

## BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU SQUALENE TRONG MỘT SỐ CHỦNG VI TẢO BIỂN PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

**Đinh Thị Ngọc Mai, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Thị Thơm, Đặng Diễm Hồng\***

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*ddhong60vn@yahoo.com

**TÓM TẮT:** Squalene là một hydrocacbon có mức độ không bão hòa cao và thuộc nhóm triterpen. Thông thường, squalene được sử dụng làm tác nhân giữ ẩm và tạo độ mềm trong công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm. Quan trọng hơn, nó là một chất chống oxy hóa tự nhiên có vai trò bảo vệ tế bào khỏi các gốc tự do, tăng cường miễn dịch và giảm nguy cơ ung thư. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu bước đầu về squalene trong một số chủng vi tảo biển phân lập ở Việt Nam. Với phương pháp so màu bằng quang phổ, chúng tôi đã xác định được hàm lượng squalene của 5 loài vi tảo biển quang tự dưỡng và 2 loài dị dưỡng, trong đó *Schizochytrium mangrovei* là chủng vi tảo có hàm lượng squalene đạt cao nhất là 122 mg/g, tiếp theo là *Thraustochytrium striatum* (21,09 mg/g) và thấp nhất là *Namochloropsis oculata* (0,193 mg/g). Bên cạnh đó, các phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lỏng cao áp (HPLC) cũng đã được sử dụng để phân tích squalene của *S. mangrovei*. Hàm lượng squalene của *S. mangrovei* sau khi được phân tách bằng TLC và định lượng bằng HPLC là 12,63 mg/g lipid không xà phòng hóa, 0,405 mg/g lipid tổng số và 0,203 mg/g sinh khối khô tảo.

**Từ khóa:** Nile Red, phương pháp so màu, sắc ký lỏng cao áp, sắc ký lớp mỏng, squalene, vi tảo biển.

### MỞ ĐẦU

Squalene (2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyl-tetracos-2, 6, 10, 14, 18, 22-hexaene) là một thành phần có trong dầu oliu và có nhiều tác dụng tốt đối với sức khỏe con người. Chúng là một hydrocarbon hợp chất béo không bão hòa với 6 liên kết đôi, chứa 6 đơn vị isoprene để cung cấp bộ khung cho tổng hợp cholesterol, axit mật, steroid và là một chất trao đổi trung gian quan trọng trong sinh tổng hợp sterol và triterpenes ở động, thực vật [14]. Các nghiên cứu dịch tễ học đã cho thấy squalene ức chế hiệu quả các tác nhân hóa học có khả năng gây ung thư ruột kết, phổi, da ở động vật thực nghiệm [24]. Chúng là chất chống oxy hóa tiềm năng, có thể bảo vệ tế bào khỏi các gốc tự do, tăng cường miễn dịch, giảm nguy cơ ung thư và cholesterol máu [19]. Bên cạnh đó, squalene cũng được sử dụng làm thành phần hòa tan chất béo trong một số sản phẩm mỹ phẩm do chúng được hấp thụ dễ dàng trên da [25]. Các nghiên cứu về lâm sàng cũng đã chỉ ra rằng khoảng 60-85% tổng số squalene được đưa vào cơ thể qua con đường thức ăn đã được hấp thụ và phân bố tới tất cả các mô trong cơ thể. Việc cung cấp thực phẩm chức năng có thành phần squalene cao (khoảng 500 mg/ngày) đã được chứng minh là cần thiết cho sức khỏe dinh dưỡng của con người [6].

Cho đến nay, nguồn squalene thương mại chủ yếu có nguồn gốc từ gan cá mập biển sâu [12] và dầu thực vật [11]. Tuy nhiên, việc duy trì nguồn cung cấp liên tục và lâu dài trong tương lai gặp khó khăn bởi các vấn đề liên quan đến sự bảo tồn loài cá biển tự nhiên cũng như những hạn chế về sự phụ thuộc vào thổ nhưỡng và mùa vụ của các loại cây trồng [13, 23]. Việc tìm kiếm các nguồn thay thế để khai thác squalene đang là vấn đề được các nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm nghiên cứu và công bố. Hiện nay, các nghiên cứu đang tập trung vào những đối tượng vi sinh vật tiềm năng có khả năng sản xuất squalene ở quy mô lớn ở các điều kiện được kiểm soát.

Nấm men được thông báo là có khả năng sản xuất squalene nhưng chứa hàm lượng tương đối thấp [2, 8]. Gần đây, vi tảo đã được phát hiện là đối tượng tiềm năng cho khai thác và sản xuất squalene trên quy mô lớn. Trên thế giới, một số chi vi tảo như *Botryococcus*, *Thraustochytrium*, *Aurantochytrium* chứa hàm lượng squalene cao đã được nghiên cứu khá kỹ lưỡng [10, 17, 21]. Tảo lục *Botryococcus braunii* có khả năng tổng hợp squalene nhưng lại có tốc độ sinh trưởng thấp và lại là cơ thể quang tự dưỡng bắt buộc nên gây khó khăn cho việc thương mại hóa sản phẩm này. Trong khi đó,

một số các loài vi tảo biển dị dưỡng như thraustochytrids được xem như là các nhà máy tế bào tiềm năng cho sản xuất các chất có giá trị cao trong đó có squalene [1, 16]. Chi tảo thraustochytrid có tốc độ sinh trưởng cao trong điều kiện nuôi cấy dị dưỡng có bổ sung nguồn cacbon hữu cơ và không cần có ánh sáng bởi vì cơ thể chúng thiếu bộ máy quang hợp cho cố định carbon [7]. Li et al. (2009) [18] cũng đã tiến hành sàng lọc các chủng vi tảo thraustochytrid sản xuất squalene và nhận thấy rằng *Aurantiochytrium* là đối tượng tiềm năng. Mặc dù trên thế giới nhiều nghiên cứu về squalene đã được công bố nhưng đây là lần đầu tiên ở Việt Nam, chúng tôi tiến hành áp dụng các phương pháp đơn giản và hiệu quả để phát hiện nhanh squalene nhằm chọn ra một số loài vi tảo bản địa có khả năng sản xuất squalene hàm lượng cao phục vụ cho các ứng dụng được học sau này.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Chủng tảo và điều kiện nuôi cấy

7 loài vi tảo biển phân lập từ vùng biển Việt Nam bao gồm 5 loài vi tảo biển quang tự dưỡng là *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 HP, *Dunaliella teriolecta* Butcher 1959 HP, *Isochrysis galbana* Parke 1949, *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd 1981 HP, *Tetraselmis convolutae* (Parke & Manton) Noris, Hori & Chihara 1980; và 2 loài vi tảo biển dị dưỡng là *Schizochytrium mangrovei* Raghukumar 1988, *Thraustochytrium striatum* Scheneider 1967 thuộc trong tập đoàn giống của Phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Các loài vi tảo biển quang tự dưỡng được nuôi trong các bình tam giác 1.000 mL chứa 500 mL môi trường Walne có thành phần như sau (g/lít nước biển):  $\text{NaNO}_3$  (hoặc  $\text{KNO}_3$ )-0,1,  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,045,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -0,0336,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,02;  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,0013,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,00036; vi lượng gồm ( $\mu\text{g/L}$ )  $\text{ZnCl}_2$ -2,1,  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -2,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,9,  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -2 và vitamin B12-10  $\mu\text{g/L}$ , vitamin B1-0,2 mg/L, biotin-0,2  $\mu\text{g/L}$ ; chiếu sáng với cường độ 60  $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ , chu kỳ sáng: tối 12/12 giờ ở 28-30°C.

Các loài vi tảo biển dị dưỡng được nuôi trong các bình tam giác 1000 mL chứa 300 mL môi trường M1 (3% glucose, 1% cao nấm men, muối biển nhân tạo 17,5 g/L - tương đương với hàm lượng NaCl là 1,5%), chế độ lắc 200 vòng/phút ở 25-28°C.

### Nhuộm lipid trong tế bào tảo bằng Nile Red

Nhuộm tế bào tảo bằng Nile Red (9-(Diethylamino)-5H benzo [a] phenoxazin-5-one) nhằm mục đích phát hiện các hạt lipid không phân cực trong tế bào tảo. 50  $\mu\text{L}$  dung dịch Nile Red có nồng độ 0,1 mg/mL trong acetone được bổ sung vào 1 mL dịch tảo. Hỗn hợp được vortex nhẹ nhàng và ủ tối trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào tảo đã được nhuộm Nile Red được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (NIKON eclipse 80i-Nhật Bản) với ánh sáng kích thích có bước sóng 450-490 nm và ánh sáng phát huỳnh quang của Nile Red ở bước sóng 540-640 nm [9].

### Tách chiết lipid

Sinh khối tảo quang tự dưỡng sử dụng cho tách chiết lipid và xác định hàm lượng squalene được thu hoạch ở thời điểm trước pha cân bằng và sinh khối tảo dị dưỡng được thu hoạch sau 4 ngày nuôi cấy. Tách chiết lipid từ sinh khối tảo được tiến hành theo phương pháp Bligh và Dyer (1959) [3] với một số cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam. Lipid tổng số được tách chiết từ 1 gam sinh khối tảo khô với 10 mL hỗn hợp dung môi cloroform: methanol (2:1). Dịch chiết được lọc qua giấy lọc GF/C Whatman và chuyển lên phễu chiết. Tiến hành bổ sung thêm 15 mL dung dịch NaCl 0,9%, trộn đều và để yên ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lớp dung môi hữu cơ phía dưới chứa các thành phần lipid được thu nhận. Sau đó, dung môi được loại bỏ hoàn toàn ở 60°C và làm khô trong desiccator. Hàm lượng lipid tổng số được tính bằng số gam lipid thu được trên số gam tảo khô.

### Định lượng squalene bằng phương pháp so màu

1 mL axit sulfuric đậm đặc được bổ sung vào ống nghiệm chứa lipid và ống thí nghiệm được đặt trong bể ổn nhiệt ở 70°C trong 5 phút. Sau giai đoạn giữ ấm, tiến hành bổ sung từ từ 0,5 mL dung dịch formaldehyde và lắc đều ống

chứa mẫu. Sau đó, ống chứa mẫu được đậy nắp và đặt trong nước sôi trong 10 phút. Ngay sau khi đưa mẫu khỏi bể ổn nhiệt, bổ sung 2,5 mL axit axetic lạnh để đưa thể tích mẫu lên 4 mL, trộn đều hỗn hợp và tiến hành xác định mật độ quang ở bước sóng 400 nm bằng máy quang phổ (Hitachi U-1100 Spectrophotometer, Nhật Bản). Hàm lượng squalene trong mẫu được xác định dựa trên giá trị OD<sub>400</sub> thu được và đường chuẩn về mối tương quan giữa hàm lượng squalene chuẩn (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>, Sigma S3626) với giá trị mật độ quang đo được ở bước sóng 400 nm tương ứng [24].

#### Xác định squalene bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

*Phân tách lipid không xà phòng hóa từ lipid tổng số* [17]: Lipid tổng số được cho phản ứng với dung dịch KOH 5% (w/v) trong metanol-nước (4:1 v/v) ở 60°C trong 3 giờ. Sau phản ứng, hỗn hợp được làm nguội đến nhiệt độ phòng và bổ sung thêm 4 mL nước cất. Các lipid không xà phòng hóa được thu nhận bằng cách sử dụng hỗn hợp dung môi hexane-chloroform (4:1 v/v). Dung dịch chứa lipid không xà phòng hóa được làm khô trên đĩa kính đồng hồ và hòa tan lại trong chloroform. Mẫu này được sử dụng để chạy sắc ký lớp mỏng.

*Chạy sắc ký lớp mỏng*: Lipid không xà phòng hóa được phân tách trên bản sắc ký lớp mỏng (TLC) 20 × 20 cm có phủ silicagel 60 (Merck) với pha động là hệ dung môi hexan/diethyleter/axit axetic (70:30:4, v/v/v). Các băng trên bản sắc ký được phát hiện bằng cách phun dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% và sấy khô ở 100°C trong 5 phút.

#### Xác định squalene bằng sắc ký lỏng cao áp

Squalene được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp với cột sắc ký lỏng Thermo Hypersild Gold C18 (150 × 2,1 mm, 3 μm), pha động là dung dịch acetonitrile: nước (9:1, v/v), tốc độ dòng 250 μL/min. Sự nhận dạng squalene được thực hiện bằng cách sử dụng đầu dò PDA Accella với khoảng quét 190-400 nm, bước sóng UV đặt ở 198 nm và thời gian lưu của mẫu có chứa squalene được so sánh với thời gian lưu

của squalene chuẩn (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>, Sigma S3626). Hàm lượng squalene trong mẫu được xác định dựa trên đường chuẩn về mối tương quan giữa nồng độ của squalene chuẩn với diện tích peak tương ứng.

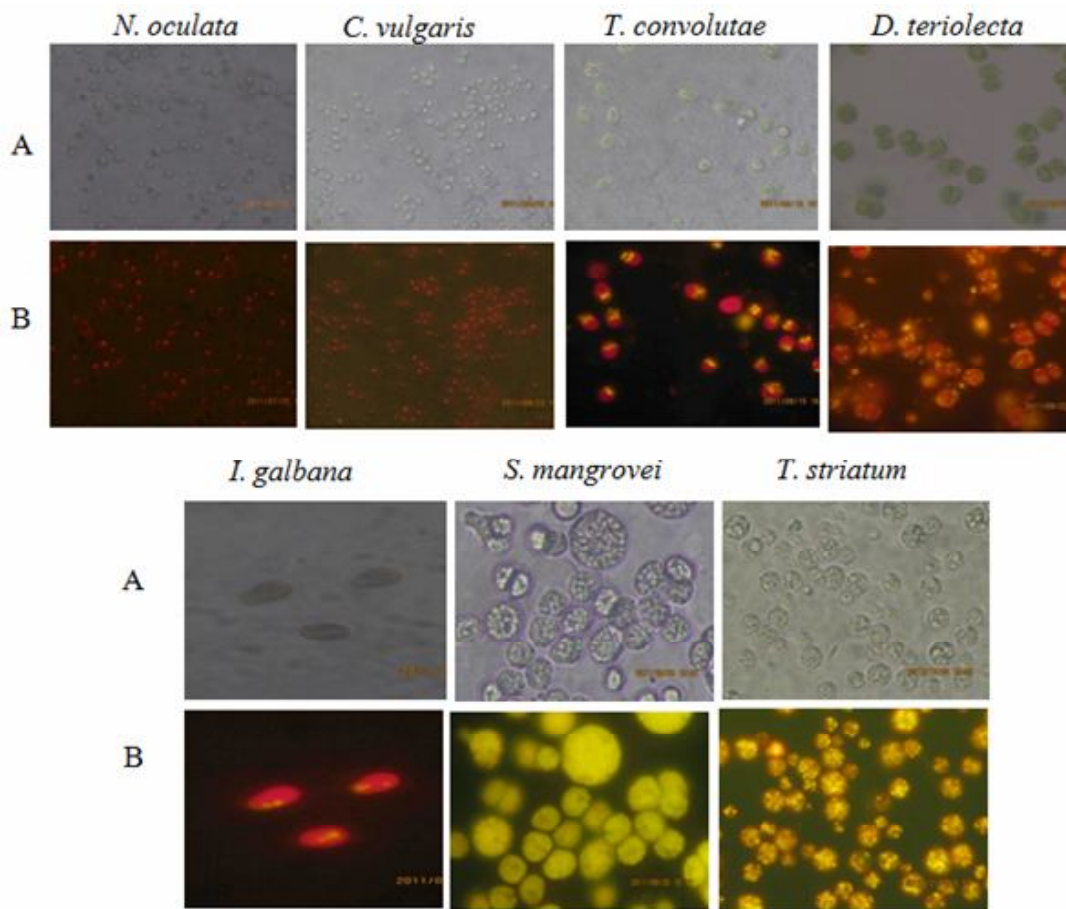
#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Phát hiện nhanh lipid nội bào bằng nhuộm Nile Red

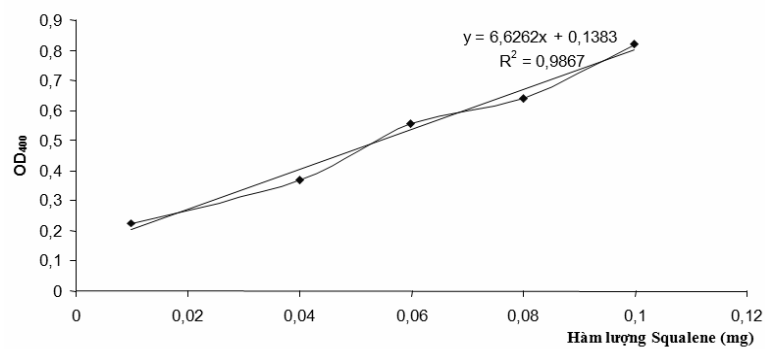
Phương pháp nhuộm Nile Red đã được áp dụng thành công để phát hiện sự có mặt của các hạt lipid trong tế bào nhiều loài vi tảo khác nhau [4, 5, 15]. Dưới kính hiển vi huỳnh quang có ánh sáng kích thích với bước sóng 450-490 nm và ánh sáng phát huỳnh quang của Nile Red ở bước sóng 540-640 nm, các hạt lipid nội bào gồm triglyceride và các hydrocarbon như squalene có màu vàng sáng (hình 1). Mức độ bắt màu vàng của các tế bào *Schizochytrium mangrovei* và *Thraustochytrium striatum* cao hơn so với 5 loài vi tảo còn lại. Vì vậy, có thể thấy rằng, hàm lượng lipid trong tế bào hai loài vi tảo dị dưỡng cao hơn nhiều so với các loài vi tảo quang tự dưỡng.

##### Xác định hàm lượng squalene trong sinh khối tảo bằng phương pháp so màu

Việc xác định hàm lượng squalene bằng phương pháp so màu đơn giản, chi phí thấp cho phép sàng lọc nhanh các chủng vi tảo có khả năng sản xuất squalene cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn sàng lọc 7 loài vi tảo bao gồm *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella teriolecta*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis convolutae*, *Schizochytrium mangrovei* và *Thraustochytrium striatum*. Đây là các loài vi tảo đã được nghiên cứu sâu về đặc điểm sinh lý, sinh hóa và có thể nuôi trồng trên quy mô lớn. Khả năng nuôi trồng trên quy mô lớn là một tiêu chí quan trọng cho sự sản xuất thương mại squalene sau này cũng đã được tính đến khi lựa chọn các chủng/loài vi tảo nghiên cứu. Kết quả đường chuẩn xây dựng được về mối tương quan giữa nồng độ squalene và giá trị OD<sub>400</sub> tương ứng được chỉ ra trên hình 2.



Hình 1. Ảnh chụp tế bào dưới kính hiển vi quang học (A) và kính hiển vi huỳnh quang sau khi nhuộm Nile Red (B) của 5 chủng vi tảo quang tự dưỡng và 2 chủng vi tảo dị dưỡng với độ phóng đại 1500 lần



Hình 2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa hàm lượng squalene và OD400

Dựa vào đường chuẩn nêu trên và giá trị OD<sub>400</sub> của các mẫu lipid tách chiết từ sinh khối tảo, hàm lượng squalene của 7 loài vi tảo nghiên cứu đã được xác định (bảng 1). Kết quả thu

được cho thấy, *S. mangrovei* là chủng vi tảo có hàm lượng squalene đạt cao nhất là 122 mg/g, tiếp theo là *T. striatum* (21,09 mg/g) và thấp nhất là *N. oculata* (0,193 mg/g).

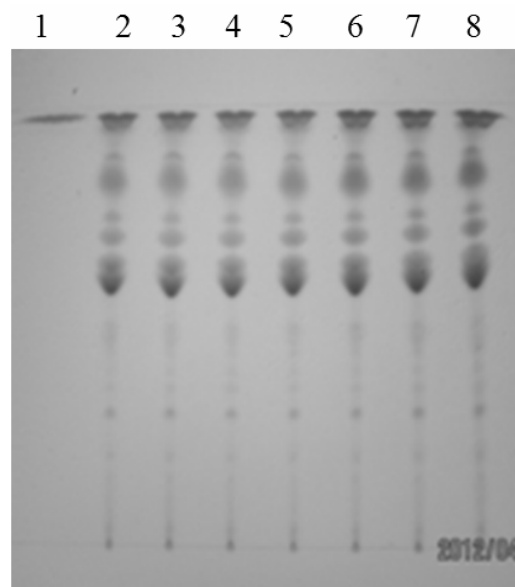
Bảng 1. Hàm lượng squalene của 7 loài vi tảo biển nghiên cứu

Squalene (mg/g sinh khối khô tảo)	<i>N.</i> <i>oculata</i>	<i>C.</i> <i>vulgaris</i>	<i>T.</i> <i>convolutae</i>	<i>I.</i> <i>galbana</i>	<i>D.</i> <i>teriolecta</i>	<i>T.</i> <i>striatum</i>	<i>S.</i> <i>mangrovei</i>
	0,193	3,300	1,850	9,700	6,300	21,090	122,000

Nhiều nghiên cứu về khả năng sản xuất squalene ở các chủng vi tảo khác nhau cũng đã được công bố. Một số loài thuộc chi *Thraustochytrid* như *Thraustochytrium* ACEM 6063 có hàm lượng squalene đạt đến 0,1 mg/g sinh khối và *Aurantiochytrium mangrovei* FB 1 đạt 0,162 mg/g sinh khối [10, 17]. Theo công bố của Nakazawa et al. (2011) [20], hàm lượng và hiệu suất squalene của chủng *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a là 171 mg/g sinh khối khô và 0,9 g/L, tương ứng trong điều kiện nuôi cấy tối ưu ở 25°C, 25-50% nước biển nhân tạo, glucose có nồng độ 2-6%. Ngoài ra, trong nghiên cứu mới nhất của Watanabe (2011) [26], một loài vi tảo biển dị dưỡng *Aurantiochytrium* sp. mới được phân lập từ vùng biển Okinawa của Nhật Bản có tốc độ sản xuất squalene lên đến 2,38 g/L, cao hơn so với chủng *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a được nêu ở trên. Như vậy, so với các công bố khác, hàm lượng squalene của 7 loài vi tảo trong nghiên cứu của chúng tôi tương đối cao, đặc biệt là hai loài vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium mangrovei* và *Thraustochytrium striatum*. Những nghiên cứu tiếp theo để nâng cao hàm lượng squalene trong sinh khối tảo cũng như các thử nghiệm về khả năng nuôi cấy quy mô lớn là cần thiết để nâng cao tiềm năng ứng dụng của các loài vi tảo biển này cho khai thác, sản xuất squalene thương mại.

#### Xác định squalene bằng sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng cao áp

Trong số 7 loài vi tảo nêu trên, chúng tôi đã lựa chọn loài *S. mangrovei* có hàm lượng squalene cao nhất để tiếp tục các phân tích trên sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng cao áp. Các phương pháp sắc ký cho phép phân tách, tinh sạch và định lượng squalene với độ chính xác cao. Kết quả chỉ ra trên hình 3 cho thấy, mẫu lipid không xà phòng hóa tách chiết từ sinh khối tảo *S. mangrovei* có xuất hiện băng tương đồng với băng squalene chuẩn. Đồng thời, phần silicagel có chứa các băng này tiếp tục được sử dụng để phân tích trên sắc ký lỏng cao áp.

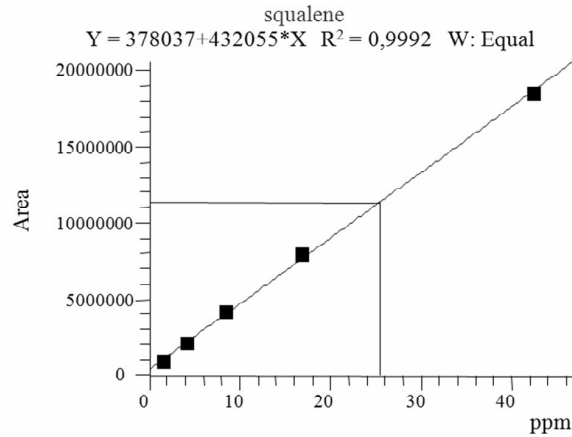


Hình 3. Sắc ký lớp mỏng mẫu lipid không xà phòng hóa tách chiết từ sinh khối *S. mangrovei* (1: squalene chuẩn-2 mg; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: lipid không xà phòng hóa)

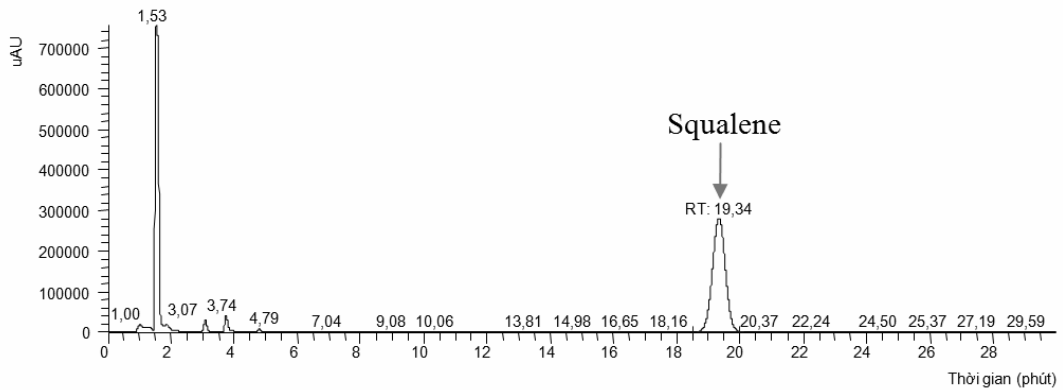
Kết quả chỉ ra trên hình 4, 5 và 6 cho thấy, các điều kiện cho chạy sắc ký lỏng cao áp là phù hợp để phân tách và xác định squalene. Trên sắc ký đồ của mẫu silicagel đem phân tích có peak bằng thời gian lưu của squalene chuẩn. Hàm lượng squalene của *S. mangrovei* sau khi phân tách bằng TLC và định lượng bằng HPLC là 0,203 mg/g sinh khối khô (bảng 2), thấp hơn nhiều so với giá trị tính toán được theo phương pháp so màu. Kết quả về sự chênh lệch giữa giá trị tính toán được theo phương pháp so màu và phương pháp sắc ký cũng được ghi nhận trong công bố của Bhattacharjee et al. (2001) [2]. Một số nguyên nhân được đưa ra để giải thích cho sự chênh lệch này là do sự thất thoát của squalene sau các bước tách chiết và tinh sạch. Đồng thời, trong phương pháp so màu, bên cạnh squalene thì các thành phần khác của lipid như lanosterol hoặc ergosterol cũng cho phản ứng màu dương tính, vì vậy, kết quả tính toán được có thể bao gồm cả squalene và sterol khác [2].

Bảng 2. Hàm lượng squalene của *S. mangrovei* được phân tích bằng TLC và HPLC

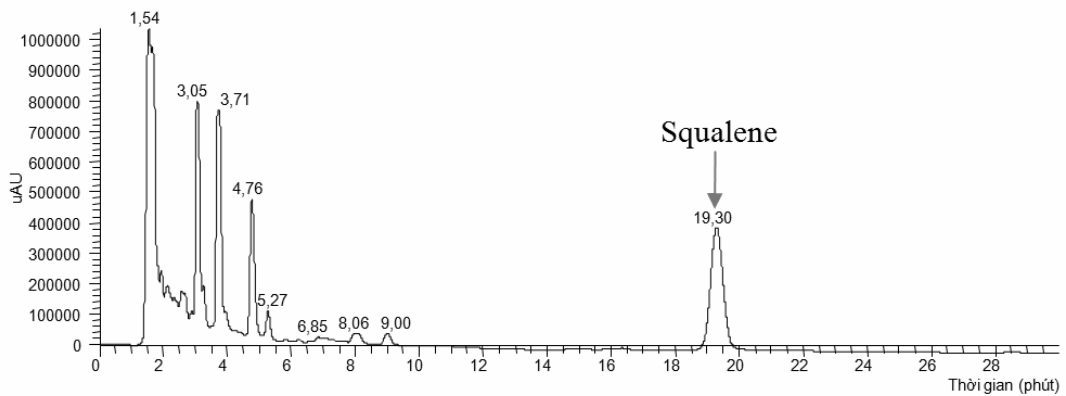
	Hàm lượng squalene (mg/g)
Squalene tính theo lipid không xà phòng hóa	12,630
Squalene tính theo lipid tổng số	0,405
Squalene tính theo sinh khối khô	0,203



Hình 4. Đường chuẩn về mối tương quan giữa hàm lượng squalene và diện tích peak



Hình 5. Sắc ký đồ của squalene chuẩn



Hình 6. Sắc ký đồ của mẫu squalene được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng

Nakazawa et al. (2012) [20] cũng đã xác định hàm lượng squalene trong một số chủng tảo bằng phương pháp TLC kết hợp sắc ký khí (GC), tương tự như phương pháp của chúng tôi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng squalene của 3 chủng *Aurantiochytrium limacinum* 9F-4a, 4W-1b, 18W-13a và chủng *Schizochytrium limacinum* SR21 đạt 0,6; 0,5; 171,1 và 0,2 mg/g, tương ứng. Như vậy, hàm lượng squalene của chủng *S. mangrovei* trong nghiên cứu của chúng tôi (0,203 mg/g) là không cao. Những nghiên cứu nhằm nâng cao hàm lượng squalene trong sinh khối loài vi tảo này như tối ưu môi trường nuôi cấy, bổ sung các chất ức chế sự phân hủy của squalene trong tế bào... là cần thiết và sẽ được chúng tôi công bố trong những công trình tiếp theo.

#### KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu được trình bày nêu trên chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Các hạt lipid trung tính trong tế bào của các loài vi tảo biển quang tự dưỡng và dị dưỡng có thể được quan sát bằng phương pháp nhuộm Nile Red. Đây là phương pháp hiệu quả cho phép sàng lọc nhanh các chủng vi tảo có hàm lượng lipid cao.

Hàm lượng squalene của 7 loài vi tảo nghiên cứu đã được xác định bằng phương pháp so màu. *Schizochytrium mangrovei* là chủng vi tảo có hàm lượng squalene đạt cao nhất là 122 mg/g sinh khối khô. Các chủng vi tảo khác là *Thraustochytrium mangrovei*, *Dunaliella tetiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis convolutae* và *Chlorella vulgaris* có hàm lượng squalene tương ứng là 21,090; 6,300; 9,700; 0,193; 1,850 và 3,300 mg/g.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng cao áp cũng được chỉ ra là hiệu quả cho phép phân tách và xác định squalene với độ chính xác cao. Squalene của *S. mangrovei* sau khi được tinh sạch bằng TLC và định lượng bằng HPLC đạt 0,203 mg/g sinh khối khô tảo, thấp hơn so với giá trị tính toán theo phương pháp so màu do sự thất thoát của squalene sau quá trình tách chiết, tinh sạch và sự can thiệp màu của các sterol khác.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu đánh giá và khai thác chất squalene làm dược phẩm từ tảo của Việt Nam” cấp cơ sở Viện Công nghệ sinh học năm 2012; đề tài NAFOSTED năm 2013-2015 với mã số 106.03-2012.92 cho Phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aki T., Hachida K., Yoshinaga M., Katai Y., Yamasaki T., Kawamoto S., Kakizono T., Maoka T., Shigeta S., Suzuki O., Ono K., 2003. Thraustochytrids as a potential source of carotenoids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 80: 789-794.
2. Bhattacharjee P., Shukla V. B., Singhal R. S., and Kulkarni P. R., 2001. Studies on fermentative production of squalene. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 811-816.
3. Bligh E. G. and Dyer W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
4. Cooksey K. E., Guckert J. B., Williams S. A., Callis P. R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid-content of microalgal cells using Nile red. *J. Microbiol. Methods*, 6: 333-345.
5. Elsey D., Jameson D., Raleigh B., Cooney M. J., 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Methods*, 68: 639-642.
6. Fan K. W., Aki T., Chen F., 2010. Enhanced production of squalene in the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 1303-1309.
7. Fan K.W., Chen F., 2007. Production of high - value products by the marine microalgae thraustochytrids. In: Yang ST (ed) *Bioprocessing for value- added products from renewable resources: new technologies and applications*: 293-323.
8. Formaron-Bonnefond C., Demaretz V., Rosenfeld E., Salmon J. M., 2002. Oxygen addition and sterol synthesis in

- Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, 93: 176-182.
9. Jara A. D. L., Mendoza H., Martel A., Molina C., 2003. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *J. Appl. Phycol.*, 15: 433-438.
  10. Jiang Y., Fan K. W., Wong R. T. Y., 2004. Fatty acids composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1196-1200.
  11. He H. P., Cai Y. H., Sun M., Corke H., 2002. Extraction and purification of squalene from Amaranthus grain. *J. Agric. Food Chem.*, 50:368- 372.
  12. Hernáñez-Pérez M., Gallego R. M. R., Alayo'n P. J. P., Hernáñez A. B., 1997. Squalene content in livers from deep-sea sharks caught in Canary Island waters. *Mar. Freshw. Res.*, 48:573-576.
  13. Ko T. F., Weng Y. M., Chiou R. Y. Y., 2002. Squalene content and antioxidant activity of *Treminalia catappa* leaves and seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50:5343-5348.
  14. Kohno Y., Rgawa Y., Itoh S., Nagaoka S., Takahashi M., Makai K., 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1256: 52-56.
  15. Lee S. J., Yoon B. D., Oh H. M., 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.*, 12: 553-556.
  16. Lewis T. E., Nichols P. D., McMeekin T. A., 1999. The biotechnological potential of thraustochytrids. *Mar. Biotechnol.*, 1: 580-587
  17. Lewis T. E., Nichols P. D., McMeekin T. A., 2001. Sterol and squalene content of a docosahexaenoic acid producing thraustochytrid: influence of culture age, temperature and dissolved oxygen. *Mar. Biotechnol.*, 3: 439-447.
  18. Li Q., Chen G. Q., Fan K. W., Lu F. P., Aki T., Jiang Y., 2009. Screening and characterization of squalene -producing thraustochytrids from Hong Kong mangroves. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 4267-4272.
  19. Malecka M., 1994. The effect of squalene on the thermostability of rapeseed oil. *Nahrung*, 38, 135.
  20. Nakazawa A., Matsura H., Kose R., Kato S., Honda D., Inouye I., Kaya K., Watanabe M. M., 2012. Optimization of culture of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Bioresource Technol.*, 109: 287-291.
  21. Okada S., Devarenne T. P., Chappell J., 2000. Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B. *Arch. Bioche. Biophys.*, 373:307-317.
  22. Rothblat G. H., Martak D. S., and Kritchevsky D., 1962. A quantitative colorimetric assay for squalene. *Anal. Biochem.*, 4: 52-56.
  23. Salvador M. D., Aranda F., Gómez-Alonso S., Fregapane G., 2003. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chem.*, 80:359-366.
  24. Smith D., Espino-Montoro A., Perez-Jimenez F., Pedro-Botet J., Jimenez Pereperez J., Ordovas J. M., 2000. Effect of a high saturated fat and cholesterol diet supplemented with squalene or  $\beta$ -sitosterol on lipoprotein in fib hamsters. *Nutr. Res.*, 20:1309-1318.
  25. Üstündağ Ö., Temelli F., 2004. Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, 31: 235-253.
  26. Watanabe M. M., 2011. Hydrocarbon -producing algae: their potential as a fossil-oil. Abstract of the 6<sup>th</sup> Asian Pacific Phycological Forum (APPF 2011): 4.



**INITIAL STUDIES ON SQUALENE FROM SOME MARINE  
MICROALGAE ISOLATED IN VIETNAM****Dinh Thi Ngoc Mai, Nguyen Cam Ha, Le Thi Thom, Dang Diem Hong**

Institute of Biotechnology, VAST

**SUMMARY**

Squalene is a highly unsaturated aliphatic hydrocarbon and belongs to the triterpene group of oils. Squalene is the last metabolite preceding sterol ring formation in the biosynthetic cholesterol pathway. It is normally used in its natural form as a moisturizing or emollient agent in pharmaceuticals and cosmetic preparations. More importantly, it is a potential oxidation inhibitor; it can protect cell against free radicals, strengthen the body's immune system and decrease the risk for various cancers. In this study, we presented the results of initial research on squalene from seven marine microalgal species isolated in Vietnam coasts. Based on colorimetric method, squalene content in these microalgae was determined. *Schizochytrium mangrovei* reached the highest squalene content of 122 mg/g. Squalene content of 21.090 mg/g for *Thraustochytrium mangrovei*, 6.300 mg/g for *Dunaliella tetiolecta*, 9.700 mg/g for *Isochrysis galbana*, 0.193 mg/g *Nannochloropsis oculata*, 1.850 mg/g for *Tetraselmis convolutae* and 3.300 mg/g for *Chlorella vulgaris* were obtained. Moreover, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography methods were successfully applied to the determination of squalene in *S. mangrovei*. The squalene content of *S. mangrovei* analysed by TLC and HPLC reached 12.630 mg/g of nonsaponifiable lipid, 0,405 mg/g of total lipid and 0,203 mg/g of dry biomass.

**Keywords:** Colorimetric assay, high performance liquid chromatography, marine microalgae, Nile Red, squalene, thin layer chromatography.

*Ngày nhận bài: 3-1-2013*