

NÂNG CAO SỰ TÍCH LŨY ASTAXANTHIN Ở VI TẢO *Haematococcus pluvialis* BỞI CÁC ĐIỀU KIỆN STRESS CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

Trịnh Ngọc Nam^{1,*}, Trương Ngọc Bảo Trân², Huỳnh Thị Hiếu¹,
Nguyễn Thị Duy Hiền¹, Trần Thị Bích Liên¹

¹Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM

²Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP. HCM

*Email: trinhngocnam@iuh.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/10/2017; Ngày chấp nhận đăng: 05/12/2017

TÓM TẮT

Vi tảo đơn bào *Haematococcus pluvialis* là một trong những vi tảo có tiềm năng trong sản xuất astaxanthin, một loại ketocarotenoid, được sử dụng rộng rãi như một chất kháng oxy hoá trong thực phẩm, dược phẩm và chất tạo màu tự nhiên trong nuôi trồng thủy sản. Sự tích lũy astaxanthin trong tế bào *H. pluvialis* thường xảy ra trong điều kiện stress. Trong nghiên cứu này, môi trường phù hợp cho sự sinh trưởng và các yếu tố ảnh hưởng đến sự tích tụ astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* được xác định. So sánh giữa các môi trường khảo sát gồm Bold's Basal, OHM (optimal *Haematococcus* medium), RM (Rudic's medium), f/2 Guillard và Walne, kết quả cho thấy trên môi trường RM, sự sinh trưởng của tảo thuận lợi nhất. Mật độ cực đại đạt được sau 18 ngày nuôi cấy ở mức $6,97 \times 10^5$ tế bào/mL. Sự thiếu hụt nguồn dinh dưỡng nitơ do sự loại bỏ hoàn toàn hoặc một nửa lượng nitrate trong môi trường nuôi cấy đã cảm ứng sự sản sinh astaxanthin trong tế bào tảo. Điều kiện cường độ chiếu sáng mạnh (4 klux và 8 klux) và nồng độ CO₂ cao cũng đã kích thích sự tích lũy astaxanthin. Sử dụng phương pháp sắc ký bản mỏng (thin-layer chromatography - TLC) và phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC) đã xác nhận sự hiện diện của astaxanthin trong dịch chiết tế bào tảo *H. pluvialis*. Ngoài ra, trong nghiên cứu này, astaxanthin trong sinh khối ướt của tảo đã được tách chiết bằng dung môi an toàn dimethyl ether định hướng ứng dụng cho thực phẩm.

Từ khóa: Astaxanthin, bioreactor, dimethyl ether, sắc ký lỏng hiệu năng cao, vi tảo *Haematococcus pluvialis*

1. MỞ ĐẦU

Vi tảo nước ngọt *Haematococcus pluvialis* được đánh giá là đối tượng tiềm năng cho sản xuất astaxanthin. Nghiên cứu sản xuất astaxanthin từ *H. pluvialis* được đặc biệt quan tâm do hàm lượng astaxanthin tích lũy trong sinh khối cao [1]. Tuy nhiên, việc sản xuất astaxanthin hiệu quả từ loài vi tảo này còn gặp nhiều khó khăn bởi vì chúng có tốc độ sinh trưởng thấp, chu kỳ sống phức tạp và nhạy cảm với sự thay đổi của điều kiện nuôi cấy. Hầu hết tế bào vi tảo đều duy trì ở trạng thái sinh dưỡng, tích lũy rất ít hoặc không tích lũy astaxanthin khi nuôi ở điều kiện thích hợp. Tuy nhiên, dưới điều kiện stress, tế bào chuyển sang dạng bào nang không chuyển động và khi được kích thích phù hợp, tế bào tảo có thể tích lũy một lượng lớn astaxanthin [2, 3]. Vì vậy, điều kiện cho tế bào sinh trưởng và tổng hợp astaxanthin là rất khác nhau.

Astaxanthin sử dụng hiện nay được thu nhận từ các nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên, bao gồm các loại thủy sản (vỏ tôm, cá hồi), nấm men đỏ, vi tảo, hoặc từ tổng hợp hoá học. Mặc dù chiếm tỉ lệ lớn, astaxanthin tổng hợp hoá học gần đây bị hạn chế sử dụng trong các sản phẩm thực phẩm và thuốc do hoạt tính sinh học và tính an toàn thấp [4]. Trong các nguyên liệu tự nhiên, astaxanthin có thể tồn tại ở nhiều dạng, gồm 3S-3'S, 3R-3'S và 3R-3'R, trong đó chỉ dạng đầu tiên là có hoạt tính sinh học. Ở vi tảo *H. pluvialis*, hàm lượng astaxanthin có thể chiếm 2 - 3% trọng lượng khô, gấp 5000 lần so với trong cá hồi, gấp 20 - 50 lần trong nấm men đỏ, và chủ yếu tồn tại ở dạng 3S-3'S [5]. Astaxanthin chiết xuất từ tảo được sử dụng rộng rãi như một phụ gia bổ sung vào dược phẩm, thực phẩm cho người hoặc thức ăn chăn nuôi [3]. Tại Việt Nam, astaxanthin được nhập khẩu để điều chế thành các viên nang thực phẩm chức năng, các loại mỹ phẩm cao cấp chăm sóc bảo vệ da, chống lão hoá hoặc làm phụ gia thực phẩm và bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Một số nghiên cứu về nuôi trồng vi tảo có khả năng tổng hợp astaxanthin đã được tiến hành ở Việt Nam nhưng chỉ mới dừng lại ở mức khảo sát vòng đời của vi tảo, ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sự tổng hợp astaxanthin [6-9] mà chưa có nghiên cứu đầy đủ về các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, tích lũy astaxanthin và cũng chưa có những đề xuất về quy trình tách chiết astaxanthin từ sinh khối vi tảo phục vụ cho nhu cầu sản xuất.

Quá trình tách chiết astaxanthin từ sinh khối vi tảo có chất lượng phù hợp cho mục đích làm phụ gia thực phẩm gặp nhiều khó khăn vì tế bào vi tảo có vách polysaccharide dày, khó phá vỡ và astaxanthin là hợp chất màu không tan trong nước. Nhiều phương pháp tách chiết đã được áp dụng để thu được astaxanthin dùng cho nhiều mục đích khác nhau. Năm 1992, Kobayashi *et al.* tiến xử lý tế bào vi tảo *H. pluvialis* với acetone 40% (v/v) trong thời gian 2 phút ở 80 °C và sau đó thủy giải bằng enzyme đã thu được astaxanthin với hiệu suất 70% [10]. Năm 2008, Kang và Sim tách chiết astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* bằng dầu thực vật và thu được astaxanthin với hiệu suất 88% [11]. Năm 2014, Dong *et al.* đã áp dụng 4 phương pháp tách chiết khác nhau, gồm kết hợp HCl và acetone, hỗn hợp hexan:isopropanol có tỉ lệ 4:6, tách chiết lần lượt bằng methanol sau đó đến acetone, và tách chiết bằng dầu thực vật [12]. Kết quả cho thấy việc kết hợp HCl và acetone cho hiệu suất tách chiết cao nhất. Năm 2006, Machmudah *et al.* tách chiết astaxanthin dùng CO₂ siêu tới hạn kết hợp với bổ sung ethanol giúp thu được astaxanthin với hiệu suất 80,6% [13]. Tại Việt Nam chưa có nhiều các nghiên cứu về việc tách chiết astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* cho mục đích thương mại, ngoại trừ một vài nghiên cứu năm 2010 của tác giả Đặng Diễm Hồng và ctv, năm 2011 của Đinh Đức Hoàng và ctv, năm 2013 Lê Thị Thơm và ctv sử dụng dung môi để tách chiết, định lượng astaxanthin trong quá trình nghiên cứu về sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* [6, 8, 9].

Trong nghiên cứu này, một số yếu tố môi trường ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* nuôi cấy mẻ và trong hệ thống bioreactor cũng như sự tích lũy astaxanthin được khảo sát. Ngoài ra, nghiên cứu cũng xác định điều kiện tách chiết astaxanthin từ tế bào vi tảo phù hợp cho mục tiêu ứng dụng làm phụ gia thực phẩm.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chủng tảo nước ngọt *Haematococcus pluvialis* sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2 (Tp. Hồ Chí Minh). Chủng tảo được nuôi cấy tăng sinh trong các bình tam giác 500 mL chứa 200 mL môi trường Bold's Basal tại nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ ánh sáng 2 klux với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, sục khí liên tục với lưu lượng 1,8 lít/phút bằng máy thổi khí AirMac DB8 (AirMac, Đài Loan). Sinh khối vi tảo được xác định mật độ tế bào và được sử dụng cho tất cả các nghiên cứu nuôi cấy.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát môi trường nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis*

Các môi trường Bold's Basal, OHM (optimal *Haematococcus* medium), RM (Rudic's medium), f/2 Guillard và Walne được sử dụng trong điều kiện nuôi cấy mẻ trong các bình tam giác 500 mL chứa 250 mL môi trường. Các môi trường nuôi được bổ sung 10 mL dịch tăng sinh vi tảo có mật độ 5×10^6 tế bào/mL. Bình nuôi cấy được đặt trong điều kiện cường độ chiếu sáng 2 klux, chu kỳ chiếu sáng 16 giờ sáng:8 giờ tối, nhiệt độ $25 \pm 0,5$ °C, tốc độ sục khí 5 lít/phút. Sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* trên các môi trường được xác định dựa vào phương pháp đo mật độ quang học OD tại bước sóng 680 nm và phương pháp đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm vi sinh vật, sau mỗi 2 ngày cho đến khi mật độ tảo không tiếp tục tăng trong môi trường nuôi cấy. Tế bào vi tảo được quan sát dưới kính hiển vi Olympus BX35 (Olympus, Nhật Bản) và ảnh được chụp qua hệ thống camera kính hiển vi Olympus DP73. Sinh khối vi tảo tích lũy được xác định tại cuối mẻ nuôi bằng cách lọc và cân sinh khối sau 3 giờ sấy khô ở 80 °C. Dựa vào đường cong sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* và khối lượng khô tế bào xác định môi trường phù hợp nhất trong các môi trường thử nghiệm cho sự sinh trưởng gia tăng sinh khối vi tảo.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng và hàm lượng nitrate môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis*

Vi tảo *H. pluvialis* được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy mẻ trong các bình tam giác 500 mL chứa 250 mL môi trường. Mật độ tế bào được bổ sung vào trong dịch môi trường nuôi cấy ban đầu ở mức 5×10^6 tế bào/mL. Bình nuôi cấy được duy trì trong điều kiện nhiệt độ 25 °C, cường độ chiếu sáng duy trì 2 klux với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ sáng:8 giờ tối. Đối với nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng, sau 14 ngày nuôi cấy, các bình môi trường nuôi cấy được chuyển sang môi trường có cường độ chiếu sáng 4 klux và 8 klux ánh sáng trắng, thời gian chiếu sáng được duy trì 16 giờ sáng:8 giờ tối. Đối với nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitrate, sau 14 ngày nuôi cấy, sinh khối vi tảo được thu nhận và chuyển sang nuôi cấy trong môi trường được loại bỏ 50% hoặc 100% nguồn nitrate so với môi trường ban đầu. Áp suất thẩm thấu của môi trường được duy trì bằng việc dùng KCl thay cho các nguồn dinh dưỡng chứa nitrate [14]. Nghiệm thức đối chứng là môi trường nuôi cấy giống như ban đầu. Sự sinh trưởng của vi tảo được xác định bằng phương pháp đo OD₆₈₀ sau mỗi 2 ngày nuôi cấy trong suốt mẻ nuôi 24 ngày. Kết thúc thời gian nuôi cấy, sinh khối vi tảo từ 10 mL dịch nuôi được thu nhận bằng cách ly tâm 5 phút ở 6440 g (rcf). Sinh khối vi tảo được ủ với 1,5 mL dung dịch DMSO ở 75 °C trong 15 phút. Sau thời gian ủ, tế bào và dung dịch được phân tách bằng ly tâm. Cặn tế bào được tiếp tục tách chiết lặp lại với DMSO. Hàm lượng astaxanthin trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp đo OD tại bước sóng 480 nm [15]. Dựa vào kết quả thu được, xác định điều kiện chiếu sáng và nồng độ nitrate trong môi trường nuôi cấy phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo.

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ sục khí CO₂ đến sự tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* trong hệ thống bioreactor

Vi tảo *H. pluvialis* được nuôi cấy trong bình nuôi cấy có thể tích 9 lít của hệ thống bioreactor (Fermentec, Hàn Quốc) chứa 5 lít môi trường dinh dưỡng với mật độ ban đầu 5×10^6 tế bào/mL. Các điều kiện nhiệt độ, chế độ chiếu sáng được duy trì ở mức phù hợp nhất. Môi trường nuôi được khuấy đảo với tốc độ 120 vòng/phút. Các nghiệm thức thử nghiệm ảnh hưởng của tốc độ sục khí CO₂ đến sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* trong hệ thống bioreactor bao gồm: chỉ sục không khí, sục không khí kết hợp sục khí CO₂ với lượng 20 mL

CO₂/phút, 40 mL CO₂/phút, 60 mL CO₂/phút. Các điều kiện nhiệt độ, chế độ chiếu sáng được duy trì ở mức phù hợp nhất. Sự sinh trưởng của vi tảo trong ở các nghiệm thức nuôi cấy khác nhau được xác định bằng phương pháp đo OD sau mỗi 2 ngày nuôi cấy. Kết thúc mẻ nuôi 10 ngày, toàn bộ sinh khối tảo được thu nhận, sấy khô ở nhiệt độ 40 °C trong 48 giờ. Dựa vào kết quả gia tăng mật độ và sinh khối khô, xác định nghiệm thức sục khí CO₂ phù hợp nhất cho sự sinh trưởng của vi tảo trong hệ thống bioreactor. Ngoài ra, sự tích lũy astaxanthin trong tế bào vi tảo *H. pluvialis* ở các nghiệm thức nghiên cứu được xác định như mô tả kể trên.

2.2.4. Tách chiết astaxanthin từ sinh khối vi tảo

Lipid chứa astaxanthin trong tế bào vi tảo sẽ được tách chiết theo phương pháp chiết ướt sử dụng dung môi hữu cơ không độc hại dimethyl ether (DME) lỏng. Sinh khối vi tảo thu nhận từ hệ thống bioreactor được lọc bằng giấy lọc GF/C. Sinh khối vi tảo có độ ẩm 82 - 90% được sử dụng để tách chiết astaxanthin. Phương pháp tách chiết bằng DME được thực hiện theo hướng dẫn trong nghiên cứu năm 2014 của Boonnoun *et al.* [16]. Sinh khối ướt của vi tảo được đặt vào giữa cột tách chiết, bên trên và bên dưới được phủ bởi lớp hạt thủy tinh có kích thước 0,77 - 0,99 mm. Dòng DME được bơm qua cột với tốc độ 10 cm³/phút ở nhiệt độ 20 °C và áp suất tách chiết trong cột được duy trì 0,52 MPa. Sau khi qua cột, DME được cho bay hơi, lipid chứa astaxanthin được thu hồi. Hiệu suất tách chiết lipid được xác định sau khi sản phẩm tách chiết được sấy loại nước ở 40 °C. Hiệu suất tách chiết astaxanthin bằng dung môi dimethyl ether lỏng được so sánh với phương pháp tách chiết astaxanthin phổ biến dùng acetone.

2.2.5. Phân tích astaxanthin thu nhận từ sinh khối vi tảo *H. pluvialis* nuôi cấy trong hệ thống bioreactor bằng phương pháp sắc ký bản mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao

Astaxanthin có trong lipid thu nhận từ sinh khối vi tảo được định lượng bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Với phương pháp TLC, astaxanthin được chấm lên bản sắc ký Merck TLC Plate. Dung môi triển khai là hexan:chloroform:benzene theo tỉ lệ 10:20:1 (v:v:v). Astaxanthin trong các mẫu được xác định thông qua sự so sánh R_f với astaxanthin chuẩn. Phương pháp HPLC được thực hiện trong thiết bị HPLC với cột 150 × 4,5 mm ProntoSIL RP C-18 (Knauer, Berlin, Đức) duy trì ở nhiệt độ 25 °C và detector Waters e2695 DAD (Waters, Milford, MD, USA). Pha động là hỗn hợp acetonitrile:nước:ethyl acetate với tỉ lệ 98:2:0 (trong 2 phút), 40:0:60 (trong 10 phút), 0:0:100 (trong 2 phút) (% thể tích). Tốc độ dòng 1 mL/phút và thể tích tiêm 20 µL. Bước sóng phát hiện ở 480 nm. Sự hiện diện và hàm lượng astaxanthin được xác định bởi sự so sánh peak và diện tích peak với astaxanthin chuẩn.

2.2.6. Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu được tiến hành 3 lần lặp lại. Số liệu thu nhận được từ các thí nghiệm được xử lý bằng công cụ Microsoft Excel 2013. Kết quả trình bày là trung bình cộng của các lần lặp lại và độ lệch chuẩn (SD). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các kết quả của các nghiệm thức thí nghiệm được xác định bằng phân tích ANOVA trên phần mềm SPSS 20.

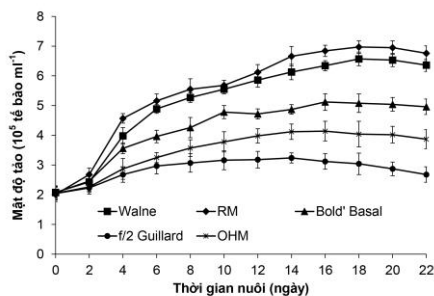
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát môi trường nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis*

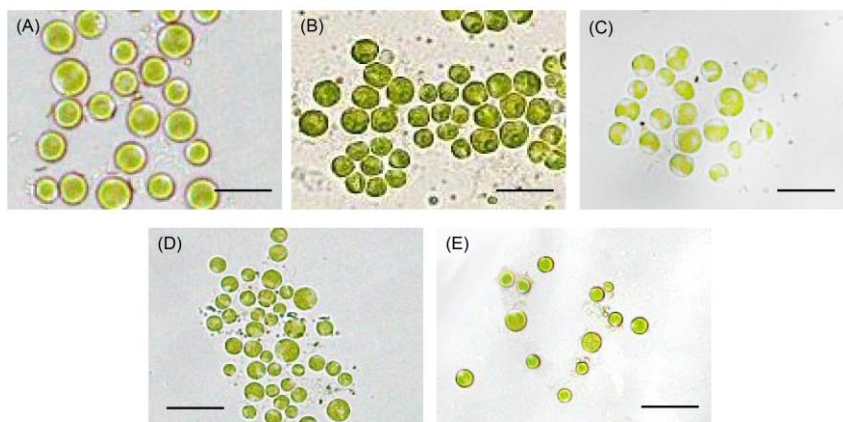
Mật độ tảo bổ sung vào các môi trường nuôi ban đầu đạt 2 x 10⁵ tế bào/mL. Đường cong sinh trưởng của vi tảo trên các môi trường nuôi cấy được thể hiện qua Hình 1. Trong các môi trường thử nghiệm, ở môi trường RM và Walne, vi tảo *H. pluvialis* đạt hiệu quả tăng

trường cao hơn so với các môi trường Bold's Basal, OHM và f/2 Guillard. Trên hai môi trường RM và Walne, mật độ tảo tăng nhanh trong 8 ngày đầu của mẻ nuôi cấy. Sự sinh trưởng tiếp tục duy trì và đạt cực đại ở ngày thứ 18, mật độ lần lượt là $6,97 \times 10^5$ tế bào/mL ở môi trường RM và $6,57 \times 10^5$ tế bào/mL ở môi trường Walne. Sự sinh trưởng của tảo ở hai môi trường này giảm dần sau ngày thứ 20. Ở môi trường Bold's Basal và OHM, tảo tăng chậm và duy trì sự sinh trưởng cho đến ngày thứ 16 và đạt mật độ tương ứng là $5,12 \times 10^5$ và $4,14 \times 10^5$ tế bào/mL. Sự sinh trưởng của tảo thấp nhất trên môi trường f/2 Guillard. Mật độ tảo tăng chậm và sự sinh trưởng chỉ duy trì đến ngày thứ 14 của mẻ nuôi. Nghiên cứu năm 2007 của Imamoglu *et al.* đối với sự sinh trưởng của *H. pluviialis* trên các môi trường RM, BG11, OHM và Bold's Basal cũng như nghiên cứu năm 2010 của Đặng Diễm Hồng và ctv trên các môi trường RM, OHM, C và BG11 đều cho thấy sự sinh trưởng tốt nhất xảy ra trên môi trường RM. Mật độ tế bào *H. pluviialis* đạt từ $3,8 \times 10^5$ đến $9,5 \times 10^5$ tế bào/mL [6, 17].

Có sự khác biệt về kích thước của tế bào vi tảo trên các môi trường nuôi cấy (Hình 2). Trên môi trường RM và môi trường Walne, tế bào tảo có kích thước lớn, đạt trung bình lần lượt là $27,6 \pm 2,7 \mu\text{m}$ và $25,4 \pm 3,5 \mu\text{m}$. Trên môi trường Bold's Basal, tế bào tảo cũng có kích thước khá lớn, đạt trung bình $21,8 \mu\text{m}$, tuy nhiên nội chất của tế bào vi tảo trên môi trường này ít đậm đặc hơn so với môi trường RM và Walne, thể hiện thông qua khối lượng khô của sinh khối vi tảo tích lũy thấp hơn sau 22 ngày nuôi cấy (Bảng 1). Ở môi trường OHM và f/2 Guillard, kích thước tế bào tảo nhỏ, trung bình lần lượt là $16,3 \pm 2,2 \mu\text{m}$ và $15,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$. Cũng trên hai môi trường này, qua các thế hệ, kích thước tế bào tảo có xu hướng giảm dần. Như vậy, trong các môi trường khảo sát, môi trường RM được đánh giá là phù hợp cho sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluviialis* so với các môi trường nuôi cấy khác.



Hình 1. Sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluviialis* trên các môi trường nuôi cấy



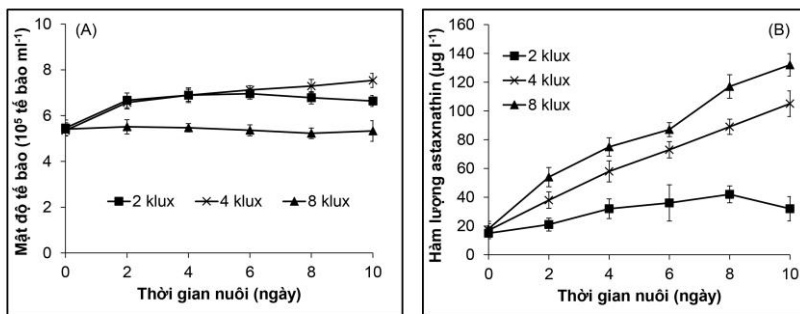
Hình 2. Tế bào vi tảo *H. pluviialis* trên các môi trường nuôi cấy tại ngày thứ 8 của mẻ nuôi. (A) môi trường RM, (B) môi trường Walne, (C) môi trường Bold's Basal, (D) môi trường OHM, (E) môi trường f/2 Guillard. Thanh ngang 50 μm

Bảng 1. Sinh khối tích lũy của vi tảo *H. pluvialis* sau 22 ngày nuôi trên các môi trường khác nhau

Môi trường nuôi cấy	Sinh khối vi tảo (g khối lượng khô/lít)
Walne	0,83 ± 0,14
RM	0,92 ± 0,11
Bold's Basal	0,31 ± 0,08
OHM	0,25 ± 0,09
f/2 Guillard	0,22 ± 0,08

3.2. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin

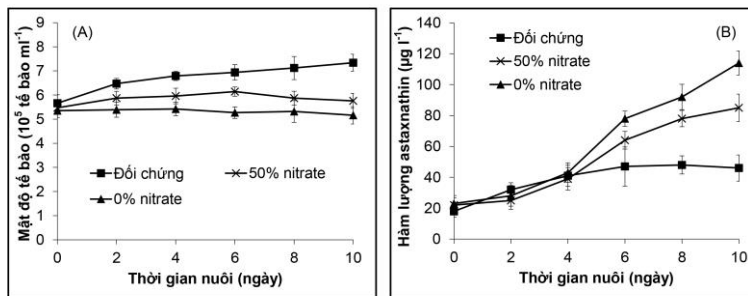
Dưới các chế độ chiếu sáng khác nhau, có sự khác biệt về sinh trưởng và tích lũy astaxanthin ở tế bào vi tảo *H. pluvialis* (Hình 3). Tảo tiếp tục tăng trưởng bởi sự gia tăng của số lượng tế bào khi được đặt ở cường độ chiếu sáng 4 klux. Tuy nhiên, ở cường độ ánh sáng 8 klux, sự sinh trưởng của tảo hầu như không đáng kể (Hình 3A). Ở cả hai chế độ chiếu sáng 4 klux và 8 klux đều cho thấy có sự gia tăng rõ rệt hàm lượng astaxanthin tích lũy trong tế bào tảo so với chế độ chiếu sáng 2 klux (Hình 3B). Trong đó, hàm lượng astaxanthin tích lũy cao nhất ở cường độ ánh sáng 8 klux đạt $132 \pm 7,8 \mu\text{g/lít}$ sau 10 ngày nuôi cấy. Hàm lượng này đạt $105 \pm 8,9 \mu\text{g/lít}$ ở cường độ ánh sáng 4 klux. Ở cường độ 2 klux, có sự gia tăng nhẹ hàm lượng astaxanthin, tuy nhiên, hàm lượng này suy giảm dần khi thời gian nuôi cấy kéo dài. Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy ánh sáng cảm ứng sự tích lũy astaxanthin trong tế bào vi tảo *H. pluvialis* [18, 19]. Nghiên cứu năm 2013 của Đặng Diễm Hồng và ctv cho thấy khi được nuôi ở cường độ ánh sáng 4,3 klux, sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin ở tảo *H. pluvialis* tăng rõ rệt so với điều kiện đối chứng tại 2,5 klux [7]. Ánh sáng cường độ mạnh cung cấp nhiều năng lượng cho tế bào tảo bởi sự gia tăng hấp thu ánh sáng tại vùng ánh sáng xanh dương [15]. Tuy nhiên, cường độ ánh sáng quá cao có thể ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tảo *H. pluvialis*. Nghiên cứu năm 2016 của Đặng Hoàng Phú và ctv xác định sự sinh trưởng của *H. pluvialis* giảm tại cường độ chiếu sáng 5 klux mặc dù hàm lượng astaxanthin tích lũy gia tăng [20]. Kết quả trong nghiên cứu hiện tại cũng cho thấy, cường độ ánh sáng mạnh, tại 4 klux và 8 klux giúp gia tăng sự tích lũy astaxanthin, tuy nhiên cường độ quá mạnh, tại 8 klux, có thể kìm hãm sự sinh trưởng của tế bào vi tảo.



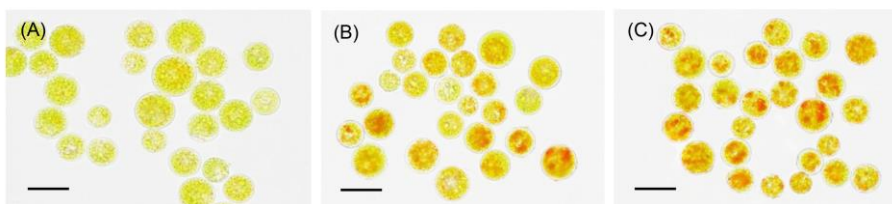
Hình 3. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sự sinh trưởng (A) và tích lũy astaxanthin (B) ở vi tảo *H. pluvialis*

3.3. Ảnh hưởng của sự thiếu hụt nguồn nitrate đến sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis*

Sự tích lũy astaxanthin ở vi tảo *H. pluvialis* thường xảy ra mạnh mẽ ở giai đoạn bào nang khi tế bào chịu các tác động bất lợi của điều kiện môi trường nuôi cấy [7]. Trong nghiên cứu này, sự thiếu hụt nguồn dinh dưỡng nitrate được khảo sát để cảm ứng sự tích lũy astaxanthin trong tế bào vi tảo *H. pluvialis*. Sự giảm một nửa hoặc loại bỏ hoàn toàn nguồn nitrate trong môi trường làm giảm sự sinh trưởng của vi tảo so với môi trường đối chứng (Hình 4A). Mật độ vi tảo hầu như không tăng khi nguồn nitrate được loại bỏ. Tuy nhiên, ngược với sự sinh trưởng, sự thiếu hụt nitrate đã làm gia tăng đáng kể lượng astaxanthin sản sinh. Sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường có nguồn nitrate giảm 50% hoặc không có nitrate, hàm lượng astaxanthin thu nhận được lần lượt là $85 \pm 7,9 \mu\text{g/lit}$ và $114 \pm 6,8 \mu\text{g/lit}$, cao gấp 2 và 2,5 lần so với môi trường đối chứng có đầy đủ nguồn dinh dưỡng nitrate (Hình 4B và Hình 5). Sự tích lũy astaxanthin tăng nhanh từ sau ngày thứ 4 trên môi trường có nguồn nitrate thay đổi. Theo nghiên cứu năm 2012 của Đặng Diễm Hồng và ctv, và năm 2013 của Lê Thị Thơm và ctv, sự gia tăng hàm lượng nguồn dinh dưỡng nitrate trong môi trường nuôi cấy có hiệu quả làm gia tăng đáng kể sự tích lũy astaxanthin trong tế bào tảo *H. pluvialis* [7, 9]. Một số nghiên cứu khác của Solovchenko *et al.* năm 2010 và Zhekisheva *et al.* năm 2002, cho thấy, sự thiếu hụt nguồn dinh dưỡng nitrate trong môi trường nuôi đã cảm ứng mạnh mẽ sự tích lũy astaxanthin ở tảo *H. pluvialis* [15, 19]. Như vậy, cả sự dư thừa hoặc thiếu hụt nitrate đều có tác dụng cảm ứng tích lũy astaxanthin ở tảo. Trong nghiên cứu hiện tại, sự giảm một nửa hoặc loại bỏ hoàn toàn nguồn nitrate mặc dù ảnh hưởng đến sự sinh trưởng nhưng có hiệu quả làm gia tăng sự tích lũy của astaxanthin.



Hình 4. Ảnh hưởng của sự thiếu hụt nitrate đến sự sinh trưởng (A) và tích lũy astaxanthin (B) ở vi tảo *H. pluvialis*

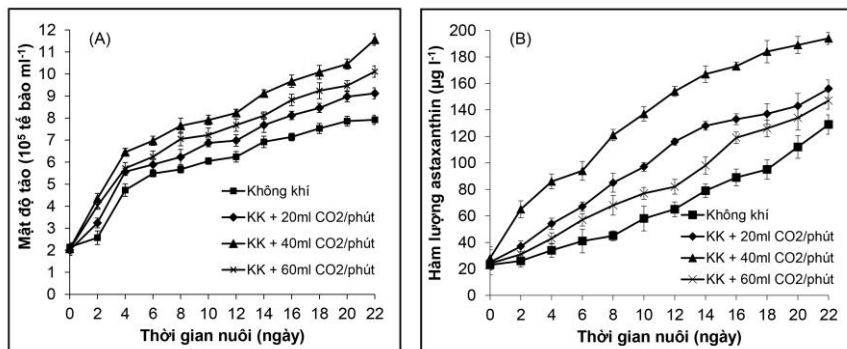


Hình 5. Sự tích lũy astaxanthin trong tế bào vi tảo *H. pluvialis* ở các môi trường có nồng độ nitrate khác nhau tại thời điểm ngày nuôi cấy thứ 6 (A) Môi trường đối chứng có đầy đủ nguồn dinh dưỡng nitrate, (B) môi trường giảm 50% lượng nitrate, (C) môi trường loại bỏ hoàn toàn nitrate. Thanh ngang 20 μm

3.4. Ảnh hưởng của CO₂ đến sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin ở vi tảo *H. pluvialis* trong hệ thống bioreactor

Sử dụng CO₂ nồng độ cao như một nguồn carbon để nuôi cấy tảo *H. pluvialis* đã được thực hiện trong nhiều nghiên cứu [21]. CO₂ thúc đẩy sự sinh trưởng do cảm ứng gia tăng phản ứng quang hợp tổng hợp các chất hữu cơ của tế bào vi tảo. Trong nghiên cứu này, với sự bổ sung 20 mL và 40 mL CO₂/phút vào thành phần không khí cung cấp cho vi tảo trong hệ thống bioreactor đã giúp gia tăng nhanh mật độ tế bào so với đối chứng chỉ duy nhất nguồn không khí tự nhiên (Hình 6A). Tuy nhiên, sự sinh trưởng có khuynh hướng giảm khi nồng độ CO₂ bổ sung vào không khí ở mức 60 mL/phút. Năm 2016, nghiên cứu của Cheng *et al.* cho thấy, sự gia tăng quá mức nồng độ CO₂ cung cấp vào môi trường nuôi vi tảo *H. pluvialis* có thể gây độc cho quá trình quang hợp của tế bào [22]. Ngoài ra, nồng độ quá cao của CO₂ có thể làm giảm sự sinh tổng hợp các hợp chất hữu cơ carbon và làm tế bào tiêu tốn nhiều ATP để duy trì độ pH dịch nội bào.

Hiệu quả gia tăng sự tích lũy của astaxanthin trong tế bào vi tảo *H. pluvialis* cũng được nhận thấy khi tăng lượng CO₂ bổ sung vào không khí cung cấp cho hệ thống bioreactor. Tuy nhiên, ở mức 60 mL CO₂/phút, hàm lượng astaxanthin tích lũy giảm. Tại cuối mẻ nuôi cấy 22 ngày, hàm lượng astaxanthin thu nhận được lần lượt là 156 ± 6,7 µg/lít và 194 ± 4,5 µg/lít tương ứng với sự bổ sung 20 và 40 mL CO₂/phút vào hệ thống nuôi cấy (Hình 6B). Kết quả nghiên cứu năm 2015 của Chen *et al.* cho rằng có sự tương quan giữa quá trình tổng hợp lipid và tích lũy astaxanthin [23]. Do đó, ở nồng độ CO₂ cao, quá trình sinh tổng hợp lipid bị ức chế dẫn đến hệ quả là sự tích lũy astaxanthin cũng giảm sút.



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ CO₂ đến sự sinh trưởng (A) và tích lũy astaxanthin (B) trong tế bào *H. pluvialis* nuôi cấy trong hệ thống bioreactor

3.5. Thu nhận astaxanthin từ sinh khối vi tảo *H. pluvialis*

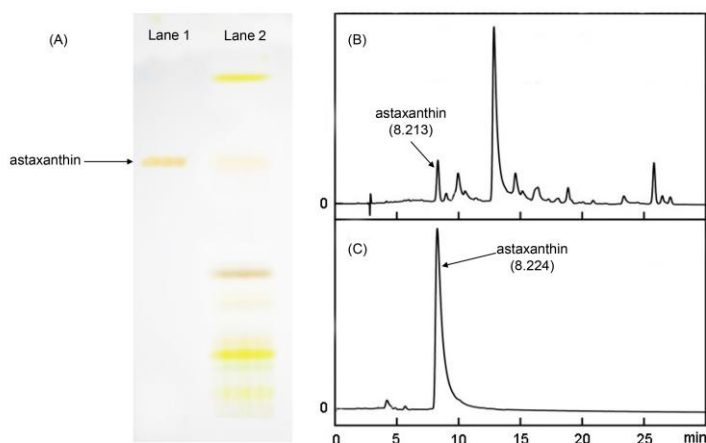
Astaxanthin tích lũy trong sinh khối vi tảo *H. pluvialis* nuôi cấy trên hệ thống bioreactor được tách chiết theo phương pháp tách chiết ướn sử dụng dung môi dimethyl ether với định hướng sử dụng cho lĩnh vực thực phẩm. Dịch tách chiết được phân tích bằng sắc ký bản mỏng để xác định sự hiện diện của astaxanthin (Hình 7A) và HPLC để xác định hàm lượng astaxanthin (Hình 7B và 7C). Sắc ký đồ HPLC cho thấy thời gian lưu của astaxanthin tách chiết từ vi tảo *H. pluvialis* là 8,213 phút gần tương đương với thời gian lưu 8,224 phút của astaxanthin chuẩn. Tương tự, với sắc ký bản mỏng (TLC), giá trị R_f (Relative to front) của astaxanthin tách chiết từ vi tảo tương đương với R_f của astaxanthin chuẩn là 0,624. Kết quả tách chiết được trình bày trong Bảng 2. Acetone được sử dụng như một dung môi tiêu biểu để tách chiết astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* [24]. Tuy nhiên, acetone có tính độc, việc sử dụng sản phẩm tách chiết bằng acetone có thể gây mất an toàn [16]. Trong nghiên cứu

này, một loại dung môi an toàn, dimethyl ether được sử dụng để tách chiết lipid chứa astaxanthin từ tảo. Với 1 g sinh khối ướt của vi tảo, lượng lipid thu nhận được khi tách chiết bằng DME đạt $0,32 \pm 0,04$ g/g tảo và đạt $0,41 \pm 0,09$ g/g tảo với dung môi acetone. Phân tích HPLC cho thấy hàm lượng astaxanthin trong lipid tách chiết bằng acetone cao hơn so với tách chiết bằng DME. Tuy nhiên, với tính an toàn cao hơn, đồng thời áp dụng được cho sinh khối ướt của vi tảo, DME có thể thay thế acetone áp dụng để tách chiết astaxanthin từ vi tảo.

Bảng 2. So sánh hiệu suất tách chiết astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* bằng dung môi dimethyl ether và acetone

	Dung môi dimethyl ether	Dung môi acetone
Khối lượng sinh khối tảo ướt (g)	1	1
Hàm lượng lipid tách chiết* (g)	$0,32 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,09$
Hàm lượng astaxanthin* (mg)	$3,74 \pm 0,87$	$5,32 \pm 1,12$
Tỉ lệ astaxanthin/lipid tách chiết (%)	1,17	1,30

* sự khác biệt giữa hàm lượng lipid và astaxanthin tách chiết giữa hai mẫu có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.



Hình 7. Sắc ký bản mỏng TLC và sắc ký đồ HPLC xác định và định lượng astaxanthin. (A) Bản sắc ký bản mỏng với lane 1 là astaxanthin chuẩn, lane 2 là mẫu dịch chiết từ tế bào tảo, (B) Mẫu dịch chiết vi tảo *H. pluvialis*, (C) Mẫu astaxanthin chuẩn

4. KẾT LUẬN

Astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* có vai trò rất quan trọng trong y dược học và thực phẩm. Sự sinh tổng hợp và tích lũy astaxanthin trong tế bào tảo chịu ảnh hưởng sâu sắc bởi nhiều các yếu tố môi trường. Nghiên cứu hiện tại xác định môi trường RM là phù hợp cho sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis*. Ánh sáng có cường độ lớn hơn 4 klux cảm ứng mạnh sự tích lũy astaxanthin. Sự tổng hợp astaxanthin ở tảo cũng được thúc đẩy bởi sự loại bỏ hoặc giảm lượng nitrate trong môi trường. Sự tăng cường nồng độ khí CO₂ trong môi trường nuôi cấy cũng có hiệu quả tương tự làm gia tăng astaxanthin trong tế bào tảo. Sử dụng dung môi an toàn DME có thể được áp dụng để tách chiết astaxanthin từ sinh khối ướt của vi tảo *H. pluvialis* thay thế cho dung môi acetone.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ về kinh phí theo chương trình nghiên cứu cấp cơ sở của Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh năm 2016.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aflalo C., Meshulam Y., Zarka A., Boussiba S. - On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*, *Biotechnology and Bioengineering* **98** (1) (2007) 300-305.
2. Harker M., Tsavalos A. J., Young A. J. - Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*, *Bioresource Technology* **55** (3) (1996) 207-214.
3. Hata N., Ogbonna J. C., Hasegawa Y., Taroda H., Tanaka H. - Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture, *Journal of Applied Phycology* **13** (5) (2001) 395-402.
4. Seabra L. M. A. J., Pedrosa L. F. C. - Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição* **23** (2010) 1041-1050.
5. Bon J. A., Leathers T. D., Jayaswal R. K. - Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*, *Biotechnology Letters* **19** (2) (1997) 109-112.
6. Đặng Diễm Hồng, Đinh Đức Hoàng, Nguyễn Thị Thủy, Hoàng Thị Lan Anh - Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi trồng vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin, *Tạp chí Sinh học* **32** (2) (2010) 43-53.
7. Đặng Diễm Hồng, Đinh Thị Ngọc Mai, Bùi Đình Lâm, Lưu Thị Tâm, Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Thị Thơm, Đinh Đức Hoàng, Hoàng Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu - Ảnh hưởng kết hợp của nồng độ nitrate và chế độ chiếu sáng lên sinh trưởng của vi tảo *Haematococcus pluvialis*, *Tạp chí Sinh học* **34** (4) (2012) 493-499.
8. Đinh Đức Hoàng, Lưu Thị Tâm, Nguyễn Thị Thủy, Đặng Diễm Hồng - Nghiên cứu sự thay đổi hình thái tế bào, hàm lượng sắc tố và protein nội bào trong vòng đời của vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm, *Tạp chí Sinh học* **33** (1) (2011) 59-66.
9. Lê Thị Thơm, Lưu Thị Tâm, Đinh Thị Ngọc Mai, Hoàng Thị Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu, Nguyễn Cẩm Hà, Hồng Đ. D. - Ảnh hưởng của nồng độ nitrate lên sinh trưởng của vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* Flotow trong điều kiện phòng thí nghiệm, *Tạp chí Sinh học* **35** (2) (2013) 219-226.
10. Kobayashi M., Kakizono T., Yamaguchi K., Nishio N., Nagai S. - Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions, *Journal of Fermentation and Bioengineering* **74** (1) (1992) 17-20.
11. Kang C. D., Sim S. J. - Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils, *Biotechnology Letters* **30** (3) (2008) 441-444.
12. Dong S., Huang Y., Zhang R., Wang S., Liu Y. - Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*, *The Scientific World Journal* **2014** (2014) 7.
13. Machmudah S., Shotipruk A., Goto M., Sasaki M., Hirose T. - Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **45** (10) (2006) 3652-3657.
14. Grünewald K., Hagen C., Braune W. - Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*, *European Journal of Phycology* **32** (4) (1997) 387-392.
15. Solovchenko A., Merzlyak M. N., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S. - Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa*

- (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in $\delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light, *Journal of Phycology* **46** (4) (2010) 763-772.
16. Boonnoun P., Kurita Y., Yuichi Kamo, Wahyudiono, Siti Machmudah, Yuji Okita, Eiji Ohashi, Hideki Kanda, Motonobu Goto - Wet extraction of lipids and astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by liquefied dimethyl ether, *Journal of Nutrition & Food Sciences* **4** (5) (2014)
 17. Imamoglu E., Sukan F. V., Dalay M. C. - Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*, *International Journal of Natural & Engineering Sciences* **1** (3) (2007) 5-9.
 18. Sun Z., Cunningham F. X., Gantt E. - Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95** (19) (1998) 11482-11488.
 19. Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka A., Cohen Z. - Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters, *Journal of Phycology* **38** (2) (2002) 325-331.
 20. Đặng Hoàng Phú, Phạm Tú Anh, Bách N. Đ. - Nghiên cứu nhân sinh khối vi tảo *Haematococcus pluvialis* và các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp astaxanthin. Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ 2, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 2016, 1008-1013.
 21. Kang C. D., Han S. J., Choi S. P., Sim S. J. - Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **33** (1) (2009) 133.
 22. Cheng J., Li K., Yang Z., Zhou J., Cen K. - Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress, *Bioresource Technology* **204** (2016) 49-54.
 23. Chen G., Wang B., Han D., Sommerfeld M., Lu Y., Chen F., Hu Q. - Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae), *The Plant Journal* **81** (1) (2015) 95-107.
 24. Lababpour A., Lee C. G. - Simultaneous measurement of chlorophyll and astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cells by first-order derivative ultraviolet-visible spectrophotometry, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101** (2) (2006) 104-110.

ABSTRACT

ENHANCEMENT OF ASTAXANTHIN ACCUMULATION IN *Haematococcus pluvialis* UNDER STRESS CONDITIONS

Trinh Ngoc Nam^{1,*}, Truong Ngoc Bao Tran², Huynh Thi Hieu¹,
Nguyen Thi Duy Hien¹, Tran Thi Bich Lien¹

¹*Industrial University of Ho Chi Minh City*

²*Agricultural High-tech Park of Ho Chi Minh City*

*Email: trinhngocnam@iuh.edu.vn

The unicellular microalgae (*Haematococcus pluvialis*) is one of the potential organisms with ability to produce astaxanthin. Astaxanthin is a high value ketocarotenoid, which is widely used as antioxidant in food, pharmaceutical and natural colorant in aquaculture. *H. pluvialis* accumulates large amounts of astaxanthin under stress conditions. This study was conducted to determine the optimal medium for biomass production and factors that influenced the astaxanthin accumulation by *H. pluvialis*. Investigation of media including Bold's Basal, OHM (optimal *Haematococcus* medium), RM (Rudic medium), f/2 Guillard and Walne showed that *H. pluvialis* grew well in RM medium after 18 days. The maximum cell density of 6.97×10^5 cells/mL was achieved in RM medium. Nitrogen starvation by removing nitrate or reducing nitrate source in the culture medium induced astaxanthin production. Under high light conditions (4 klux and 8 klux) and high concentration of carbon dioxide, an increase in astaxanthin accumulation was observed. Analyses using thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) confirmed the presence of astaxanthin in *H. pluvialis* cell extract. Furthermore, liquefied dimethyl ether (DME) can be used to extract astaxanthin directly from *H. pluvialis* biomass with high moisture content.

Keywords: astaxanthin, bioreactor, dimethyl ether, high-performance liquid chromatography, microalgae *Haematococcus pluvialis*.