

Nghiên cứu phân lập tế bào trần rong cải biển (*Ulva lactuca*) thu thập tại Việt Nam

Phạm Thị Mát^{(1)✉}, Lê Thanh Tùng⁽¹⁾, Nguyễn Văn Nguyễn⁽¹⁾

⁽¹⁾ Trung tâm Nghiên cứu hải sản phía Bắc,
 Viện Khoa học thủy sản Việt Nam, Hải
 Phòng, Việt Nam.

✉ Tác giả liên hệ

E-mail: diu.biotb@gmail.com

ORCID: 0000-0003-2145-6093

Trích dẫn bài báo

Phạm, T. M., Lê, T. T., Nguyễn, V. N.
 (2026). Nghiên cứu phân lập tế bào trần
 rong cải biển (*Ulva lactuca*) thu thập tại Việt
 Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt
 đới*, 15(3), 41-51.

<https://doi.org/10.58334/vrtc.jtst.vol.015.922>

Tóm tắt

Công nghệ tế bào trần là một hướng tiếp cận quan trọng trong công nghệ sinh học thực vật và rong biển, cho phép tạo lượng lớn nguồn giống sạch và đồng nhất phục vụ nuôi trồng. Trong đó, việc phân lập tế bào trần quyết định thành công của công nghệ. Bài báo này tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố chính trong quá trình phân lập tế bào trần rong cải biển *U. lactuca* như điều kiện khử trùng, loại enzyme, nồng độ và thời gian sử dụng enzyme để phá vỡ thành tế bào. Kết quả cho thấy, dung dịch natri hypochlorite (NaOCl) 0,5% cho hiệu quả khử trùng tốt nhất với tỷ lệ mẫu sống đạt 90% và mẫu sạch đạt 80%. Bảy loại enzyme khác nhau được thử nghiệm bao gồm cellulase Onozuka R-10, cellulase ((Merck-Sigma), driselase (Merck-Sigma), hemicellulase (Merck-Sigma), pectinase (Novozyme), cellulast (Novozyme) và Viscozyme (Novozyme) cho thấy hiệu quả phân giải thành tế bào có sự khác biệt rõ rệt ($p < 0,05$). Enzyme cellulase (Onozuka R-10) cho hiệu suất phân lập cao nhất, đạt $3,68 \times 10^6$ tế bào trần/g khối lượng tươi. Nồng độ và thời gian xử lý enzyme cũng ảnh hưởng rõ rệt và có xu hướng tỷ lệ thuận với hiệu quả tế bào trần trong ngưỡng giới hạn. Nồng độ enzyme sử dụng thích hợp nhất là 2% với thời gian xử lý 2 giờ. Kết quả nghiên cứu góp phần hoàn thiện cơ sở khoa học cho sản xuất giống rong biển nói chung và rong cải biển nói riêng bằng công nghệ tế bào trần.

Từ khoá

Enzyme cellulase; Phân lập, khử trùng; Tế bào trần; *Ulva lactuca*.

Đặt vấn đề

Rong cải biển *Ulva lactuca* là một trong những loài rong biển phân bố rộng rãi và có giá trị sử dụng cao trên thế giới (Baweja và cộng sự, 2009; Lahaye & Robic, 2007). Loài rong này có chứa hàm lượng protein tương đối cao, giàu vitamin (A, C, E, nhóm B), khoáng chất thiết yếu (Ca, Mg, Fe, I) và các hợp chất sinh học có hoạt tính (Baweja và cộng sự, 2009; Reddy và cộng sự, 2008). Do đó, *U. lactuca* được đánh giá là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho thực phẩm, thực phẩm chức năng và dược - mỹ phẩm. Bên cạnh đó, loài rong này có khả năng sinh trưởng nhanh, chu kỳ sống ngắn và hiệu suất tích lũy sinh khối cao nên *U. lactuca* trở thành đối tượng rong biển có ý nghĩa quan trọng trong phát triển kinh tế sinh học biển (Lahaye & Robic, 2007), và phù hợp với xu hướng phát triển kinh tế xanh bền vững hiện nay. Tuy nhiên, việc khai thác và sử dụng *U. lactuca* hiện nay vẫn chủ yếu dựa vào nguồn tự nhiên hoặc các phương thức nhân giống sinh dưỡng truyền thống. Điều này dẫn đến nhiều hạn chế trong khai thác như: chất lượng rong không đồng đều, khó

chủ động về thời vụ và sản lượng, khó kiểm soát hàm lượng các hợp chất có giá trị dinh dưỡng và hoạt tính sinh học. Bên cạnh đó, việc khai thác thường xuyên trong tự nhiên sẽ dẫn tới nguy cơ suy giảm nguồn lợi rong tự nhiên.

Công nghệ tế bào trần là kỹ thuật loại bỏ thành tế bào bằng enzyme hoặc cơ học để thu nhận tế bào sống chỉ còn màng sinh chất bao bọc. Công nghệ này được xem là nền tảng quan trọng trong công nghệ sinh học thực vật do cho phép thực hiện các nghiên cứu về dung hợp tế bào soma, chuyển gen, biểu hiện gen và chọn tạo giống mới có đặc tính ưu việt (Baweja và cộng sự, 2009; Reddy và cộng sự, 2008). Trên nhiều đối tượng rong biển khác nhau như *Ulva lactuca*, *Ulva reticulata*, *Monostroma oxyspermum*, *Porphyra yezoensis*, *Gracilaria verrucosa*, *Kappaphycus alvarezii* và *Laminaria japonica*, công nghệ tế bào trần đã được ứng dụng rộng rãi trong tái sinh tàn rong hoàn chỉnh, tạo dòng lai soma và cải thiện các đặc tính sinh học quan trọng. Nhiều nghiên cứu cho thấy tế bào trần có khả năng tái sinh thành cơ thể rong hoàn chỉnh với tốc độ sinh trưởng cao, tăng

khả năng thích nghi với điều kiện môi trường bất lợi như biến động độ mặn, nhiệt độ và cường độ ánh sáng, đồng thời nâng cao hàm lượng các hợp chất sinh học có giá trị như carrageenan, agar, ulvan và protein hòa tan (Baweja và cộng sự, 2009; Reddy và cộng sự, 2006, 2008). Ngoài ra, công nghệ tế bào trần còn được sử dụng trong nghiên cứu cơ chế hình thành thành tế bào, tương tác màng sinh chất và biểu hiện gen ở cấp độ tế bào, góp phần mở rộng tiềm năng ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn giống và nuôi trồng rong biển. Tuy nhiên, tại Việt Nam hiện nay, các nghiên cứu về công nghệ tế bào trần trên rong biển vẫn còn hạn chế, đặc biệt đối với các loài rong có giá trị kinh tế.

Quá trình phân lập tế bào trần phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, trong đó phá vỡ thành tế bào là bước then chốt quyết định hiệu quả thu nhận tế bào trần (Reddy và cộng sự, 2008). Do cấu trúc và thành phần polysaccharide của thành tế bào rong biển khác nhau giữa các nhóm rong lục, rong đỏ và rong nâu nên điều kiện xử lý enzyme cũng cần được tối ưu riêng cho từng đối tượng nghiên cứu. Các nghiên cứu cho thấy hiệu quả phân lập tế bào trần chịu ảnh hưởng đáng kể bởi thành phần và nồng độ enzyme, thời gian xử lý, điều kiện thẩm thấu, nhiệt độ, pH môi trường và giai đoạn sinh trưởng của mẫu rong (Chen & Shih, 2000, Reddy và cộng sự, 2006). Vì vậy, việc khảo sát và lựa chọn các điều kiện phân lập phù hợp có ý nghĩa quan trọng nhằm nâng cao hiệu quả tạo tế bào trần cũng như khả năng tái sinh phục vụ nghiên cứu và sản xuất giống rong biển.

Xuất phát từ những vấn đề trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố chính trong quá trình phân lập tế bào trần từ *Ulva lactuca*, góp phần xây dựng quy trình kỹ thuật phục vụ sản xuất giống rong biển.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu rong cải biển *U. lactuca* được thu thập vào tháng 3/2025 từ vùng biển Cát Bà (Hải Phòng) và Lý Sơn (Quảng Ngãi), sau đó chuyển về phòng Nghiên cứu Công nghệ Sinh học Biển - Trung tâm Nghiên cứu hải sản phía Bắc. Rong được nuôi thích nghi trong môi trường nước biển, độ

mặn $30 \pm 1\text{‰}$, có bổ sung dinh dưỡng PES ở điều kiện phòng thí nghiệm dưới ánh sáng đèn huỳnh quang $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối = 12:12, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục.

Nghiên cứu xác định chất và điều kiện khử trùng vật liệu rong cải biển để phân lập tế bào trần

Rong cải biển *U. lactuca* sau khi được thu thập về sẽ được rửa sạch, tạo vật liệu vô trùng để làm nguyên liệu tạo tế bào trần. Những mẫu mô non có màu xanh đặc trưng, không tạp nhiễm thực vật biểu sinh được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm. Phương pháp khử trùng được tiến hành thử nghiệm bằng 3 loại chất với các nồng độ khác nhau bao gồm hỗn hợp kháng sinh, dung dịch natri hypochlorite và nano bạc. Phương pháp khử trùng bằng hỗn hợp kháng sinh dựa theo nghiên cứu của Reddy và Fujita (1989). Rong được chọn (2 cm^2) được làm sạch trong nước biển đã lọc. Sau đó, các mảnh này được rửa nhiều lần bằng nước biển đã hấp khử trùng. Cuối cùng, chúng được ủ trong 100 mL nước biển đã hấp khử trùng chứa 10 mL hỗn hợp kháng sinh (Polne-Fuller và Gibor, 1984) với các nồng độ 5, 10, 15% trong 24 giờ ở $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dưới ánh sáng đèn huỳnh quang $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ và chu kỳ 12:12 giờ sáng; tối (L: D). Phương pháp khử trùng bằng natri hypochloride được thử nghiệm với các nồng độ 0,25%, 0,5%, 0,75% và 1% trong thời gian 5 giây. Khử trùng bằng nano bạc được tiến hành trong thời gian 5 phút với các nồng độ từ 100 ppm đến 1000 ppm, bước nhảy 100 ppm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, với 30 mẫu cho mỗi lần lặp của một công thức.

Nghiên cứu loại enzyme thích hợp để phân lập tế bào trần

Quá trình phân lập tế bào trần rong *Ulva* được tiến hành dựa trên nghiên cứu của Reddy và cộng sự (2006, 2018). Các mẫu mô non của rong cải biển có màu xanh đặc trưng, không bị tạp nhiễm thực vật biểu sinh được lựa chọn làm vật liệu để tiến hành các thí nghiệm phân lập. Sau khi khử trùng, mẫu rong được cắt thành các mảnh nhỏ ($<1 \text{ mm}$) và rửa sạch 3-4 lần bằng nước biển vô trùng để loại bỏ các mảnh vụn. Các đĩa petri được chuẩn bị sẵn các hỗn hợp dung dịch enzyme phân hủy thành tế bào.

Dung dịch enzyme phá vỡ thành tế bào bao gồm enzyme với nồng độ 2%, sodium chloride 1%, dextran sulfate 0,5% (Merck-Sigma) và 25mM 2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid (MES) (Merck-Sigma). Trong thí nghiệm này, các loại enzyme khác nhau bao gồm cellulase Onozuka R -10, cellulase ((Merck-Sigma), driselase (Merck-Sigma), hemicellulase (Merck-Sigma), pectinase (Novozyme), celluclast (Novozyme), Viscozyme (Novozyme) được sử dụng để đánh giá tác động đến quá trình phân giải thành tế bào. Giá trị pH của hỗn hợp dung dịch enzyme được điều chỉnh đạt 6.

Mẫu rong biển sau khi bổ sung vào các đĩa petri chứa các enzyme khác nhau được đưa lên máy lắc (80 vòng/phút), ủ ở nhiệt độ ở $25 \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian 2 giờ. Sau khi ủ, tế bào trần thu được bằng cách lọc hỗn hợp và ly tâm ở điều kiện 800 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Khả năng loại bỏ thành tế bào được thử nghiệm bằng thuốc nhuộm huỳnh quang calcofluor white (0,01 % - Merck - Sigma) nhuộm dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Tỷ lệ sống của tế bào trần được xác định bằng cách nhuộm phần tế bào trần ly tâm thu được với thuốc nhuộm Evans blue tích hợp sẵn trong thuốc nhuộm Calcofluor white (Merck - Sigma). Tế bào trần sống có màng sinh chất còn nguyên vẹn nên Evans blue không đi qua được do đó tế bào không bắt màu. Nếu tế bào trần chết thì Evans blue xâm nhập vào trong tế bào dẫn đến tế bào bắt màu xanh đậm rõ nét.

Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, khối lượng mẫu rong đạt 0,1 gram cho mỗi lần lặp. Chỉ tiêu theo dõi để đánh giá hiệu quả phân giải thành tế bào dựa trên lượng tế bào trần nguyên vẹn thu được tính trên khối lượng tươi của mẫu rong *U. lactuca*.

Nghiên cứu xác định nồng độ enzyme thích hợp để phân lập tế bào trần

Thí nghiệm nghiên cứu nồng độ enzyme thích hợp để phân giải thành tế bào được bố trí với dải nồng độ từ 1 đến 5%, bước nhảy 1%.

Enzyme sử dụng là enzyme được lựa chọn từ kết quả thí nghiệm mục 2.3, ủ với mẫu rong biển trong thời gian 2 giờ. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, khối lượng mẫu rong đạt 0,1 gram cho mỗi lần lặp. Chỉ tiêu theo dõi để đánh giá hiệu quả phân giải thành tế bào dựa trên lượng tế bào trần thu được tính trên khối lượng tươi của mẫu rong *U. lactuca*.

Nghiên cứu thời gian xử lý enzyme thích hợp để phân lập tế bào trần

Thí nghiệm nghiên cứu thời gian xử lý enzyme thích hợp để phân giải thành tế bào được bố trí với khoảng thời gian từ 1 đến 3 giờ, bước nhảy 0,5 giờ. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, khối lượng mẫu rong đạt 0,1 gram cho mỗi lần lặp. Chỉ tiêu theo dõi để đánh giá hiệu quả phân giải thành tế bào dựa trên lượng tế bào trần thu được tính trên 1 gram khối lượng tươi mẫu rong *U. lactuca*.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được lưu ở dạng file Microsoft Excel và xử lý bằng phần mềm SPSS 18. Sự sai khác giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA một nhân tố ở mức ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ với phép kiểm định Tukey's HSD.

Kết quả

Ảnh hưởng của chất khử trùng và nồng độ chất khử trùng đến quá trình tạo vật liệu cho quá trình tách tế bào trần

Khử trùng bề mặt rong *U. lactuca* là bước có ý nghĩa quyết định trong quy trình nuôi cấy tế bào trần, bởi sự hiện diện của vi sinh vật không chỉ gây nhiễm môi trường nuôi cấy mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính của enzyme phân hủy thành tế bào và khả năng sống, tái sinh của tế bào trần (Krishnakumar và cộng sự, 1999; Reddy, 2018). Kết quả nghiên cứu phương pháp khử trùng vật liệu rong cải biển cho nuôi cấy tế bào trần được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu phương pháp khử trùng vật liệu rong cải biển cho nuôi cấy tế bào trần

Công thức	Chất khử trùng	Nồng độ	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)
1	Đối chứng	0	93,33 ± 5,77 ^a	13,33 ± 5,77 ^f
2	Hỗn hợp kháng sinh	5%	70,00 ± 10,00 ^{bc}	66,67 ± 11,55 ^b
3		10%	56,67 ± 5,77 ^c	56,67 ± 5,77 ^{bc}
4		15%	46,67 ± 5,77 ^{cd}	46,67 ± 5,77 ^{cd}
5		0,25%	93,33 ± 5,77 ^a	73,33 ± 5,77 ^b
6	Natri hypochlorite	0,5%	90,00 ± 10,00^{ab}	80,00 ± 0,00^a
7		0,75%	80,00 ± 10,00 ^b	76,67 ± 5,77 ^{ab}
8		1,0%	70,00 ± 10,00 ^{bc}	66,67 ± 5,77 ^b
9		100 ppm	83,33 ± 5,77 ^b	46,67 ± 5,77 ^{cd}
10	Nano bạc	200 ppm	80,00 ± 10,00 ^b	53,33 ± 5,77 ^c
11		300 ppm	73,33 ± 5,77 ^{bc}	63,33 ± 5,77 ^b
12		400 ppm	70,00 ± 0,00 ^{bc}	66,67 ± 5,77 ^b
13		500 ppm	56,67 ± 5,77 ^c	53,33 ± 5,77 ^c
14		600 ppm	46,67 ± 5,77 ^{cd}	46,67 ± 5,77 ^{cd}
15		700 ppm	43,33 ± 5,77 ^d	43,33 ± 5,77 ^d
16		800 ppm	36,67 ± 5,77 ^{de}	36,67 ± 5,77 ^{de}
17		900 ppm	33,33 ± 5,77 ^{de}	33,33 ± 5,77 ^e
18		1000 ppm	23,33 ± 5,77 ^e	23,33 ± 5,77 ^{ef}

Chú thích: Số liệu trình bày là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn SD (n=3). Các chữ cái a, b, c... biểu thị trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức $\alpha = 0,05$ theo phép kiểm định Tukey's HSD.

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp khử trùng bằng các chất khác nhau với nồng độ khác nhau có sự khác biệt rõ rệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Phương pháp khử trùng bằng kháng sinh cho tỷ lệ mẫu sống và mẫu sạch dao động từ 46,67 đến 70%. Việc khử trùng bằng hỗn hợp kháng sinh có ảnh hưởng đến sức sống của mẫu, mẫu bị nhạt màu so với ban đầu. Khử trùng bằng nano bạc với nồng độ càng cao thì tỷ lệ sống càng thấp. Nồng độ 400 ppm cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất. Khử trùng bằng dung dịch natri hypochlorite cho tỷ lệ mẫu sống và mẫu sạch cao. Trong đó, nồng độ

natri hypochlorite 0,5% có hiệu quả cao nhất, đạt tỷ lệ mẫu sống 90% và mẫu sạch 80%. Vì vậy, phương pháp khử trùng vật liệu rong cải biển hiệu quả nhất cho nuôi cấy tế bào trần là sử dụng dung dịch natri hypochlorite 0,5%.

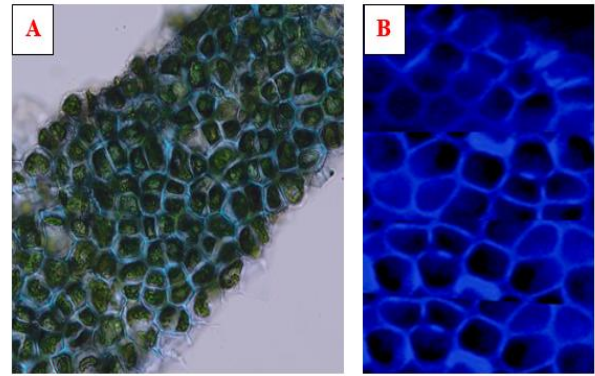
Kết quả nghiên cứu lựa chọn loại enzyme thích hợp để phân lập tế bào trần rong cải biển

Sau quá trình xử lý enzyme (hình 3,4), tế bào trần của rong cải biển *U. lactuca* được thu nhận có dạng hình cầu, bề mặt nhẵn và không còn thành tế bào, không bắt màu thuốc nhuộm huỳnh quang

calcofluor white. Các tế bào trần có lục lạp hình chén phân bố sát màng sinh chất và xuất hiện hiện tượng dòng chất nguyên sinh. Kích thước tế bào trần đạt 20-25 μ m.

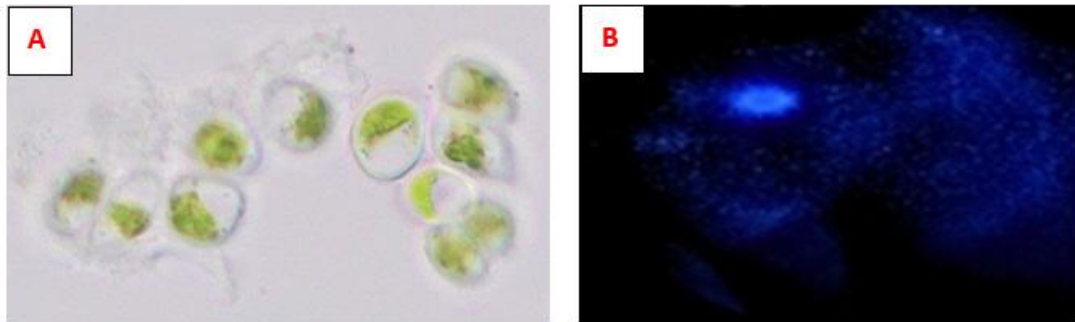
Calcofluor white có khả năng liên kết đặc hiệu với cellulose và các polysaccharide cấu trúc trong thành tế bào. Do đó, các tế bào còn thành tế bào sẽ phát huỳnh quang xanh lam dưới ánh sáng UV (Hình 1), trong khi tế bào trần đã loại bỏ hoàn toàn thành tế bào sẽ không phát huỳnh quang (Hình 2).

Kết quả tác động của các loại enzyme khác nhau đến quá trình phân giải thành tế bào tạo tế bào trần rong cải biển được thể hiện trong bảng 2.



Hình 1. Tế bào rong cải biển ban đầu (có thành tế bào)

- A. Tế bào rong nguyên liệu sau khi nhuộm calcofluor white chụp dưới ánh sáng trắng.
- B. Tế bào rong nguyên liệu sau khi nhuộm calcofluor white chụp dưới ánh sáng huỳnh quang.



Hình 2. Tế bào trần thu được sau khi xử lý mẫu rong với enzyme

- A. Tế bào trần không có thành tế bào. Tế bào trần mới tách mang lục lạp dạng hình chén nằm sát thành;
- B. Tế bào trần khi nhuộm calcofluor white.

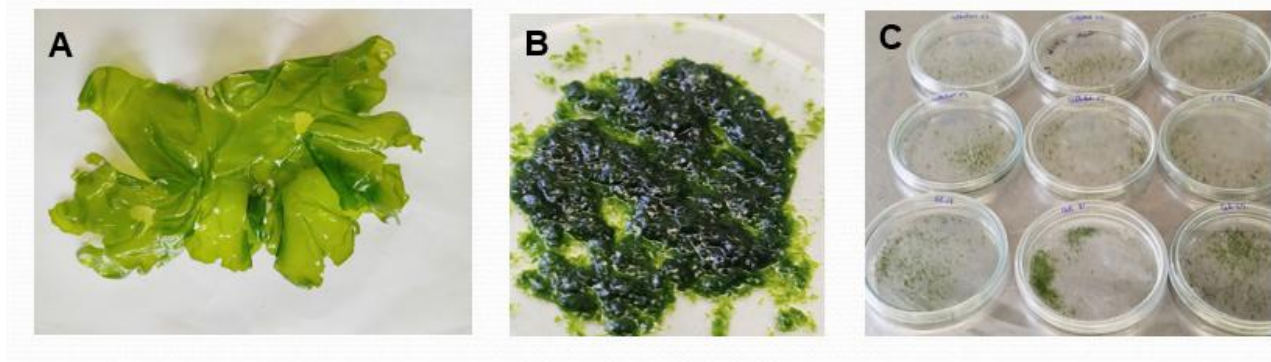
Bảng 2. Tác động của các loại enzyme khác nhau đến khả năng thu tế bào trần của rong cải biển

Công thức	Loại enzyme – hãng (nồng độ 2%)	Số tế bào trần/gram mẫu
1	Cellulase - Merck Sigma	$7,20 \pm 0,33 \times 10^4$ ^b
2	Cellulase - Onozuka R10	$3,68 \pm 0,26 \times 10^6$ ^a
3	Cellulast - Novozyme	$1,48 \pm 0,08 \times 10^4$ ^d
4	Viscozyme - Novozyme	$2,65 \pm 0,16 \times 10^4$ ^c
5	Pectinase - Novozyme	$2,01 \pm 0,51 \times 10^4$ ^{cd}
6	Driselase - Merck-Sigma	$3,02 \pm 0,26 \times 10^3$ ^e
7	Hemicellulase - Merck-Sigma	$6,33 \pm 0,81 \times 10^4$ ^b

Chú thích: Số liệu trình bày là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD (n=3). Các chữ cái a, b, c... biểu thị trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức $\alpha = 0,05$ theo phép kiểm định Tukey's HSD.

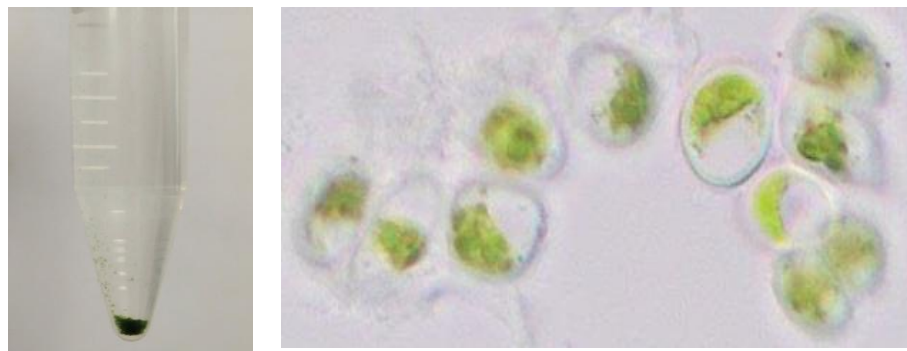
Kết quả nghiên cứu cho thấy, các tế bào trần đều nguyên vẹn và tỷ lệ sống đạt 100% ở các công thức thí nghiệm, tuy nhiên việc sử dụng loại enzyme khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả phân giải thành tế bào để tạo ra tế bào trần. Trong 7 loại enzyme thử nghiệm, enzyme driselase có khả năng phân giải thành tế bào rong

kém nhất, chỉ tạo được $3,02 \pm 0,26 \times 10^3$ tế bào trần/g khối lượng tươi. Ngược lại, việc sử dụng enzyme cellulase Onozuka R10 để phân giải thành tế bào cho lượng tế bào trần lớn nhất, đạt đến $3,68 \pm 0,26 \times 10^6$ tế bào trần/g khối lượng tươi. Vì vậy, enzyme cellulase (Onozuka R10) được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Xử lý mẫu rong cải biến với enzyme

A - Mẫu rong cải biến. B - Rong cải biến được làm nhỏ. C - Rong cải biến được ủ với enzyme

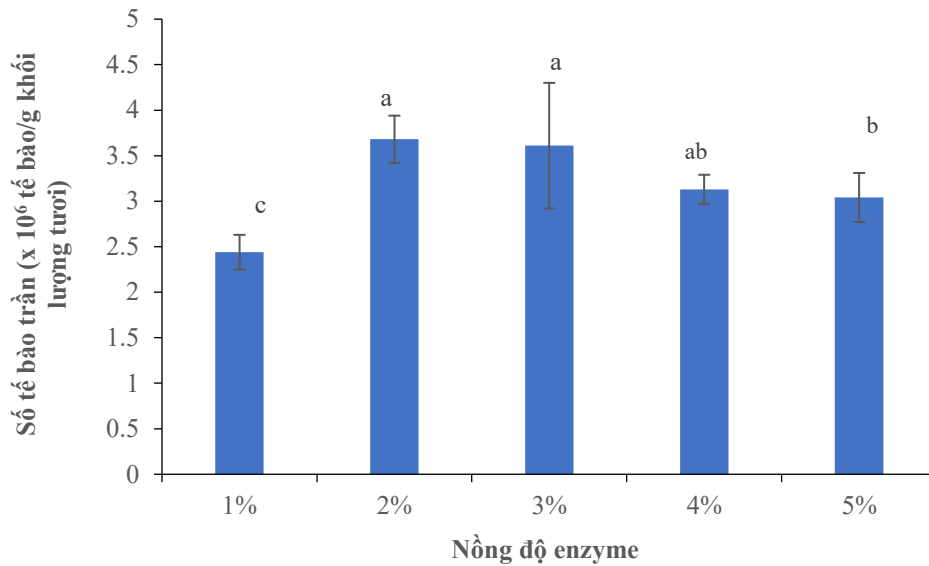


Hình 4. Tế bào trần thu được sau khi ly tâm

Kết quả nghiên cứu xác định nồng độ enzyme thích hợp cho quá trình phân lập tế bào trần rong cải biến

Trong thí nghiệm này, tác động của nồng độ enzyme cellulase (Onozuka R10) đến quá trình phân lập tế bào trần cải biến được đánh giá, kết quả thể hiện trong hình 5. Kết quả cho thấy, sử dụng enzyme ở các nồng độ khác nhau đều thu được tế bào trần nguyên vẹn và các tế bào trần có tỷ lệ sống 100%. Tuy nhiên, nồng độ enzyme cellulase sử dụng ảnh hưởng rõ rệt đến số lượng tế bào trần tạo ra. Cụ thể, số lượng tế bào trần thu được tăng theo nồng độ enzyme cellulase từ 1% đến 2–3%, sau đó giảm dần ở các nồng độ cao hơn. Ở nồng độ 1%, số tế bào trần đạt thấp

nhất, chỉ $2,44 \pm 0,19 \times 10^6$ tế bào/g, và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Khi tăng nồng độ enzyme lên 2%, số lượng tế bào trần tăng rõ rệt, đạt giá trị cao nhất là $3,68 \pm 0,26 \times 10^6$ tế bào/g. Giá trị này không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 3% ($3,61 \pm 0,69 \times 10^6$ tế bào/g), cho thấy hiệu quả phân lập đạt mức tối ưu trong khoảng nồng độ từ 2–3%. Ở các nồng độ enzyme cao hơn (4% và 5%), số lượng tế bào trần thu được có xu hướng giảm, lần lượt đạt $3,13 \pm 0,16 \times 10^6$ tế bào/g và $3,04 \pm 0,27 \times 10^6$ tế bào/g. Các nghiệm thức này có sự khác biệt thống kê so với nhóm nồng độ tối ưu ($p < 0,05$). Như vậy, nồng độ enzyme 2% được lựa chọn sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.



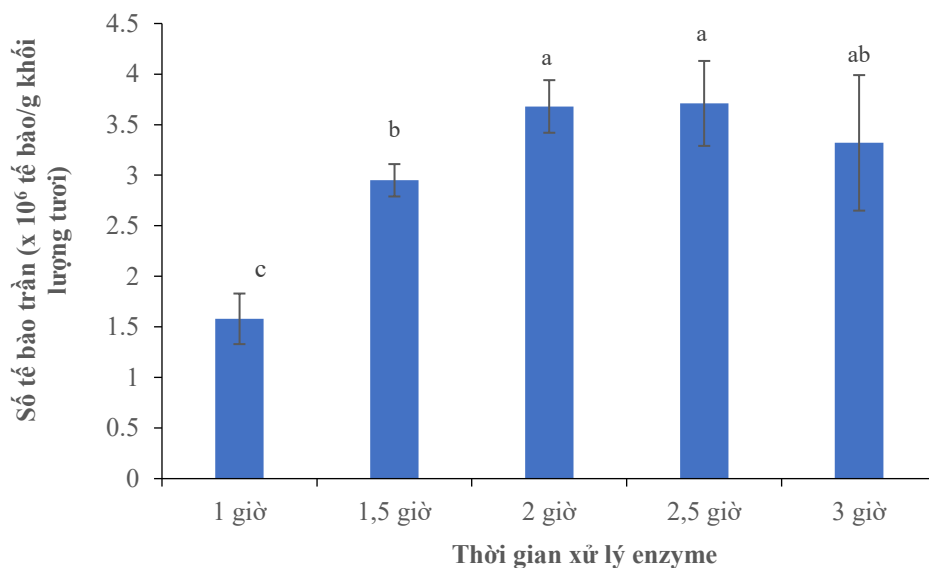
Hình 5. Kết quả phân lập tế bào trần bằng enzyme cellulase Onozuka R-10 ở các nồng độ khác nhau

Chú thích: Số liệu trình bày là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD ($n=3$). Các chữ cái a, b, c... biểu thị trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức $\alpha = 0,05$ theo phép kiểm định Tukey's HSD.

Kết quả nghiên cứu lựa chọn thời gian xử lý enzyme thích hợp để phân lập tế bào trần rong cải biển

Thời gian xử lý enzyme là một trong những yếu tố then chốt quyết định hiệu quả tạo tế bào trần vì

có ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ phân giải thành tế bào. Kết quả lựa chọn thời gian xử lý enzyme thích hợp để phân lập tế bào trần rong cải biển được thể hiện trong hình 6.



Hình 6. Kết quả phân lập tế bào trần bằng enzyme cellulase Onozuka R-10 với thời gian khác nhau

Chú thích: Số liệu trình bày là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD ($n=3$). Các chữ cái a, b, c... biểu thị trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức $\alpha = 0,05$ theo phép kiểm định Tukey's HSD.

Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian xử lý enzyme khác nhau đều thu được tế bào trần nguyên vẹn và có tỷ lệ sống 100% nhưng có ảnh hưởng rõ rệt đến lượng tế bào trần tạo ra. Lượng

tế bào trần được tạo ra tỷ lệ thuận với thời gian xử lý enzyme trong khoảng 1 đến 2,5 giờ. Trong hai giờ đầu, hiệu quả phân giải thành tế bào tăng lên rõ rệt. Số lượng tế bào trần thu được sau khi

xử lý enzyme trong thời gian 1,5 giờ gần gấp đôi so với thời gian 1 giờ. Số lượng tế bào trần thu được sau khi xử lý enzyme trong thời gian 2 giờ gấp 1,25 so với thời gian 1,5 giờ và gấp 2,33 lần so với thời gian 1 giờ. Hiệu quả xử lý trong thời gian 2,5 giờ đạt cao nhất với lượng tế bào trần lên tới $3,71 \pm 0,42 \times 10^6$ tế bào trần/g khối lượng tươi. Tuy nhiên, lượng tế bào trần thu được trong hai công thức thời gian 2 giờ và 2,5 giờ không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Khi tăng thời gian xử lý lên 3 giờ thì lượng tế bào trần bắt đầu giảm xuống, còn $3,32 \pm 0,67 \times 10^6$ tế bào trần/g khối lượng tươi. Như vậy, thời gian xử lý enzyme cellulase phù hợp là trong khoảng 2 giờ.

Thảo luận

Kết quả nghiên cứu khẳng định rằng hiệu quả khử trùng phụ thuộc chặt chẽ vào sự cân bằng giữa khả năng loại bỏ vi sinh vật và duy trì trạng thái sinh lý của mẫu ($p < 0,05$). Trong đó, natri hypochlorite (NaOCl) ở nồng độ 0,5% cho kết quả tối ưu (90% mẫu sống, 80% mẫu sạch), vượt trội so với kháng sinh và nano bạc. Hiệu quả này có thể được giải thích bởi cơ chế oxy hóa mạnh nhưng có kiểm soát của natri hypochlorite, cho phép phá vỡ nhanh cấu trúc tế bào vi khuẩn bám ngoài mà chưa gây tổn thương sâu đến mô rong khi sử dụng ở nồng độ và thời gian thích hợp (Björk và cộng sự, 1992; Reddy & Fujita, 1989). Ngược lại, khi tăng cường độ xử lý, stress oxy hóa vượt ngưỡng sẽ gây peroxy hóa lipid màng và phá hủy hệ sắc tố, làm giảm khả năng sống của protoplast (Krishnakumar và cộng sự, 1999; Reddy và cộng sự, 2006). Ngoài ra, việc loại bỏ hoàn toàn vi sinh vật không phải lúc nào cũng có lợi, do hệ vi sinh nội sinh có thể đóng vai trò trong sinh trưởng và hình thái của *Ulva* (Wichard, 2023). Đối với nano bạc, mặc dù hiệu quả diệt khuẩn cao nhờ khả năng xâm nhập tế bào và ức chế quá trình sao chép DNA của vi khuẩn nhưng kết quả cho thấy tồn tại mối quan hệ tỷ lệ nghịch giữa tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ sống. Ở nồng độ cao, sự tích lũy hạt nano gây độc tế bào thông qua cơ chế tạo ROS và rối loạn cân bằng oxy hóa - khử, dẫn đến giảm sức sống và chết mô (Lansdown, 2006; Mahna và cộng sự, 2013; Navarro và cộng sự, 2008). Xu hướng này cũng

được ghi nhận trên các loài rong khác, trong đó nồng độ trung bình (400–500 ppm) thường cho hiệu quả tối ưu (Lê và cộng sự, 2024; Mo và cộng sự, 2020). Kháng sinh cho hiệu quả khử trùng thấp hơn và phụ thuộc mạnh vào nồng độ cũng như thời gian xử lý. Cơ chế ức chế tổng hợp DNA, RNA và protein không chỉ tác động lên vi khuẩn mà còn ảnh hưởng đến tế bào rong, đặc biệt khi xử lý kéo dài (Xuewu & Kloareg, 1992). Nhiều nghiên cứu cho thấy việc tăng nồng độ hoặc kéo dài thời gian xử lý giúp nâng tỷ lệ mẫu sạch nhưng đồng thời làm giảm đáng kể tỷ lệ sống (Baweja và cộng sự, 2009; Kumar và cộng sự, 2007; Reddy và cộng sự, 2003). Thành tế bào rong *U. lactuca* (Chlorophyta) là một cấu trúc polysaccharide phức tạp, trong đó cellulose vi sợi đóng vai trò nền tảng tạo khung, kèm theo các hemicellulose như xyloglucan, xylan và mannan cùng một lượng nhỏ pectin. Ngoài ra, ulvan là một polysaccharide sulfate hóa đặc trưng của rong lục, chiếm một phần đáng kể trong thành tế bào và có cấu trúc monosaccharide đa dạng gồm rhamnose, glucuronic acid, iduronic acid, và xylose (Lahaye & Robic, 2007). Hiệu suất thu nhận tế bào trần trong nghiên cứu đạt $3,68 \times 10^6$ tế bào trần/g khối lượng tươi, thấp hơn một số nghiên cứu đã công bố trên thế giới nhưng vẫn tương đương với nhiều công bố khác trên rong biển và thực vật thủy sinh. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng ghi nhận rằng hiệu suất tạo tế bào trần trên rong biển biến động rất lớn giữa các loài và phụ thuộc vào nhiều yếu tố như cấu trúc thành tế bào, tuổi mô, mùa thu mẫu, điều kiện sinh trưởng tự nhiên, thành phần enzyme và điều kiện xử lý thẩm thấu. Björk và cộng sự (1992) khi nghiên cứu trên *Ulva rigida* ghi nhận hiệu suất tạo tế bào trần dao động trong khoảng 10^4 - 10^6 tế bào trần/g khối lượng tươi tùy điều kiện xử lý và nồng độ enzyme sử dụng.

Việc lựa chọn enzyme thích hợp để tạo tế bào trần ở rong *Ulva* phụ thuộc chặt chẽ vào thành phần polysaccharide đặc trưng của thành tế bào. Cellulase là enzyme được sử dụng phổ biến nhất trong hầu hết các nghiên cứu tạo tế bào trần ở *Ulva*. Enzyme này xúc tác quá trình thủy phân liên kết β -1,4-glycosidic của cellulose, giúp phá

vỡ bộ khung cơ học chính của thành tế bào. Kết quả nghiên cứu cũng tương tự các nghiên cứu trên thế giới cho thấy rằng Cellulase Onozuka R-10 là enzyme phù hợp và hiệu quả nhất để tạo tế bào trần ở rong *Ulva*, nhờ khả năng nhắm trúng thành phần cấu trúc chủ đạo của thành tế bào. Các nghiên cứu ban đầu trên nhóm Chlorophyta thường áp dụng tổ hợp cellulase và macerozyme, dựa trên giả định rằng cấu trúc thành tế bào rong lục tương đồng với thực vật bậc cao. Krishnakumar và cộng sự (1999) sử dụng cellulase (2–3%) kết hợp macerozyme (0,5–1%) để xử lý *Monostroma oxyspermum* và chỉ đạt tỷ lệ tế bào được giải phóng ở mức trung bình (30–40%), đồng thời yêu cầu thời gian xử lý kéo dài. Kết quả này cho thấy macerozyme với thành phần pectinase là chủ yếu, chỉ đóng vai trò hạn chế trong việc phá vỡ thành tế bào rong lục - nhóm sinh vật vốn có hàm lượng pectin thấp. Uppalapati và Fujita (2002) tiếp tục sử dụng tổ hợp cellulase Onozuka R-10 (2%) và macerozyme R-10 (1%) trên *Ulva pertusa* và thu được $4,6 - 26,8 \times 10^6$ protoplasts/g khối lượng tươi, với tỷ lệ tái sinh cao (>90%). Mặc dù kết quả này cho thấy khả năng duy trì tính sống và tái sinh tốt của protoplast, số lượng tế bào trần thu được vẫn còn hạn chế, cho thấy rằng macerozyme không phải là yếu tố quyết định hiệu suất giải phóng protoplast (Domozych và cộng sự, 2012). Nhận định này được củng cố mạnh mẽ bởi nghiên cứu của Reddy và cộng sự (2006), trong đó cellulase đơn lẻ (Cellulase Onozuka R-10, 2%), trong điều kiện thẩm thấu tối ưu với 0.8 M mannitol, đã tạo ra số lượng protoplast vượt trội ($74,4 - 88,6 \times 10^6$ tế bào/g khối lượng tươi) cùng với tỷ lệ sống và tái sinh cao (89–92%). Kết quả này khẳng định rằng cellulose là thành phần cấu trúc giới hạn chính của thành tế bào *Ulva* và việc tập trung vào enzyme phân giải cellulose là chiến lược hiệu quả nhất. Các nghiên cứu tiếp theo của Reddy và cộng sự (2008, 2018) cho thấy việc bổ sung macerozyme hoặc hemicellulase chỉ cải thiện nhẹ tính ổn định của protoplast hoặc hỗ trợ ở các mẫu rong già có thành tế bào dày, nhưng không mang lại hiệu suất vượt trội so với cellulase đơn lẻ. Sự hạn chế của macerozyme

trong hệ enzyme cho *Ulva* có thể được giải thích từ góc độ cấu trúc thành tế bào. Lahaye và Robic (2007) đã chỉ ra rằng thành tế bào *Ulva* giàu ulvan, một polysaccharide sulfat đặc trưng, khác biệt rõ rệt với pectin của thực vật bậc cao. Do đó, các enzyme pectinase thông thường không phải là mục tiêu phù hợp để phá vỡ thành tế bào *Ulva*. Romero và cộng sự (2023) sử dụng các enzyme thương mại đa hoạt tính như *Cellulysin* và *Viscozyme L* để phá vỡ thành tế bào nhằm chiết ulvan, trong đó *Cellulysin* cho hiệu suất cao nhất đạt 14,1% ulvan trọng lượng khô sau 20 giờ thủy phân. Enzyme này có khả năng phá vỡ thành tế bào hiệu quả nhưng yêu cầu thời gian xử lý dài và không đặc hiệu cho mục tiêu thu nhận protoplast (Malvis Romero và cộng sự, 2023). Nồng độ enzyme là một trong những yếu tố quyết định hiệu quả phá vỡ thành tế bào và chất lượng protoplast thu được ở rong *Ulva*. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy cellulase được sử dụng trong khoảng nồng độ hẹp nhưng tối ưu, thường từ 1–2% (w/v), trong khi nồng độ cao hơn không những không làm tăng hiệu suất mà có thể gây tổn thương tế bào. Reddy và Fujita (2006) đã chứng minh rằng 2% Cellulase Onozuka R-10 là nồng độ tối ưu để tạo protoplast ở *Ulva* spp., cho $74,4 - 88,6 \times 10^6$ protoplast/g khối lượng tươi với tỷ lệ sống lên tới 89–92%. Khi tăng nồng độ cellulase vượt quá mức này, số lượng protoplast không tăng tương ứng, trong khi tỷ lệ tế bào bị tổn thương màng tăng lên, cho thấy sự bão hòa tác động enzyme đối với cấu trúc thành tế bào cellulose vi sợi của *Ulva* (Reddy và cộng sự, 2006). Kết quả này khẳng định rằng hiệu quả phá vỡ thành tế bào phụ thuộc nhiều hơn vào khả năng tiếp cận cơ chất của enzyme hơn là việc gia tăng nồng độ tuyệt đối.

Các nghiên cứu trên thế giới ở nhiều loài *Ulva* cho thấy thời gian xử lý enzyme tối ưu thường tương đối ngắn so với thực vật bậc cao, do thành tế bào rong không chứa lignin. Reddy và cộng sự (2006) đã tiến hành thử nghiệm xử lý enzyme phân giải thành tế bào trong các khoảng thời gian khác nhau từ 1 đến 5 giờ. Kết quả cho thấy thời gian xử lý 2 giờ là tối ưu để giải phóng lượng lớn tế bào trần, đạt tới $102,8 \times 10^6$ tế bào trần/g khối

lượng tươi đối với *M. oxyspermum*, dao động từ $74,4 - 88,6 \times 10^6$ tế bào trần/g khối lượng tươi ở bảy loài *Ulva* và từ $82,5 - 95,4 \times 10^6$ tế bào trần/g khối lượng tươi ở ba loài *Enteromorpha*. Việc kéo dài thời gian xử lý không những không làm tăng mà thậm chí còn làm giảm lượng tế bào trần một cách rõ rệt, đồng thời làm tăng tỷ lệ tế bào bị tổn thương. Khi thời gian xử lý dài (5 giờ), lượng tế bào trần giảm chỉ còn bằng một phần tư so với lượng tế bào trần tạo ra trong thời gian xử lý 2 giờ (Reddy và cộng sự, 2006). Tác giả cho rằng sau khi thành tế bào bị phân giải hoàn toàn, sự tiếp xúc kéo dài với enzyme có thể gây mất ổn định màng tế bào trần, dẫn đến giảm tỷ lệ sống trong nuôi cấy. Ở *Ulva rigida*, Björk và cộng sự (1992) cũng quan sát thấy hiện tượng vỡ protoplast khi thời gian xử lý vượt quá ngưỡng tối ưu.

Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được một số thông số kỹ thuật cho quá trình phân tách tế bào trần rong cải biển. Chất khử trùng vật liệu rong cải biển thích hợp nhất cho nuôi cấy tế bào trần là sử dụng dung dịch natri hypochloride với nồng độ 0,5% cho tỷ lệ mẫu sống đạt 90% và mẫu sạch đạt 80%. Việc sử dụng enzyme cellulase Onozuka R10 với nồng độ 2% trong thời gian 2 giờ cho hiệu quả phân lập tế bào cao nhất, đạt $3,68 \pm 0,26 \times 10^6$ tế bào/g khối lượng tươi. Chất lượng tế bào trần thu được đều nguyên vẹn và có tỷ lệ sống 100%. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu về quá trình tái sinh tế bào trần thành tản rong cải biển *U. lactuca*. Bên cạnh đó, kết quả có thể áp dụng cho quá trình phân tách tế bào trần trên các đối tượng rong biển tương tự khác.

Thông tin tài trợ: Sản phẩm là kết quả nghiên cứu của đề tài “Thử nghiệm công nghệ nuôi cấy tế bào trần sản xuất giống rong cải biển *Ulva lactuca* tại Việt Nam”.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu Hải sản phía Bắc - Viện Khoa học thủy sản Việt Nam cùng chủ nhiệm đề tài đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu, thu thập số liệu để hoàn thành bài báo này.

Tuyên bố về khả năng tiếp cận dữ liệu nghiên cứu: Dữ liệu hỗ trợ cho các kết quả của nghiên cứu này có thể được cung cấp bởi tác giả liên hệ theo yêu cầu hợp lý.

Tuyên bố về đóng góp của tác giả: Phạm Thị Mát: Bỏ thí nghiệm và phân lập tế bào trần, viết bản thảo bài báo; Lê Thanh Tùng: Xây dựng thí nghiệm, chỉnh sửa bản thảo bài báo; Nguyễn Văn Nguyên: Chỉnh sửa bản thảo bài báo.

Tuyên bố về sử dụng GenAI: Các công cụ AI chỉ được sử dụng cho việc chỉnh sửa ngôn ngữ, diễn đạt/định dạng mà không được dùng để tạo nội dung khoa học. Toàn bộ dữ liệu, phân tích và diễn giải đều do các tác giả thực hiện và kiểm chứng, và các tác giả hoàn toàn chịu trách nhiệm đối với bản thảo.

Tuyên bố về xung đột lợi ích: Các tác giả tuyên bố không có xung đột về lợi ích.

Tài liệu tham khảo

- Baweja, P., Sahoo, D., García-Jiménez, P., & Robaina, R. R. (2009). Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: problems, achievements and prospects. *Phycological Research*, 57(1), 45-58. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00520.x>
- Björk M., Pinchetti J. L. G., Reina G. G., & M. Pedersén (1992). Protoplast isolation from *Ulva rigida* (Chlorophyta). *British Phycological Journal*, 11, 70-74. <http://dx.doi.org/10.1080/00071619200650331>.
- Chen, Y. C., & Shih, H. C. (2000). Development Of Protoplasts Of *Ulva Fasciata* (Chlorophyta) For Algal Seed Stock. *Journal of Phycology*, 36(3), 608-615. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99128.x>
- Domozych, D. S., Ciancia, M., Fangel, J. U., Mikkelsen, M. D., Ulvskov, P., & Willats, W. G. (2012). The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3, 82. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>
- Krishnakumar, G. R., Addepalli, M. K., & Reddy, C. R. K. (1999). Regeneration of the thallus of *Monostroma oxyspermum* from protoplast in axenic culture. *Phycological Research*, 38(6), 503-507. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-6-503.1>
- Kumar, G. R., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2007). Callus induction and thallus regeneration from callus of phycocolloid yielding seaweeds from the Indian coast. *Journal of Applied Phycology*, 19(1), 15-25. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9104-0>
- Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765-1774. <https://doi.org/10.1021/bm061185q>
- Lansdown A. B. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Current Problems In Dermatology*, 33, 17-34. <https://doi.org/10.1159/000093928>
- Lê, T. T., Phạm, T. M., Nguyễn, V. N., Nguyễn, T. D., Trần, M. Đ., & Trần, V. H. (2024). Báo cáo tổng kết đề tài: Nghiên cứu ứng dụng công nghệ cao trong sản xuất giống và công nghệ trồng rong cho năng suất, chất lượng carrageenan cao ở miền Trung [Báo cáo tổng kết đề tài]. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.
- Mahna, N., Vahed, S. Z., & Khani, S. (2013). Plant in vitro culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of ex vitro explants. *J Nanomedicine & Nanotechnology*, 4(161), 1. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000161>

- Malvis Romero, A., Picado Morales, J. J., Klose, L., & Liese, A. (2023). Enzyme-Assisted Extraction of Ulvan from the Green Macroalgae *Ulva fenestrata*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(19), 6781. <https://doi.org/10.3390/molecules28196781>
- Mo, V. T., Cuong, L. K., Tung, H. T., Van Huynh, T., Nghia, L. T., Khanh, C. M., Nguyen, N.M. & Nhut, D. T. (2020). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed *Kappaphycus striatus*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(7), 104. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03102-3>
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, P. H., & Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology (London, England)*, 17(5), 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Reddy, C. R. K., & Fujita, Y. (1989). Protoplast isolation and fusion of *Ulva pertusa* and *Ulva conglobata*. In S. Miyachi, I. Karube, & Y. Ishida (Eds.), *Current topics in marine biotechnology* (pp. 235–238). Japanese Society of Marine Biotechnology.
- Reddy, C. R. K., Kumar, G. R. K., Siddhanta, A. K., Tewari, A., & Eswaran, K. (2003). In vitro somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales) 1. *Journal of Phycology*, 39(3), 610-616. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02092.x>
- Reddy, C. R. K., Dipakkore, S., Kumar, G. R., Jha, B., Cheney, D. P., & Fujita, Y. (2006). An improved enzyme preparation for rapid mass production of protoplasts as seed stock for aquaculture of macrophytic marine green algae. *Aquaculture*, 260(1-4), 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.034>
- Reddy, C. R. K., Jha, B., Fujita, Y., & Ohno, M. (2008). Seaweed micropropagation techniques and their potentials: an overview. *Journal of Applied Phycology*, 20(5), 609-617. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9619-8_21
- Reddy, C. R. K. (2018). *Manual for protoplast preparation from Ulva and their seeding for cultivation*. Central Salt and Marine Chemicals Research Institute. <https://10.13140/RG.2.2.20466.15048>
- Wichard T.(2023). From model organism to application: Bacteria-induced growth and development of the green seaweed *Ulva* and the potential of microbe leveraging in algal aquaculture. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 134, 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.04.007>
- Xuewu, L., & Kloareg, B. (1992). Explant exenisation for tissue culture in marine macroalgae. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 10(3), 268-275. <https://doi.org/10.1007/BF02843827>

Abstract

Research on Protoplast Isolation from Seaweed *Ulva lactuca* in Vietnam

Protoplast technology is a crucial approach in plant and seaweed biotechnology, enabling the mass production of clean and uniform seed stocks for aquaculture. The isolation of protoplasts is a key factor in the success of this technology. This paper focused on investigating the effects of several key factors in protoplast isolation from the seaweed *U. lactuca*, such as sterilization method, enzyme types, enzyme concentrations, and enzyme processing time used to cell wall degradation. The results showed that 0.5% sodium hypochlorite (NaOCl) provided the best sterilization efficiency, with a survival sample rate of 90% and an axenic sample rate of 80%. Seven enzymes were evaluated, including cellulase Onozuka R-10, cellulase (Merck-Sigma), driselase (Merck-Sigma), hemicellulase (Merck-Sigma), pectinase (Novozyme), cellulast (Novozyme), and Viscozyme (Novozyme). The results showed significant differences in cell wall degradation efficiency of seven enzymes. Cellulase Onozuka R-10 yielded the highest isolation efficiency, reaching 3.68×10^6 protoplasts/g fresh weight. The concentration and treatment duration of enzymes also significantly affected protoplast efficiency and showed a positive correlation within a certain threshold. The most suitable enzyme concentration was 2% with a treatment duration of 2 hours. These findings contribute to improving the scientific basis for seaweed seed production using protoplast technology.

Keywords: cellulase enzyme; isolation; protoplast; sterilization; *Ulva lactuca*