vài nguyên tố hóa học khác ngoài manganes, chỉ 1% DYE thì có thể lượng nguyên tố vi lượng có trong DYE rất ít cho nên không đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng vi lượng cho B072 phát triển một cách tối ưu (Bajpai và cs., 1991; Unagul và cs., 2006).

Theo thông tin sản phẩm của hãng Difco, cao nấm men có hàm lượng MgSO_4 tương đối thấp, cùng với kết quả của Unagul và cs. (2006) công bố về vai trò của MgSO_4 trong việc thúc đẩy sinh trưởng và sản sinh DHA của

Schizochytrium mangrovei Sk-02. B072 được nuôi trong môi trường 2D là môi trường 2C có bổ sung $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ nhằm thu được sản lượng sinh khối cao và nhiều DHA. Trong môi trường 2D, tỷ lệ C/N bằng với tỷ lệ C/N của môi trường 2C. Kết quả nuôi cấy B072 trong môi trường 2D được trình bày trên bảng 8. B072 đạt đến 21,58 g/l sinh khối sau 4 ngày nuôi cấy vào thời điểm glucose đã được tiêu thụ gần như cạn kiệt (glucose <2 g/l), tổng số axit béo đạt đến 10,3 g/l trong đó DHA chiếm 3,2 g/l. Các axit thành phần không có gì khác biệt với những axit thông thường như C16, C14, C15, C20, DPA và DHA.

Bảng 8. Sinh khối và thành phần axit béo của B072 trong môi trường GYE, Na_2SO_4 thay thế muối biển nhân tạo (ASS), $MnCl_2$ và $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (môi trường 2D)

2D B072	2D B072 d2	2D B072 d3	2D B072 d4	2D B072 d5
Biomass (g/l)	3,03	13,43	21,58	20,85
TFA (g/l)	0,48	4,66	10,29	9,53
DHA (g/l)	0,10	1,00	3,21	3,07
TFA (%w/w)	16,01	34,71	47,72	45,73
DHA (%w/w)	3,29	7,43	14,89	14,72
Thành phần axit béo (% của tổng số axit béo)				
C12	0,00	0,00	0,29	0,28
C14	0,00	6,67	6,90	6,56
C15	13,51	10,02	4,59	4,26
C16	65,92	55,83	48,70	48,06
C18	0,00	1,05	0,91	0,91
C20:3n3	0,00	0,68	0,86	0,86
C20:4n6	0,00	0,00	0,37	0,36
C20:5n3	0,00	0,00	0,32	0,47
DPA	0,00	4,34	5,84	6,04
DHA	20,57	21,39	31,21	32,20

IV. KẾT LUẬN

- Manganese có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và sinh sản DHA của *Schizochytrium mangrovei* (B072).
- Tỷ lệ C/N chỉ ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và khả năng tạo DHA khi trong môi trường nuôi cấy đã đáp ứng yêu cầu về các nguyên tố vi lượng cần thiết ví dụ như manganese, sulphate, và Mg.
- Thành phần muối riêng biệt (Na_2SO_4 , MnCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) có thể thay thế cho muối biển nhân tạo (ASS) với mục đích giảm giá thành môi trường mà không ảnh hưởng đến sinh trưởng và sinh sản DHA của *Schizochytrium mangrovei* (B072).

V. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bajpai P., P. K. Bajpai, & O. P. Ward, 1991. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: 706-710.
- Bligh E. G. & W. J. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- Bowles R. D., A. E. Hunt, G. B. Bremer, M. G. Duchars, & R. A. Eaton, 1999. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. *Journal of Biotechnology*, 70: 193-202.
- Fan, K. W., F. Chen, E. B. G. Jones, & L. L. P. Vrijmoed, 2000. Utilization of food processing waste by *Thraustochytrids*. *Fungal Diversity*, 5: 185-194.
- Innis S. M., 2005. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta*, 26 (Supplement 1), S70-S75.
- Iida I., T. Nakahara, T. Nakahara, Y. Kamisaka, H. Yagi, M. Yamaoka, & O. Suzuki, 1996. Improvement of Docosahexaenoic Acid Production in a Culture of *Thraustochytrium aureum* in Medium Optimization. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81 (1): 76-78.
- Jacobson T. A., 2006. Secondary Prevention of Coronary Artery Diseases with Omega-3 Fatty Acids. *American Journal of Cardiology*, 98 (4): 61-70.
- Lepage G. & R. C. Claude, 1986. Transesterification of all classes of lipids in a one - step reaction. *Journal of Lipid Research*, 27: 114-120.
- SanGiovanni J. P. & E. Y. Chew, 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24 (1): 87-138.

Unagul P., 2005. Production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. Ph.D Thesis. King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok. Thailand.

Unagul P., C. Assantachai, S. Phadungruengluij, T. Pongsuteeragul, M. Suphantharika, & C. Verduyn, 2006. Biomass and docosahexaenoic acid formation by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02 at low salt concentrations. *Botanica Marina*, 49: 182-190.

Ward O. P. & A. Singh, 2005. Omega- 3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40 (2): 3627-3652.