

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN SINH HỌC NHIỆT ĐỚI



TRẦN QUANG VINH

THU NHẬN ASTAXANTHIN TỪ VI TẢO *HAEMATOCOCCUS*
***PLUVIALIS* VÀ NẤM MEN *RHODOSPORIDIUM* SP., THỬ**
NGHIỆM MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC

LUẬN ÁN TIẾN SỸ: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN SINH HỌC NHIỆT ĐỚI

TRẦN QUANG VINH

**THU NHẬN ASTAXANTHIN TỪ VI TẢO *HAEMATOCOCCUS*
PLUVIALIS VÀ NẤM MEN *RHODOSPORIDIUM* SP., THỬ
NGHIỆM MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 9 42 02 01

LUẬN ÁN TIẾN SỸ: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS. TS. Ngô Đại Nghiệp
2. GS. TS. Hoàng Nghĩa Sơn

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

- Luận án này là công trình nghiên cứu khoa học của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Ngô Đại Nghiệp và GS. TS. Hoàng Nghĩa Sơn.
- Tất cả số liệu, dữ liệu, kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực và được công bố một phần trong các tạp chí chuyên ngành.
- Các trích dẫn và danh mục tài liệu tham khảo trong luận án có nguồn gốc xác thực.

TP. Hồ Chí Minh, ngày ... tháng ... năm 2023

Tác giả luận án



Trần Quang Vinh

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được thực hiện và hoàn thành tại Viện Sinh học nhiệt đới, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá suốt trình nghiên cứu, tôi đã nhận được nhiều sự hỗ trợ, giúp đỡ quý giá của các thầy cô, các nhà khoa học, đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS. TS. Ngô Đại Nghiệp và GS. TS. Hoàng Nghĩa Sơn đã quan tâm, hướng dẫn tôi tận tình và truyền đạt cho tôi những kinh nghiệm quý báu trong thời gian thực hiện luận án này.

Tôi xin chân thành cảm Quý Thầy cô, các anh chị em Bộ môn Sinh hóa của Trường ĐH khoa học Tự nhiên – ĐHQG TP.HCM, Viện Sinh học nhiệt đới đã hỗ trợ trong thời gian học tập và làm nghiên cứu sinh.

Tôi xin cảm Ban Giám đốc, Phòng Đào tạo Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Sinh học nhiệt đới đã hỗ trợ tôi trong suốt thời gian làm nghiên cứu sinh.

Xin cảm ơn chân thành gửi đến tất cả những người thân, bạn bè, các em học viên và sinh viên đã giúp đỡ và động viên trong quá trình làm luận án này.

NCS. Trần Quang Vinh

MỤC LỤC

| | |
|---|------|
| LỜI CAM ĐOAN..... | i |
| LỜI CẢM ƠN..... | ii |
| MỤC LỤC..... | iii |
| DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT..... | viii |
| DANH MỤC HÌNH..... | ix |
| DANH MỤC BẢNG..... | xii |
| ĐẶT VẤN ĐỀ..... | 0 |
| CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU..... | 2 |
| 1.1. Đặc điểm sinh học tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> | 2 |
| 1.1.1. Vị trí phân loại..... | 2 |
| 1.1.2. Đặc điểm hình thái..... | 2 |
| 1.1.3. Thành phần dinh dưỡng và giá trị sử dụng..... | 4 |
| 1.1.4. Astaxanthin từ tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> | 4 |
| 1.2. Giới thiệu chung về chủng nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 6 |
| 1.2.1. Phân loại của <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 6 |
| 1.2.2. Đặc điểm hình thái của <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 6 |
| 1.2.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa..... | 7 |
| 1.2.4. Môi trường nuôi cấy..... | 9 |
| 1.3. Phương pháp phá vách tế bào nấm men..... | 15 |
| 1.3.1. Cấu trúc vách tế bào nấm men..... | 15 |
| 1.3.2. Phá vách tế bào nấm men..... | 15 |
| 1.3.3. Nghiền cơ học..... | 16 |
| 1.3.4. Phương pháp phá màng sử dụng dung môi hữu cơ..... | 17 |
| 1.3.5. Phương pháp phá màng sử dụng enzyme..... | 17 |
| 1.4. Tổng quan về astaxanthin và hoạt tính sinh học..... | 17 |
| 1.4.1. Tính chất vật lý – hóa học của astaxanthin..... | 19 |
| 1.4.2. Hoạt tính sinh học của astaxanthin..... | 21 |
| 1.4.2.1. Tác dụng kháng oxy hóa..... | 21 |
| 1.4.2.2. Tác dụng kháng ung thư..... | 22 |
| 1.4.2.3. Tác dụng kháng viêm..... | 22 |
| 1.4.2.4. Tác dụng kháng khuẩn..... | 22 |
| 1.4.2.5. Một số tác dụng tích cực khác của astaxanthin đối với sức khỏe con người..... | 23 |
| 1.5. Tình hình nghiên cứu về tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> | 24 |
| 1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới..... | 24 |
| 1.5.2. Tình hình nghiên cứu trong nước..... | 27 |
| 1.5.3. Một số kết quả nghiên cứu về bổ sung sắc tố astaxanthin vào trong thức ăn cho cá cảnh..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6. Tình hình nghiên cứu astaxanthin từ <i>Rhodospiridium</i> sp. | 31 |
| 1.6.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới | 31 |
| 1.6.2. Tình hình nghiên cứu trong nước | 34 |
| CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 36 |
| 2.1. Vật liệu nghiên cứu..... | 36 |
| 2.1.1. Môi trường giữ giống..... | 36 |
| 2.1.2. Môi trường nuôi cấy (Môi trường rỉ đường)..... | 36 |
| 2.1.3. X, 1 atm, trường rỉ đường | 37 |
| 2.2.Nghiên cứu nuôi cấy thu nhận astaxanthin trên tảo <i>H. pluvialis</i> | 37 |
| 2.2.1. Chọn lọc môi trường, thiết lập điều kiện nhân sinh khối <i>H. pluvialis</i> | 37 |
| 2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của loại ánh sáng đến vòng đời tăng trưởng của <i>H. pluvialis</i> | 39 |
| 2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của chế độ ánh sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> | 40 |
| 2.2.3.1. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> | 40 |
| 2.2.3.2. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> | 40 |
| 2.2.3.3. Xác định thời điểm dừng quá trình gây stress ở tảo <i>H. pluvialis</i> | 41 |
| 2.2.4. Ảnh hưởng nguồn nitơ và nồng độ nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng của tảo <i>H. pluvialis</i> | 41 |
| 2.2.5. Ảnh hưởng của sự thiếu hụt nitơ lên sự tích lũy astaxanthin của tảo <i>H. pluvialis</i> | 41 |
| 2.2.6. Chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm..... | 42 |
| 2.2.7. Quy trình tách chiết và định lượng carotenoid chứa astaxanthin từ tảo <i>H. pluvialis</i> | 43 |
| 2.2.7.1. Sơ đồ quy trình tách chiết: | 43 |
| 2.2.7.2. Phương pháp định lượng hàm lượng sắc tố carotenoi chứa astaxanthin..... | 43 |
| 2.2.7.3. Phương pháp tách chiết astaxanthin trong tảo <i>H. pluvialis</i> | 44 |
| 2.3. Nghiên cứu thu nhận astaxanthin trên nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 45 |
| 2.3.1. Tối ưu hóa quy trình bằng phương pháp đáp ứng bề mặt Box - Behnken nhằm thu nhận carotenoid | 45 |
| 2.3.2. Nâng cấp và khảo sát điều kiện nuôi cấy thu nhận astaxanthin ở hệ thống lên men 10 lít..... | 45 |
| 2.3.3. Định tính và định lượng carotenoid và astaxanthin từ <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.3.1. Sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography - TLC) | 46 |
| 2.3.3.2. Phương pháp đo quang | 47 |
| 2.3.3.3. HPLC..... | 48 |
| 2.3.4. Khảo sát sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tương ứng với quá trình tăng trưởng chủng <i>Rhodospirium toruloides</i> | 48 |
| 2.3.5. Khảo sát môi trường ri đường nuôi cấy <i>Rhodospiridium toruloides</i> 49 | |
| 2.3.6. Thu sinh khối và tách chiết astaxanthin từ <i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> | 50 |
| 2.4. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của astaxanthin | 51 |
| 2.4.1. Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa DPPH..... | 51 |
| 2.4.1.1. Khảo sát hoạt tính bắt gốc ABTS+ | 51 |
| 2.4.1.2. Phương pháp khảo sát năng lực khử | 52 |
| 2.4.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của astaxanthin thu nhận từ nấm <i>men Rhodospiridium turoloides</i> | 53 |
| 2.4.2.1. Định tính bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch | 53 |
| 2.4.2.2. Khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu MIC (Minimum Inhibitory Concentration) | 54 |
| 2.4.3. Đánh giá khả năng tăng màu sắc trên cá đĩa đỏ <i>Symphysodon sp.</i> | 54 |
| 2.5. Xử lý số liệu | 55 |
| CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... | 56 |
| 3.1.Nghiên cứu thu nhận astaxanthin trên tảo <i>H. pluvialis</i> | 56 |
| 3.1.1. Hình thái tế bào và các giai đoạn đặc trưng của tảo <i>H. pluvialis</i> | 56 |
| 3.1.2. Ảnh hưởng của các môi trường dinh dưỡng lên mật độ và trọng lượng khô của tảo <i>H. pluvialis</i> | 57 |
| 3.1.3. Ảnh hưởng của các môi trường dinh dưỡng lên hàm lượng sắc tố <i>chlorophyll a</i> và astaxanthin của tảo <i>H. pluvialis</i> | 60 |
| 3.1.4. Ảnh hưởng ánh sáng đến vòng đời tăng trưởng của <i>H. pluvialis</i> (qui mô 10 lít)..... | 63 |
| 3.1.5. Ảnh hưởng của chế độ ánh sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> | 65 |
| 3.1.6. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> | 66 |
| 3.1.7. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> | 71 |
| 3.1.8. Tỷ lệ astaxanthin/ <i>chlorophyll a</i> của vi tảo <i>H. pluvialis</i> | 77 |
| 3.2. Tách chiết astaxanthin thu nhận từ Tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> | 80 |
| 3.3. Thử nghiệm hoạt tính sinh học của astaxanthin thu nhận từ Tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> | 82 |
| 3.3.1. Kết quả định tính astaxanthin | 82 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.2. Định lượng astaxanthin..... | 82 |
| 3.3.3. Đánh giá khả năng chống oxi hóa..... | 84 |
| 3.3.3.1. Kết quả khảo sát năng lực khử..... | 84 |
| 3.3.3.2. Kết quả khảo sát khả năng bắt gốc ABTS+ | 85 |
| 3.3.4. Đánh giá sự lên màu của cá dĩa đỏ..... | 86 |
| 3.4. Nghiên cứu thu nhận astaxanthin trên nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 88 |
| 3.4.1. Xác định một số thành phần trong rỉ đường trước và sau khi xử lý cần cho quá trình nuôi cấy nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> để thu nhận astaxanthin..... | 88 |
| 3.4.2. Kết quả khảo sát các yếu tố thích hợp cho nuôi cấy <i>Rhodospiridium toruloides</i> trên môi trường rỉ đường..... | 89 |
| 3.4.2.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng urea. | 89 |
| 3.4.2.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng $MgSO_4.7H_2O$ | 91 |
| 3.4.2.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4 | 92 |
| 3.4.2.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng tỷ lệ giống đến hàm lượng astaxanthin ... | 94 |
| 3.4.2.5. Kết quả khảo sát hàm lượng đường tổng đến hàm lượng astaxanthin | 95 |
| 3.4.3.. Kết quả xây dựng đường cong tăng trưởng của chủng <i>Rhodospiridium sp.</i> , trên môi trường rỉ đường đã khảo sát các yếu tố thích hợp | 96 |
| 3.4.4. Kết quả tối ưu hóa thành phần môi trường..... | 98 |
| 3.4.5. Kết quả Nâng cấp hệ thống lên men 10 lít của <i>Rhodospiridium toruloides</i> trên môi trường rỉ đường tối ưu..... | 101 |
| 3.5. Kết quả tách chiết astaxanthin từ nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> ... | 102 |
| 3.5.1. Kết quả tách chiết astaxanthin bằng HCl..... | 102 |
| 3.5.2. Kết quả tách chiết bằng DMSO..... | 104 |
| 3.5.2.1. Khảo sát thể tích DMSO | 104 |
| 3.5.2.2. Kết quả khảo sát thời gian ủ DMSO..... | 104 |
| 3.5.2.3. Kết quả khảo sát nhiệt độ ủ DMSO | 105 |
| 3.5.2.4. Khảo sát dung môi hòa tan | 106 |
| 3.5.3. Tách chiết astaxanthin bằng enzyme cellulase | 106 |
| 3.5.3.1. Khảo sát thời gian ủ với cellulase | 106 |
| 3.5.3.2. Khảo sát nhiệt độ thích hợp đối với hoạt động của cellulase để phá màng tế bào nấm men..... | 108 |
| 3.5.3.3. Khảo sát pH thích hợp cho hoạt động của cellulase | 108 |
| 3.5.3.4. Khảo sát nồng độ cellulase thích hợp được bổ sung để phá màng tế bào nấm men..... | 109 |
| 3.5.3.5. Khảo sát tỷ lệ nước bổ sung thích hợp cho hoạt động của cellulase .. | 110 |

| | |
|---|------------|
| 3.6.Thử nghiệm hoạt tính sinh học của astaxanthin từ nấm men | |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 112 |
| 3.6.1. Hoạt tính kháng oxy hoá của dịch chiết astaxanthin..... | 112 |
| 3.6.1.1. Bắt gốc tự do DPPH | 112 |
| 3.6.1.2. Bắt gốc tự do ABTS+ | 112 |
| 3.6.1.3. Năng lực khử | 113 |
| 3.6.2. Kết quả thử kháng khuẩn của dịch chiết astaxanthin từ | |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 113 |
| 3.6.3. Thử nghiệm hoạt tính tăng cường màu sắc ở cá dĩa đỏ <i>Symphysodon</i> | |
| <i>sp.</i> , của astaxanthin từ <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 115 |
| 3.7. So sánh kết quả trên tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> và nấm men | |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 116 |
| CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ | 120 |
| 4.1. Kết luận..... | 120 |
| 4.2. Kiến nghị..... | 122 |

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ASTX: Astaxanthin

BHA: Butylated hydroxyanisole

BTT: Bột thủy tinh

CT: Công thức

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DE: Dimethyl ether

DMAPP: Dimethylallyl pyrophosphate

DNS: Dinitrosalicylic

DPPH: Ethylenediaminetetraacetic acid

ĐC Đối chứng

FDA: The United State Food and Drug Administration (Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược Hoa Kỳ)

GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate

HCl: Acid clohydric

HPLC: High-performance liquid chromatography (sắc kí lỏng hiệu năng cao)

IPP: Isopentenyl pyrophosphate

MIC: Minimum Inhibitory Concentration (Nồng độ ức chế tối thiểu)

MĐTĐB: Mật độ tế bào

MT: Môi trường

NOS: Nitric oxide synthase

NO: Nitric oxide

OD: Optical Density (mật độ quang)

PE: Petroleum ether (ete dầu hỏa)

SDS: Sodium dodecyl sulphate

TCA: Trichloroacetic acid

TLC: Thin layer chromatography (sắc ký lớp mỏng)

TLK: Trọng lượng khô

TN: Thí nghiệm

TB: Tế bào

VCK: Vật chất khô

DANH MỤC HÌNH

| | |
|---|----|
| Hình 1. 1: Sự thay đổi Hình thái trong vòng đời của <i>H. pluvialis</i> × 40 | 3 |
| Hình 1. 2: Bể nuôi tảo ngoài trời sản xuất astaxanthin sinh khối và astaxanthin dạng bột tại Trung Quốc..... | 5 |
| Hình 1. 3: Ảnh chụp TEM của tế bào nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 7 |
| Hình 1. 4: Khuẩn lạc nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 7 |
| Hình 1. 5: Các dạng đồng phân của astaxanthin | 20 |
| Hình 1. 6: Phân tử trans-astaxanthin với các đầu phân cực [20], [69] | 20 |
| Hình 1. 7: Tóm tắt các tác động của astaxanthin trong phòng, chống các bệnh chuyển hóa và cơ chế cơ bản. ASTX: Astaxanthin; T2D: Bệnh tiểu đường type 2; NAFLD: Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu; Bệnh tim mạch | 24 |
| Hình 1. 10: Quạt màu dùng so sánh màu sắc cho cơ thịt cá hồi | 29 |
| Hình 2. 1: Các loại ánh sáng khác nhau trong thí nghiệm (Led Trắng/Xanh/Tím/Đỏ)..... | 39 |
| Hình 2. 2: Khuẩn lạc <i>Rhodospiridium toruloides</i> trên môi trường thạch Hansen..... | 48 |
| Hình 2. 3: Hệ thống nuôi cấy 10 lít được thiết lập tại PTN.Bộ môn Sinh hóa – trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên TP.HCM | 46 |
| Hình 2. 4: Sơ đồ quy trình khảo sát điều kiện nuôi cấy trên môi trường rỉ đường | 57 |
| Hình 2. 5: Sơ đồ Quy trình khảo sát điều kiện nuôi cấy nấm men trên môi trường rỉ đường | 49 |
| Hình 3. 5: Sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a của <i>H. pluvialis</i> | 61 |
| Hình 3. 6: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> | 62 |
| Hình 3. 7: Mật độ tế bào thay đổi theo thời gian thí nghiệm (x 400 lần) | 63 |
| Hình 3. 8: Sự biến động mật độ tế bào của <i>H. pluvialis</i> dưới các loại ánh sáng khác nhau..... | 64 |
| Hình 3. 9: Trọng lượng khô của <i>H. pluvialis</i> ở 4 loại ánh sáng khác nhau | 64 |
| Hình 3. 10: Sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a của <i>H. pluvialis</i> ở 4 loại ánh sáng khác nhau | 65 |
| Hình 3. 11: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> ở 4 loại ánh sáng khác nhau | 65 |
| Hình 3. 12: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> khi gây sốc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau..... | 67 |

| | |
|--|----|
| Hình 3. 13: Trọng lượng khô của <i>H. pluvialis</i> khi sốc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau | 69 |
| Hình 3. 14: Hình thái tế bào và hàm lượng sắc tố của tảo <i>H. pluvialis</i> dưới kính hiển vi | 71 |
| Hình 3. 15: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của tảo <i>H. pluvialis</i> khi gây sốc bằng thời gian chiếu sáng khác nhau | 73 |
| Hình 3. 16: Trọng lượng khô của <i>H. pluvialis</i> khi gây sốc bằng thời gian chiếu sáng khác nhau | 74 |
| Hình 3. 17: Sự thay đổi màu sắc của tảo <i>H. pluvialis</i> ở các thời gian chiếu sáng khác nhau | 75 |
| Hình 3. 18: Hình thái tế bào và hàm lượng sắc tố của tảo <i>H. pluvialis</i> dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần ở các thời gian chiếu sáng khác nhau..... | 76 |
| Hình 3. 19: Sự thay đổi hàm lượng nitơ theo thời gian nuôi cấy..... | 78 |
| Hình 3. 20: Quy trình tách chiết astaxanthin trong tảo <i>H. pluvialis</i> | 81 |
| Hình 3. 21: Kết quả định tính astaxanthin thu được bằng sắc ký bản mỏng | 82 |
| Hình 3. 22: Kết quả HPLC dịch chiết tảo <i>H. pluvialis</i> | 83 |
| Hình 3. 23: Kết quả HPLC dịch chiết tảo <i>H. pluvialis</i> sau khi xà phòng hóa | 83 |
| Hình 3. 24: Kết quả HPLC mẫu thương mại (Sigma) độ tinh khiết 97% | 84 |
| Hình 3. 25: Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa ΔOD và nồng độ BHA ($\mu g/ml$) ở bước sóng 700 nm..... | 84 |
| Hình 3. 26: Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa ΔOD và nồng độ astaxanthin ($\mu g/ml$) ở bước sóng 700 nm | 85 |
| Hình 3. 27: Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa hiệu suất bắt gốc tự do ABTS ⁺ và nồng độ BHA và Astaxanthin tách chiết ($\mu g/ml$) ở bước sóng 734nm..... | 86 |
| Hình 3. 28: Màu sắc của cá dĩa khi cho ăn thức ăn có astaxanthin ở các nghiệm thức (ĐC, NT1, NT2) | 88 |
| Hình 3. 29: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy | 90 |
| Hình 3. 30: Sinh khối tươi thu được khi khảo sát ảnh hưởng urea | 90 |
| Hình 3. 31: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy | 92 |
| Hình 3. 32: Sinh khối astaxanthin khi khảo sát ảnh hưởng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 92 |
| Hình 3. 33: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy | 93 |
| Hình 3. 34: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy ở những tỷ lệ giống khác nhau..... | 94 |

| | |
|---|-----|
| Hình 3. 35: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy ở hàm lượng đường tổng khác nhau..... | 96 |
| Hình 3. 36: Đồ thị đường tương quan tuyến tính giữa OD _{610nm} và mật độ tế bào log (N/ml)..... | 97 |
| Hình 3. 37: Đồ thị đường cong tăng trưởng khi tăng sinh bậc 1 của chủng <i>Rhodospiridium</i> sp., trên môi trường rỉ đường..... | 97 |
| Hình 3. 38: Mặt đáp ứng hàm lượng carotenoid chứa astaxanthin theo hàm lượng đường tổng và urea | 100 |
| Hình 3. 39: Mặt đáp ứng hàm lượng carotenoid theo hàm lượng đường tổng và pH | 100 |
| Hình 3. 40: Mặt đáp ứng hàm lượng carotenoid theo hàm lượng đường tổng và pH | 100 |
| Hình 3. 41 Sinh khối khô nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 102 |
| Hình 3. 42: Hàm lượng astaxanthin chiết tách từ sinh khối nấm men khô bằng HCl với dung môi chiết rút khác nhau | 103 |
| Hình 3. 43: Hàm lượng astaxanthin chiết từ sinh khối nấm men khô bằng DMSO .. | 104 |
| Hình 3. 44: Hàm lượng astaxanthin chiết từ sinh khối nấm men khô bằng DMSO với thời gian khác nhau..... | 105 |
| Hình 3. 45: Hàm lượng astaxanthin tách từ sinh khối nấm men khô bằng DMSO ở nhiệt độ ủ khác nhau. | 106 |
| Hình 3. 46: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men bằng cellulase với tỷ lệ nước khác nhau | 107 |
| Hình 3. 47: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men bằng cellulase ở nhiệt độ ủ khác nhau..... | 108 |
| Hình 3. 48: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men với nồng độ cellulase (UI/ml) khác nhau..... | 109 |
| Hình 3. 49: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men bằng cellulase với tỷ lệ nước khác nhau. | 110 |
| Hình 3.50: Khả năng kháng khuẩn của astaxanthin thu nhận..... | 115 |
| Hình 3. 51: Màu sắc của cá dĩa đỏ <i>Symphysodon</i> sp., khi cho ăn thức ăn có astaxanthin ở các nghiệm thức..... | 116 |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|---|----|
| Bảng 1. 1: Đặc điểm sinh lý sinh hóa của chủng <i>Rhodospiridium paludigenum</i> | 7 |
| Bảng 1. 2: So sánh trọng lượng sinh khối và hàm lượng carotenoid giữa các chủng nấm men thuộc chi <i>Rhodotorula</i> trên môi trường sử dụng glucose và các phế phụ phẩm công/nông nghiệp khác nhau làm nguồn carbon | 8 |
| Bảng 1. 3: Sự biến động của các thành phần trong rỉ đường mía | 10 |
| Bảng 1. 4: Hàm lượng các loại đường trong rỉ đường mía Việt Nam thủ công và công nghiệp..... | 11 |
| Bảng 1. 5: Hàm lượng các thành phần chứa nitơ trong rỉ đường mía. | 11 |
| Bảng 1. 6: Hàm lượng các nguyên tố khoáng có trong rỉ đường mía Việt Nam thủ công và công nghiệp | 12 |
| Bảng 1. 7: Thành phần một số chất sinh trưởng của rỉ đường mía | 13 |
| Bảng 1. 8: Hàm lượng các acid amin trong rỉ đường | 13 |
| Bảng 1. 9: Muối vô cơ và chức năng sinh lý của chúng | 15 |
| Bảng 1. 10: Một số tính chất vật lý cơ bản của astaxanthin..... | 19 |
| Bảng 2. 1: Nồng độ của nitơ có trong môi trường RM ở các nghiệm thức | 42 |
| Bảng 2. 2: Phương pháp bố trí thí nghiệm | 55 |
| Bảng 3. 1: Mật độ tế bào của <i>H. pluvialis</i> ở 4 loại môi trường RM, C, B và F2 (x10 ⁴) | 57 |
| Bảng 3. 2: Trọng lượng khô của <i>H. pluvialis</i> ở 4 loại môi trường RM, C, B và F2 | 58 |
| Bảng 3. 3: Hàm lượng chlorophyll a của <i>H. pluvialis</i> trong 4 môi trường nuôi cấy.... | 61 |
| Bảng 3. 4: Hàm lượng astaxanthin của <i>H. pluvialis</i> khi gây sốc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau | 66 |
| Bảng 3. 5: Trọng lượng khô của <i>H. pluvialis</i> khi gây sốc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau | 68 |
| Bảng 3. 6: % astaxanthin/trọng lượng khô của tảo <i>H. pluvialis</i> ở cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ | 70 |
| Bảng 3. 7: Hàm lượng astaxanthin của tảo <i>H. pluvialis</i> khi gây sốc bằng thời gian.... | 72 |
| Bảng 3. 8: Trọng lượng khô của tảo <i>H. pluvialis</i> khi gây sốc bằng thời gian..... | 74 |
| Bảng 3. 9: % astaxanthin/TLK của tảo <i>H. pluvialis</i> ở thời gian chiếu sáng là 24 giờ ... | 75 |
| Bảng 3. 10: Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a của tảo <i>H. pluvialis</i> ở các giai đoạn khác nhau | 77 |
| Bảng 3. 11: Hàm lượng astaxanthin sau khi ly trích | 79 |

| | |
|---|-----|
| Bảng 3. 12: Hàm lượng astaxanthin khi chiết bằng bột thủy tinh và DMSO | 80 |
| Bảng 3. 13: Nồng độ mẫu Astaxanthin thu được và mẫu BHA để $\Delta OD_{700\text{ nm}} = 0,02$.. | 85 |
| Bảng 3. 14: Giá trị IC_{50} của mẫu BHA và carotenoid tách chiết | 86 |
| Bảng 3. 15: Giá trị L^* , a^* , b^* đánh giá màu sắc của cá sau thí nghiệm..... | 87 |
| Bảng 3. 16: Kết quả định lượng canxi trong rỉ đường trước và sau xử lý | 88 |
| Bảng 3. 17: Kết quả định lượng đường tổng và đường khử trong rỉ đường | 89 |
| Bảng 3. 18: Ảnh hưởng của hàm lượng urea đến hàm lượng astaxanthin..... | 89 |
| Bảng 3. 19: Ảnh hưởng của hàm lượng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ công nghiệp đến | 91 |
| Bảng 3. 20: Ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4 đến hàm lượng astaxanthin | 93 |
| Bảng 3. 21: Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến hàm lượng astaxanthin. | 94 |
| Bảng 3. 22: Ảnh hưởng hàm lượng đường tổng đến hàm lượng astaxanthin..... | 95 |
| Bảng 3. 23: Thiết kế và kết quả thí nghiệm Box – Behnken | 98 |
| Bảng 3. 24: Kết quả phân tích ANOVA của các yếu tố hồi quy theo Box – Behnken | 99 |
| Bảng 3. 25: Kết quả phân tích ANOVA của mô hình hồi quy theo Box – Behnken... | 99 |
| Bảng 3. 26: Kết quả thực nghiệm và dự đoán hàm lượng carotenoid trong | 101 |
| Bảng 3. 27: Hàm lượng sinh khối khô và astaxanthin thu nhận được của | 102 |
| Bảng 3. 28: Giá trị IC_{50} của vitamin C, BHA và mẫu dịch chiết astaxanthin..... | 112 |
| Bảng 3. 29: Giá trị IC_{50} của vitamin C, BHA và mẫu dịch chiết astaxanthin..... | 113 |
| Bảng 3. 30: Giá trị $\Delta OD_{700\text{nm}}$ của vitamin C, BHA và mẫu chiết astaxanthin..... | 113 |
| Bảng 3. 31: Đường kính kháng khuẩn astaxanthin được thu nhận | 114 |
| Bảng 3. 32: Điểm số màu sắc của cá đĩa đỏ ở các nghiệm thức | 116 |
| Bảng 3. 33: Đối chiếu kết quả về thu nhận và hoạt tính sinh học của astaxanthin | 117 |

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên có khả năng chống oxy hóa đang là mối quan tâm hàng đầu. Trên thế giới, astaxanthin cũng đang được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và ứng dụng, bởi có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn các hợp chất khác như β -caroten, lycopene, lutein hay vitamin E. Theo đó, astaxanthin có thể ngăn ngừa sự phát triển của các tế bào ung thư, bảo vệ da khỏi tia cực tím, ngăn ngừa sự lão hóa da, thoái hóa điểm vàng, làm giảm cholesterol máu, v.v. Hiện nay, hầu hết astaxanthin thương mại đều là các sản phẩm tổng hợp hóa học hoặc là carotenoid. Tuy nhiên, giá thành cao và nhu cầu sử dụng các sản phẩm tự nhiên tăng nhanh nên việc tìm kiếm và khai thác nguồn astaxanthin trong tự nhiên đang được đặc biệt quan tâm [1].

Ngoài vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) được xem là những đối tượng sinh vật tích lũy astaxanthin tiềm năng nhất thì nấm men *Rhodospiridium* sp., cũng là đối tượng tiềm năng để thu nhận astaxanthin. Astaxanthin từ *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) đã được thế giới nghiên cứu và ứng dụng từ rất lâu, chúng được sử dụng làm thuốc chống oxy hóa, chất phụ gia tạo màu cho các sản phẩm nông nghiệp, làm thức ăn cho cá koi, cá đĩa, cá hồi và gia cầm, v.v. [2]

Tại Việt Nam astaxanthin cũng đã bắt đầu được quan tâm nghiên cứu tìm hiểu về điều kiện nuôi cấy, ảnh hưởng của nồng độ muối nitrate, HCO_3 , ánh sáng, v.v. lên quá trình tích lũy astaxanthin trong tế bào tảo *Haematococcus pluvialis* đang được triển khai, đồng thời, tận dụng nguồn nguyên liệu rỉ đường thành môi trường nuôi cấy, nhằm giảm chi phí sản xuất cũng như giảm thiểu các vấn đề về môi trường và năng lượng phát sinh trong quá trình sản xuất, nâng cao sản lượng sinh astaxanthin và hạ thấp chi phí đầu vào cũng là vấn đề cần lưu ý.

Vì vậy, việc thực hiện luận án nghiên cứu nuôi cấy, gây stress để tích lũy astaxanthin cao trong tế bào tảo *Haematococcus pluvialis*. Ngoài ra, nấm men *Rhodospiridium toruloides* là đối tượng mới, do nhóm nghiên cứu phân lập và định danh có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin cao ở điều kiện TP.HCM, Việt Nam, được dùng để nghiên cứu thu nhận và tách chiết astaxanthin dùng để thử nghiệm một số hoạt tính sinh học nhằm ứng dụng cho ngành y dược, mỹ phẩm, chăn nuôi và thủy sản.

Mục tiêu nghiên cứu của luận án

- Tối ưu hóa được quy trình nuôi cấy tảo *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Rhodospiridiumtoruloides* sinh tổng hợp astaxanthin có hàm lượng cao.

- Thu nhận, tách chiết hợp chất astaxanthin từ tảo *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Rhodospiridiumtoruloides*; Đánh giá được một số hoạt tính sinh học của astaxanthin, nhằm định hướng ứng dụng cho ngành y dược, mỹ phẩm, thủy sản.

Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

- Nghiên cứu, tối ưu hóa và nâng cấp quy trình nuôi cấy tảo *H. pluvialis* để thu nhận astaxanthin; thí nghiệm gây stress bằng ánh sáng đơn sắc và hàm lượng Nitơ nhằm thu nhận astaxanthin cao .

- Nghiên cứu, tối ưu hóa quy trình nuôi cấy nấm men *Rhodospiridiumtoruloides* thu nhận astaxanthin cao; Nâng cấp quy trình nuôi cấy ở quy mô 10 lít, nhằm tách chiết thu nhận astaxanthin.

- Thu nhận, tách chiết hợp chất astaxanthin từ sinh khối tảo *H. Pluvialis* và nấm men *Rhodospiridium toruloides*.

- Thử nghiệm đánh giá một số hoạt tính sinh học của astaxanthin thu nhận từ 02 đối tượng trên như: tính khử, tính oxy hóa, tính kháng khuẩn và khả năng tăng cường sắc tố ở cá đĩa đỏ *Symphysodon* sp.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.

1.1. **Đặc điểm sinh học tảo *Haematococcus pluvialis***

1.1.1. **Vị trí phân loại [3]**

Vị trí của *Haematococcus pluvialis* trong hệ thống phân loại Smith (1950):

Ngành: Chlorophyta

Lớp: Chlorophyceae

Bộ: Volvocales

Họ: Chlamydomonadales

Giống: *Haematococcus*

Loài: *Haematococcus pluvialis*

1.1.2. **Đặc điểm hình thái**

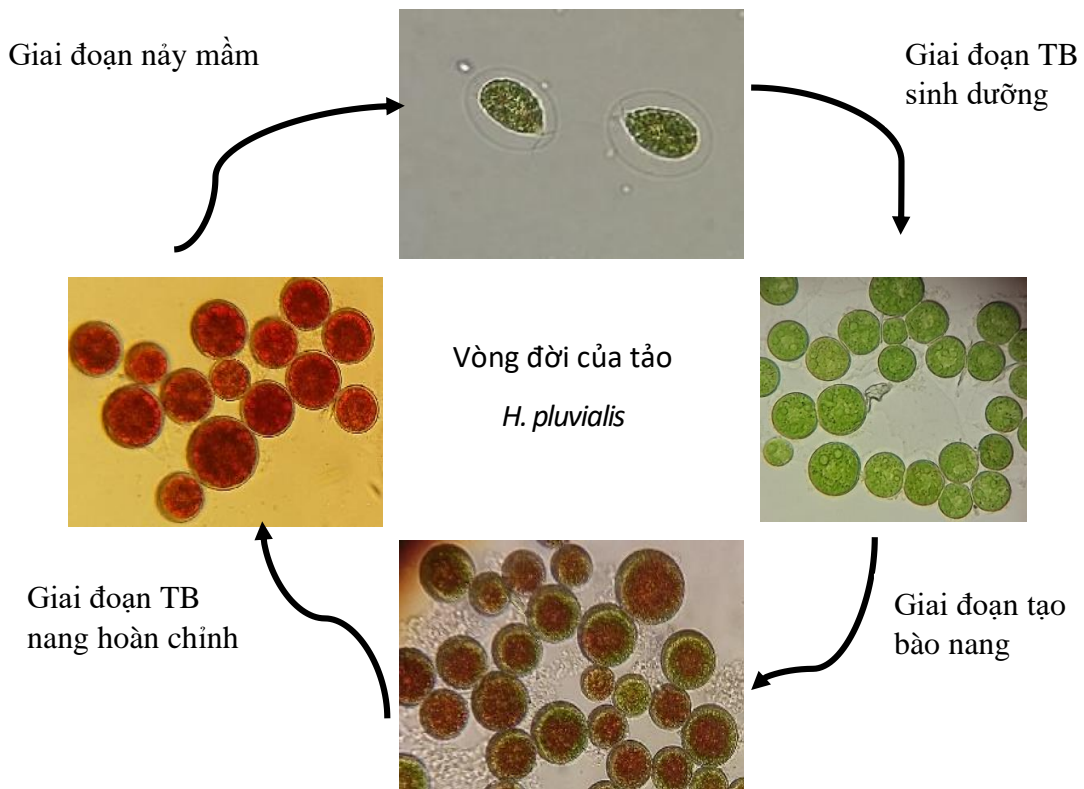
Haematococcus pluvialis (*H. pluvialis*) là một loài vi tảo lục đơn bào, thuộc nhóm tảo lục hai roi ở nước ngọt và có khả năng chuyển động ở giai đoạn sinh dưỡng (Riley và ctv, 1983) [4]. Chúng sinh sản vô tính bằng cách nhân đôi. Trong chu trình sống của *H. pluvialis*, hình thái tế bào của chúng có sự biến đổi khác nhau. Có hai dạng tế bào tương ứng với đặc điểm sinh trưởng: tế bào sinh dưỡng và nang bào tử (cyst).

Tế bào sinh dưỡng có màu xanh, dạng cầu hoặc elip với đường kính khoảng 10 - 20 μm , có thể chuyển động nhờ hai roi. Ở điều kiện thuận lợi, hầu hết tế bào đều ở dạng sinh dưỡng, có hàm lượng chlorophyll a, b và tiền carotenoid, đặc biệt là β -carotene và lutein cao. Chúng dinh dưỡng quang tự dưỡng trong điều kiện có ánh sáng (Bubrick, 1991) [5] và dị dưỡng trong tối (Riley và ctv, 1983).

Nang bào tử sẽ hình thành khi gặp điều kiện bất lợi như cạn kiệt dinh dưỡng, cường độ ánh sáng cao, nhiệt độ cao, stress muối, v.v.. Tế bào sẽ hình thành nang bào tử và hình thái thay đổi sang dạng cyst. Tế bào dạng hình cầu, không roi, không di động. Thành tế bào dày lên, đường kính của tế bào tăng lên đột ngột tới 40 - 50 μm (Lorenz và ctv, 2000) [6]. Ngoài ra, những tế bào nang này có hàm lượng carotenoid thứ cấp như canthaxanthin, echinenone và astaxanthin cao trong khi đó hàm lượng chlorophyll và tiền carotenoid lại giảm (Droop, 1994) [7]. Tế bào tích lũy một lượng lớn astaxanthin đồng thời tốc độ sinh trưởng của *H. pluvialis* ở giai đoạn này giảm. Đầu tiên, astaxanthin được hình thành chủ yếu tập trung quanh nhân và quá trình được tiếp diễn đến khi toàn bộ tế bào chuyển sang màu đỏ (Lee và Soh, 1991) [8]. Hàm lượng astaxanthin ở các tế

bào dạng cyst đạt khoảng 5% trọng lượng khô (Renstrom và ctv, 1981) [9]. Dưới điều kiện quang tự dưỡng, thời gian chuyển pha mất khoảng vài tuần (Droop, 1995). Sự tích lũy astaxanthin cao diễn ra cùng lúc với sự thay đổi hàm lượng sắc tố và protein nội bào. Theo Hagen và ctv (1993) [10] một số công bố cho thấy hàm lượng chlorophyll không đổi trong suốt quá trình tích lũy astaxanthin, nhưng trong nghiên cứu của Spery (1970) [11] thì hàm lượng này có xu hướng giảm đi.

Có nghiên cứu về vòng đời của vi tảo *H. pluvialis* trên thế giới đã chỉ ra rằng sinh trưởng của loài tảo này trải qua 4 giai đoạn với sự thay đổi về hình thái, kích thước tế bào, hàm lượng sắc tố và protein nội bào [7]. Theo kết quả nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và cs, 2010, cũng chỉ ra rằng vòng đời của tảo trải qua 4 giai đoạn sau:



Hình 1. 1: Sự thay đổi hình thái trong vòng đời của *H. pluvialis* $\times 40$ [12]

(I) *Giai đoạn tế bào sinh dưỡng:* tế bào hình elip, chuyển động bằng hai roi, phân chia tế bào để gia tăng số lượng. Hàm lượng carotenoid trong tế bào thấp, dạng tế bào này chiếm chủ yếu trong 12 ngày nuôi đầu tiên.

(II) *Giai đoạn tạo bào nang:* từ 14 đến 20 tiếp theo các tế bào sinh dưỡng chuyển sang dạng màu nâu, hình khối cầu, mất hai roi.

(III) *Giai đoạn tế bào nang hoàn chỉnh:* tế bào nang đã hoàn chỉnh, bất động, tích lũy hàm lượng carotenoid cao nhất sau 20 ngày nuôi cấy.

(IV) *Giai đoạn nảy mầm:* xảy ra sự tổng hợp chlorophyll và protein xuất hiện sự phân giải carotenoid, bắt đầu một chu kỳ mới.

Trong vòng đời của tảo, hàm lượng chlorophyll và protein cao và hàm lượng carotenoid rất thấp trong tế bào sinh dưỡng chứa. Khi quá trình bào nang kèm theo việc giảm sút hàm lượng chlorophyll và protein. Tế bào tăng quá trình sinh tổng hợp carotenoid, giảm protein và trưởng thành. Sự tổng hợp chlorophyll, protein và giảm carotenoid cùng với nảy mầm. Dưới kính hiển vi, có thể quan sát và nhận biết sự bào nang, trưởng thành và chín. Sự tích lũy carotenoid/chlorophyll được thể hiện qua các thông số để phân biệt giữa các tế bào sinh dưỡng (lục), các tế bào còn non (nâu) và tế bào chín (đỏ). Trong tế bào sinh dưỡng, non và chín, tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a vào khoảng 0,5; 1,0 và 7,0 [11], [12].

1.1.3. Thành phần dinh dưỡng và giá trị sử dụng

Trong tảo *H. Pluvialis*, các thành phần dinh dưỡng bao gồm carotenoid, các axit béo, carbohydrate, protein và các chất khoáng. Trong đó, carotenoid được quan tâm lớn nhất. Nhiều nghiên cứu cho thấy, thành phần carotenoid có trong sinh khối của loài vi tảo này chứa đến tỷ lệ 70% monoester của astaxanthin, 15 % astaxathin (10% dạng dieste và 5% dạng tự do), còn 15% là hỗn hợp của β carotenoid, lutein, cathaxanthin và các carotenoid khác.

Astaxanthin là loại carotenoid có tác dụng kháng một số bệnh, kích thích tăng trưởng, tạo màu sắc hấp dẫn nên thường được ứng dụng tương đối rộng rãi trong thực phẩm, nông nghiệp, y học và đặc biệt là trong chăn nuôi cá hồi. Astaxanthin có thể tổng hợp từ nguồn hóa học hoặc có nguồn gốc tự nhiên. Trước đây, người ta có thể sử dụng astaxanthin tổng hợp nhân tạo để tạo màu cho các loại thịt và tăng màu sắc của cá cảnh trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, tác dụng vượt trội của astaxanthin nguồn gốc tự nhiên đặc biệt là không có tác dụng phụ lên sức khỏe của con người đã được chứng minh thời gian gần đây có. Ngoài ra, chúng mang đến màu sắc sặc sỡ đối với cá cảnh các loài cá cảnh giúp magn lại giá trị chất lượng hơn [13].

1.1.4. Astaxanthin từ tảo *Haematococcus pluvialis*

Một số vi tảo với đặc tính phát triển nhanh chóng và chứa hàm lượng cao astaxanthin đã được nghiên cứu và ứng dụng như chất tạo sắc tố trong nuôi trồng thủy (NTTS). Đó là nguồn tạo sắc tố chính trong cá cảnh và cá nhiệt đới, là nguyên nhân tạo ra màu vàng, đỏ và các màu sắc khác ở các loài cá, là nguồn chứa carotenoid mà sinh vật có thể lấy được từ chuỗi thức ăn. Đặc biệt là *Haematococcus pluvialis* đã được nghiên cứu và đánh giá các yếu tố và điều kiện khác nhau ảnh hưởng tới sự tăng trưởng

và tối ưu hóa quy trình sản xuất tạo ra astaxanthin. Tuy nhiên, theo ý kiến một số chuyên gia ở Trung Quốc, chi phí sản xuất astaxanthin từ loại vi tảo này cao hơn so với chi phí sản xuất từ nấm men. Điều này tạo nên sự cạnh tranh về giá của sản phẩm liên quan trên thị trường trong nước và quốc tế (Lovatelli và ctv, 2009) [15].



Hình 1. 2: Bể nuôi tảo ngoài trời sản xuất astaxanthin sinh khối và astaxanthin dạng bột tại Trung Quốc (Lovatelli và ctv, 2009) [15]

Ở Nhật, bột tảo *Haematococcus pluvialis* đã được chấp thuận như nguồn thực phẩm tạo sắc tố đỏ tự nhiên và là sắc tố trong thức ăn cá. Ngoài ra, ở Canada và ở Mỹ *Haematococcus pluvialis* được sử dụng như một sắc tố bổ sung trong thức ăn cho cá hồi và chúng được sử dụng như sắc tố trong NTTS với nhiều chức năng như: (1) chất chống oxy hóa, (2) tiền chất của hormone, (3) gia tăng tính miễn dịch, (4) tiền chất của hoạt tính vitamin A, tham gia trong sinh sản, (6) tăng trưởng, (7) sự quang bảo vệ. Các nhà nghiên cứu đề nghị carotenoid như là chất dinh dưỡng thiết yếu nên bổ sung trong tất cả các khẩu phần ăn của ĐVTS với nồng độ tối thiểu là 5 - 10 ppm (Lorenz và ctv, 2000) [17].

Tảo lam *Spirulina* (thiếu tên loài - bổ sung tên loài) cũng là nguồn sắc tố quan trọng và là nguồn cung cấp dinh dưỡng. Loài tảo này được nuôi rộng khắp thế giới và được xem như chất bổ sung trong khẩu phần ăn của người và cá nuôi. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng *Spirulina* (tên loài) gia tăng sự tạo sắc tố có ý nghĩa trên tôm sú *Penaeus monodon* và những loài tôm nuôi khác. Bên cạnh đặc tính tạo sắc tố, *Spirulina* là nguồn thức ăn bổ sung có các lợi ích khác như gia tăng hiệu quả tiêu thụ và sử dụng thức ăn (Lovatelli và ctv, 2009) [15].

Tảo 2 roi, *Dunaliella salina* là nguồn chứa β -carotene, được sử dụng như là nguồn thức ăn tạo màu tự nhiên trong ngành công nghiệp thức ăn thủy sản. Trong điều kiện nuôi thích hợp, một số dòng tảo *D. salina* được báo cáo là tích lũy khoảng 10% carotenoid chứa phần lớn là β -carotene. Giá trị sinh học của β -carotene lớn hơn khi được quan tâm và sử dụng với dầu thực vật. Sự nghiên cứu sản xuất thương mại của β -carotene tự nhiên từ tảo *D. salina* là nguồn quan trọng hiện nay và đang phát triển quy mô công nghiệp [18].

1.2. Giới thiệu chung về chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides*

Rhodospiridium toruloides là nguồn sản xuất carotenoid dồi dào, ngoài ra chúng cũng có khả năng tích lũy chất béo lên đến 70% trọng lượng tế bào của nó. Hiện nay, *Rhodospiridium toruloides* là chủng nấm men có tiềm năng sinh học tổng hợp carotenoid bên cạnh *Phaffia rhodozyma* [20].

1.2.1. Phân loại của *Rhodospiridium toruloides*

- Giới (Kingdom): Fungi
- Ngành (Division): Basidiomycota
- Lớp (Class): Microbotryomycetes
- Bộ (Order): Sporidiobolales
- Họ (Family): Sporidiobolaceae
- Chi (Genus): *Rhodospiridium* [21].

1.2.2. Đặc điểm hình thái của *Rhodospiridium toruloides*

Rhodospiridium toruloides thuộc nhóm nấm men có khuẩn lạc, phát triển nhanh, bề mặt láng mịn, màu sắc của khuẩn lạc thay đổi tùy thuộc vào thời gian nuôi cấy. Nhìn chung các chủng này có màu sắc khuẩn lạc thay đổi từ cam sang hồng phấn đến đỏ cam, tế bào hình cầu đến elip, kích thước tế bào tương đối lớn (khoảng 6 x 9 μm), có vàng sáng xung quanh tế bào, thành tế bào tương đối dày, có nhân, sinh sản bằng cách nảy chồi đa hướng, có khả năng tạo khuẩn ty giả trên môi trường PDA. Chúng phát triển tốt nhất khoảng nhiệt độ 25 - 30°C và thích nghi với phổ pH khá rộng khoảng 3,0 đến 9,0 pH tối thích ở pH 6,0. Bùi Thị Phương Khánh (2011) đưa ra bảng mô tả các đặc điểm sinh lý - sinh hóa của chủng này khi phân lập và nghiên cứu chủng *Rhodospiridium toruloides* đã (bảng 1.1)



Hình 1. 3: Khuẩn lạc nấm men *Rhodosporidium toruloides* [22]

1.2.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Yimyoo, Yongmanitcha và Limtong (2011) khi nghiên cứu sự sản xuất carotenoid trên chủng *Rhodosporidium paludigenum* đã công bố bảng mô tả các đặc điểm sinh lý sinh hóa của chủng này (Bảng 1.1) [22].

Bảng 1. 1: Đặc điểm sinh lý sinh hóa của chủng *Rhodosporidium paludigenum* sản xuất carotenoid.

| <i>Khả năng lên men các nguồn đường khác nhau</i> | | | | | |
|--|---|-------------|---|----------------------|---|
| Glucose | - | Trehalose | - | Lactose | - |
| Galactose | - | Melibiose | - | Raffinose | - |
| Maltose | - | Saccharose | - | | |
| <i>Khả năng đồng hóa các hợp chất carbon khác nhau</i> | | | | | |
| 2-ketogluconic acid | w | Glucose | + | Methyl-D-glucoside | - |
| 5-ketogluconic acid | - | Glucuronate | - | N-Acetyl glucosamine | - |
| Cellobiose | + | Glycerol | + | Raffinose | + |
| Citrate | + | Inositol | - | Rhamnose | w |
| D-arabinose | w | Inulin | - | Ribitol | + |
| Erytritol | - | L-arabinose | w | Ribose | + |
| Ethanol | - | Lactate | w | Salicin | + |
| Galactirol | + | Lactose | - | Soluble starch | - |
| Galactose | - | Maltose | w | Sorbose | + |
| Galacturonic acid | - | Mannitol | + | Succinate | + |
| Glucitol | + | Melibiose | - | Saccharose | + |
| Gluconate | + | Melzitose | - | Trehalose | + |
| Glucono-lactone | + | Methanol | - | Xylose | + |

| <i>Khả năng đồng hóa các nguồn nitơ</i> | | | | | |
|--|---|---------------------|---|--------------------|---|
| Ammonium sulfate | + | Ethylamine-HCl | + | Potassium nitrate | + |
| Lysine-HCl | - | Sodium nitrate | + | Cadaverine | - |
| <i>Khả năng sử dụng các chất tăng trưởng</i> | | | | | |
| Vitamin | + | Cyclohexamide 0.01% | - | Cyclohexamide 0.1% | - |
| Glucose 50% | + | Glucose 60% | + | NaCl 10% | + |
| NaCl 16% | + | | | | |
| <i>Đặc điểm sinh hóa</i> | | | | | |
| Thủy phân urea | + | | | | |

Chú thích kí hiệu: +: Có -: Không w: Yếu

Bảng 1. 2: So sánh trọng lượng sinh khối và hàm lượng carotenoid giữa các chủng nấm men thuộc chi *Rhodotorula* trên môi trường sử dụng glucose và các phế phẩm công/nông nghiệp khác nhau làm nguồn carbon

| Chủng <i>Rhodotorula</i> | Nguồn carbon | Trọng lượng sinh khối (g/l) | Hàm lượng carotenoid (mg/g) | Hàm lượng carotenoid (mg/l) | Tác giả |
|--|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> ATCC 26085 | Glucose | | 0,206 | 1,1 | Davoli, Mierau và Weber |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> 32 | Glucose | 23,9 | 5,4 | 129,0 | Bhosale và Gadre |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> 32 | Rỉ đường mía | 78,0 | 2,36 | 183,0 | Bhosale và Gadre |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> DBVPG 3853 <i>Rhodotorula castelli</i> DBVPG 3503 | Dịch bắp | 15,3 | 0,535 | 8,20 | Buzzini |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR | Phụ phẩm đậu xanh thủy phân | 10,35 | 0,345 | 3,48 | Tinoi, Rakariyat ham và Deming |

| | | | | | |
|---|---|------|-------|------|---------------------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> 22P <i>L.helveticus</i> 12A | Whey (phụ phẩm của công nghiệp sản xuất sữa, phomat) | 30,2 | 0,268 | 8,10 | Frengov và Beshkova |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NRRL - 2502 | Rỉ đường củ cải | 4,2 | 21,20 | 89,0 | Aksu và Eren |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NRRR - 2502 | Whey (phụ phẩm của công nghiệp sản xuất sữa, phomat) | 2,4 | 29,2 | 70,0 | Aksu và Eren |

1.2.4. Môi trường nuôi cấy

Glucose luôn là nguồn carbon quan trọng cho nhiều loài vi sinh vật sinh trưởng và phát triển, trong đó có nấm men. Tuy nhiên, để tạo ra sản phẩm thương mại vừa đảm bảo chất lượng vừa đảm bảo hiệu quả kinh tế cao thì nguyên liệu đóng vai trò quan trọng, đáp ứng được các yếu tố trên chính là rỉ đường, với ưu điểm chứa 48% đến 56% đường tổng số, là nguồn carbon rẻ tiền, rỉ đường hiện nay là sự lựa chọn hàng đầu trong nghiên cứu và trong ứng dụng sản xuất công nghiệp [24]. Theo hiệp hội mía đường Việt Nam, có hơn 40 nhà máy sản xuất đường trong cả nước với lượng rỉ đường tạo ra khoảng 3 - 5% so với khối lượng mía tươi. Mỗi hecta mía hàng năm có thể thu được 1.300 kg rỉ đường tạo ra tổng khối lượng rỉ đường rất lớn trên cả nước, khoảng 3 - 5 tấn/ngày [25]. Do đó, tận dụng rỉ đường này trong nghiên cứu môi trường nuôi cấy nấm men như là một nguồn carbon thay thế nhằm sản xuất astaxanthin kinh tế và hiệu quả cao trong quy mô công nghiệp.

Rỉ đường là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất đường. Dung dịch này là một loại nước cốt được tách ra sau khi kết tinh đường. Có hai loại rỉ đường là rỉ đường mía và rỉ đường củ cải. Khoảng 75% tổng rỉ đường trên thế giới được sản xuất từ mía (*Saccharum officinarum*) và đa phần còn lại là từ củ cải đường (*Beta vulgaris*). Mía được trồng ở các nước nhiệt đới (Nam Mỹ và châu Á), trong khi củ cải đường lại trồng nhiều

ở những nước ôn đới (Châu Âu và Bắc Mỹ) [24].

Thành phần chính của rỉ đường là saccharose và một ít glucose và fructose. Rỉ đường Việt Nam có hàm lượng vật chất cao lên tới 61% - 86%, protein thô xấp xỉ 1,8% [24]. Cả hai loại rỉ đường mía và củ cải đều ở thể lỏng, có màu nâu sẫm bởi được nấu và cô lại nhiều lần tạo nên nhiều caramen và melanoid [51]. Hiện nay rỉ đường thường dùng làm cơ chất cho nhiều phương pháp lên men vì giá thành thấp và trong rỉ đường ngoài saccharose còn có nhiều hợp chất khác như hợp chất hữu cơ, chất khoáng, vitamin có giá trị cho quá trình lên men. Rỉ đường mía được dùng làm nguyên liệu trong công nghiệp lên men để sản xuất rượu, cồn, sản xuất sinh khối nấm men bánh mì, acid nitric, acid lactic, bột ngọt (mì chính) và một phần làm thức ăn gia súc [26].

Thành phần chính xác của rỉ đường rất khó dự đoán vì phụ thuộc nhiều vào điều kiện thổ nhưỡng và thời tiết, khí hậu, giống mía, tình trạng bón phân, loại đất trồng, giai đoạn thu hoạch cũng như quy trình sản xuất trong từng nhà máy [24]. Do vậy, sự biến động thành phần trong rỉ đường mía thể hiện trong sự thay đổi đáng kể về màu sắc, thành phần dinh dưỡng và độ nhớt (bảng 1.3).

Bảng 1. 3: Sự biến động của các thành phần trong rỉ đường mía [23]

| Thành phần | Trung bình (%) | Biến động (%) |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------|
| Nước | 20 | 17 - 25 |
| Saccharose | 35 | 30 - 40 |
| Glucose | 7 | 4 - 9 |
| Fructose | 9 | 5 - 12 |
| Các chất khử khác | 3 | 1 - 5 |
| Các glucid khác | 4 | 2 - 5 |
| Khoáng | 12 | 7 - 15 |
| Các chất chứa N | 4,5 | 2 - 6 |
| Các acid không chứa N | 5 | 2 - 8 |
| Sáp, sterol và phospholipit | 0,4 | 0,1 - 1 |
| Sắc tố | - | |
| Vitamin | - | |

Thành phần tiêu chuẩn của rỉ đường mía thường chia thành 4 thành phần chính: Đường, chất hữu cơ không có đường, chất khoáng và chất sinh trưởng [22]. Rỉ đường mía có hàm lượng nước trung bình 20%. Pha loãng rỉ đường với nước một phần khi xử

lý ri đường làm môi trường nuôi cấy để hòa tan các tinh thể đường có kích thước nhỏ và chủ yếu làm giảm độ sánh của ri đường, để làm môi trường nuôi cấy.

❖ Đường

Các loại glucid hòa tan như đường đôi và đường đơn là các thành phần dinh dưỡng chính của ri đường. Trong đó, đường saccharose là chủ yếu. Hàm lượng các loại đường trong ri đường mía cũng khác nhau giữa nguồn ri đường thủ công và công nghiệp (bảng 1.4) [23].

Bảng 1. 4: Hàm lượng các loại đường trong ri đường mía Việt Nam thủ công và công nghiệp.

| Thành phần | Thủ công | Công nghiệp |
|-------------------------|------------|-------------|
| Đường khử (%) | 33,9 ± 2,5 | 39,0 ± 3,0 |
| Saccharose (g/100g VCK) | 20,4 ± 2,5 | 21,6 ± 2,6 |
| Glucose (g/100g VCK) | 9,3 ± 1,0 | 8,7 ± 1,0 |
| Fructose (g/100g VCK) | 4,2 ± 0,7 | 8,47 ± 0,1 |

VCK: Vật chất khô

❖ Chất hữu cơ không phải là đường

Độ nhớt dính quyết định nhiều tính chất vật lý của ri đường. Nó bao gồm chủ yếu các hợp chất chứa nitơ và các acid hữu cơ (chủ yếu là acid acotinic. Ri đường không chứa chất xơ và lipid. Tỷ lệ protein thô trong ri đường mía là thấp nhất (1-5%) [15], [58]. Bảng 1.5 cho thấy hàm lượng các thành phần chứa nitơ trong ri đường mía.

Bảng 1. 5: Hàm lượng các thành phần chứa nitơ trong ri đường mía [58].

| Thành phần chứa N | Hàm lượng (%) |
|-------------------------------|---------------|
| Protein – N | 4 |
| Amino – N (acid glutamic – N) | 32 |
| Betaine | 63 |
| Amide – N | 1 |
| Ammonia – N | |
| Nitrate – N | |

❖ Chất khoáng

Ri đường mía là một nguồn giàu khoáng, muối kali có nhiều trong ri đường tiếp đến là lưu huỳnh và canxi. Giải thích điều này là do muối kali được dùng để bón cho mía còn muối canxi và gốc sunfat được thêm vào giai đoạn xử lý nước mía và đường

tin cậy. Hàm lượng canxi trong rỉ đường cao, trong khi đó thì hàm lượng phosphate lại thấp. Chính bởi vì hàm lượng Ca^{2+} cao (0,5 - 1,2%), gây ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy: Ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật, ảnh hưởng pH của cơ chất, liên quan đến bất hoạt của enzyme và quá trình sinh tổng hợp sản phẩm [4]. Do vậy cần loại bỏ Ca^{2+} trong rỉ đường trước khi đưa vào môi trường nuôi cấy nấm men. Việc sử dụng H_2SO_4 để xử lý rỉ đường trước khi dùng làm môi trường nuôi cấy có tác dụng là gốc SO_4^{2-} sẽ phản ứng với Ca^{2+} để tạo muối CaSO_4 dạng ít tan và có thể loại bỏ khỏi dung dịch rỉ đường bằng cách ly tâm hay lọc qua giấy lọc [3]. Rỉ đường mía giàu natri, magie, lưu huỳnh và cũng chứa một lượng đáng kể các thành phần nguyên tố vi lượng (bảng 1.6) [17], [56].

Bảng 1. 6: Hàm lượng các nguyên tố khoáng có trong rỉ đường mía Việt Nam thủ công và công nghiệp [56]

| Thành phần | Thủ công | Công nghiệp |
|----------------------------|-----------------|--------------------|
| Khoáng (g/100g VCK) | $5,4 \pm 1,1$ | $6,2 \pm 1,2$ |
| Canxi (Ca) (g/100g VCK) | $0,14 \pm 0,04$ | $0,44 \pm 0,08$ |
| Magie (Mg) (g/100g VCK) | $0,13 \pm 0,01$ | $0,18 \pm 0,02$ |
| Kali (K) (g/100g VCK) | $0,81 \pm 0,11$ | $0,92 \pm 0,17$ |
| Phospho (P) (mg/100g VCK) | 60 ± 4 | 30 ± 9 |
| Natri (Na) (mg/100g VCK) | 764 ± 137 | 75 ± 22 |
| Lưu huỳnh (S) (g/100g VCK) | $0,17 \pm 0,02$ | $0,33 \pm 0,01$ |
| Đồng (Cu) (mg/kg VCK) | $0,96 \pm 0,11$ | $3,01 \pm 0,71$ |
| Sắt (Fe) (mg/kg VCK) | 164 ± 29 | 417 ± 152 |
| Mangan (Mn) (mg/kg VCK) | 23 ± 6 | 52 ± 8 |
| Kẽm (Zn) (mg/kg VCK) | $9,5 \pm 2,0$ | $12,6 \pm 1,4$ |

❖ Thành phần các chất sinh trưởng

Dựa vào sự khác nhau của chức năng sinh lý và cấu trúc hóa học của những nhân tố sinh trưởng, có thể chia nhân tố sinh trưởng thành các nhóm acid amin, purin, vitamin và pyrimidine. Vitamin chủ yếu cofactor hay coenzyme của các enzyme tham gia trong quá trình trao đổi chất. Pyrimidine và Purin chủ yếu dùng làm coenzyme hay cofactor của các enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp nucleoside, nucleotid và acid nucleic.

❖ Vitamin

Rỉ đường mía giàu các chất sinh trưởng như: Patotenic, nicotinic, acid folic, B1, B2 đặc biệt là chất biotin (bảng 1.7). Đặc biệt chú ý trong rỉ đường mía, lượng biotin nhiều gấp 20 lần so với rỉ đường củ cải đồng thời đáp ứng nhu cầu biotin của nấm men.

Bảng 1. 7: Thành phần một số chất sinh trưởng của rỉ đường mía

| Loại chất sinh trưởng | Hàm lượng trong rỉ đường mía ($\mu\text{g}/100\text{g}$) | |
|-----------------------|--|-------|
| | Mexico | Cuba |
| B1 (Thiamin) | 140,000 | - |
| B2 (Riboflavin) | - | - |
| B6 (Pyrydoxin) | 700,000 | - |
| Acid nicotic | - | - |
| B5 (Acid pantotenic) | 12,000 | - |
| Acid folic | - | - |
| Vitamin H (Biotin) | 65,000 | 10,80 |

❖ Acid amin

Các acid amin của rỉ đường với số lượng lớn như: Acid glutamic, leucine, isoleucine, alanine, acid aspartic, glycocystin, serine, lysine, arginine, histidine, methionine, threonine, tryptophan tất cả đều là đơn vị cấu thành protein [58]. Bảng 1.8 trình bày hàm lượng các acid amin có trong rỉ đường .

Bảng 1. 8: Hàm lượng các acid amin trong rỉ đường [53]

| Acid amin | Hàm lượng (%) |
|-----------------------------|---------------|
| Acid glutamic | 4,17 |
| Leucine – Isoleucine | 0,55 |
| Acid aspartic | 0,37 |
| Glycocol | 0,30 |
| Valine | 0,30 |
| Acid γ -aminobutyric | 0,30 |
| Alanine | 0,28 |
| Tyrosine | 0,21 |
| Proline | 0,11 |
| Phenylalanine | 0,09 |

| Acid amin | Hàm lượng (%) |
|------------------|----------------------|
| Cysteine | 0,05 |
| Serine | 0,05 |
| Lysine | 0,03 |
| Arginine | 0,03 |
| Histidine | 0,03 |
| Tổng cộng | 6,87 |

❖ Urea

Nguồn nitơ dễ hấp thu nhất đối với vi sinh vật là NH_3 và NH_4^+ . Sau khi đồng hóa, gốc NH_4^+ trong môi trường sẽ được tích lũy các anion vô cơ SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Cl^- làm hạ thấp pH môi trường. Bên cạnh các nguồn cung cấp nitơ như: Amoniac, nitrat, nitrit, urea có thể được sử dụng như là nguồn bổ sung nitơ vào môi trường nuôi cấy. Urea [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] là hợp chất có trọng lượng nhỏ và phân cực, không tan trong lipid và khá phổ biến trong tự nhiên. Urea là nguồn nitơ trung tính về mặt sinh lý và hợp chất hữu cơ này có thể coi như một nguồn kết hợp của nitơ và carbon với chức năng đa dạng. Trong sinh vật có chứa urease là một metalloenzyme có tâm hoạt động là nguyên tử niken có trong vi khuẩn, nấm và thực vật, chuyển hóa urea thành CO_2 và amoniac giúp vi sinh vật dễ dàng hấp thu và chuyển hóa. Mặt khác urease còn giúp các vi sinh vật ứng phó lại với môi trường acid bất lợi [27].

❖ Muối vô cơ

Đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật các muối vô cơ là nguồn chất dinh dưỡng không thể thiếu. Chúng có chức năng sinh lý chủ yếu như là: tham gia vào thành phần cấu tạo các đại phân tử sinh học quan trọng, thành phần trung tâm hoạt động các enzyme của vi sinh vật, duy trì và điều tiết cân bằng áp suất thẩm thấu của tế bào, duy trì tính ổn định của kết cấu tế bào và các đại phân tử, khống chế điện thế oxy hóa khử của tế bào và là nguồn vật chất sinh năng lượng [14]. Bảng 1.9 liệt kê một số muối vô cơ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và vai trò của chúng.

Bảng 1. 9: Muối vô cơ và chức năng sinh lý của chúng [14], [26].

| Nguyên tố | Hợp chất sử dụng | Chức năng sinh lý |
|-----------|---|---|
| P | KH_2PO_4 , K_2HPO_4 | Thành phần cấu tạo của protein, enzyme, acid nucleic, nucleoprotein, ATP, coenzyme, v.v. tạo nên hệ thống đệm để điều chỉnh pH môi trường. |
| S | MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Tham gia cấu tạo protein, các hệ enzyme, thành phần của các acid amin chứa S như cysteine. |
| Mg | MgSO_4 | Thành phần các hệ enzyme quan trọng trong tế bào như trung tâm hoạt động của enzyme phosphoryl hóa hexose, enzyme polymerase của acid nucleic, cấu trúc tế bào và bào quan. |
| K | KH_2PO_4 , K_2HPO_4 | Tham gia vào quá trình trao đổi chất nhất là quá trình chuyển hóa các hợp chất glucid, cân bằng ion, hoạt động của enzyme. |

1.3. Phương pháp phá vách tế bào nấm men

1.3.1. Cấu trúc vách tế bào nấm men

Vách tế bào nấm men nhòn, trong suốt, dày khoảng 100 đến 200 nm, gồm 3 lớp có cấu tạo khác nhau: vách ngoài cùng có cấu tạo chủ yếu là lyoporotein, lớp giữa và lớp trong chủ yếu 90% là hợp chất mannam và glucan, phần còn lại là protein, glucozamin và lipit, chitin. Mannan là hợp chất cao phân tử của D-Mannose còn Glucan là của D-glucose. Vách tế bào có chức năng bảo vệ và định hình tế bào, duy trì áp suất thẩm thấu, v.v. vì vậy cấu trúc tế bào khá dày và cứng.

Trên vách tế bào có nhiều lỗ, thông qua vị trí này các chất dinh dưỡng được hấp thu vào và các sản phẩm trao đổi chất được thải ra.

1.3.2. Phá vách tế bào nấm men

Các thành phần bên trong tế bào được ngăn cách với môi trường bên ngoài bởi một cấu trúc vững chắc gọi là màng tế bào. Màng này cung cấp một sức mạnh cơ học cho tế bào và bảo vệ tế bào khỏi những tác động bên ngoài. Khả năng co giãn của tế bào giúp chống lại với áp suất thẩm thấu ở bên ngoài tế bào.

Về mặt ứng dụng những vật chất sinh học như protein, acid amin, enzyme được chiết rút từ tế bào và được tinh sạch để phục vụ trong nghiên cứu sinh học hoặc sử dụng cho các ngành công nghiệp thực phẩm, v.v., thì trước hết chúng phải được giải phóng đi

ra khỏi tế bào. Như vậy việc phá vỡ tế bào là bước đầu tiên cho sự thu nhận các sản phẩm nội bào, cung cấp cho những quy trình tiếp theo. Đó cũng chính là bước khá quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm.

Như vậy mục đích của việc phá vỡ tế bào là:

✓ *Thu nhận một lượng lớn sản phẩm nội bào mong muốn nhưng vẫn duy trì hoạt tính của sản phẩm ở mức độ cao nhất.*

✓ *Tránh gây biến tính sản phẩm.*

✓ *Hạn chế được những hậu quả bất lợi trong quá trình chiết xuất có thể ảnh hưởng đến những bước tiếp theo.*

Các phương pháp cơ học:

✓ *Nghiền tế bào bằng chày và cối với bột thủy tinh, cát thạch anh, v.v.*

✓ *Đồng nhất mẫu.*

✓ *Phá tế bào bằng áp lực cao.*

✓ *Phương pháp hóa học:*

✓ *Sử dụng chất tẩy.*

✓ *Sử dụng dung môi hữu cơ như toluene, benzene, v.v.*

1.3.3. Nghiền cơ học

Nguyên tắc: Phương pháp này sử dụng chày và cối để nghiền mẫu, có thể trộn thêm vụn thủy tinh, cát, v.v., để làm tăng hiệu suất phá vỡ tế bào. Sự phá vỡ vách tế bào xảy ra do sự nghiền ép của các hạt nghiền khi chúng cọ xát với tế bào. Nếu so sánh với những phương pháp áp lực cao thì lực xé trong phương pháp nghiền thô sơ này thấp hơn. Phương pháp này có thể thu được màng tế bào và các bào quan một cách nguyên vẹn.

Phương pháp này được sử dụng từ lâu để phá vỡ tế bào vi sinh vật. Đây cũng là phương pháp lựa chọn đầu tiên khi cần phá vỡ bào tử, tế bào nấm men, tế bào nấm, nó cũng được dùng để phá tế bào vi tảo. Gần đây, phương pháp này còn sử dụng đối với mẫu đất, mẫu thực vật và mô động vật.

Kích thước hạt nghiền cũng rất quan trọng, qua một số nghiên cứu, người ta thấy rằng kích thước hạt nghiền tối ưu cho vi khuẩn là 0,1 mm, 0,5 mm đối với nấm men, nấm sợi, vi tảo và những tế bào động vật đơn bào như Leucocytes, 1 – 2,5 mm dành cho các mô như mô não, mô cơ, gan và da.

Tốc độ phá tế bào sẽ tăng 50% nếu sử dụng hạt nghiền là zirconium thay vì dùng hạt thủy tinh, vì do tỷ trọng của chúng nặng hơn. Đối với các loại mô dai, cần sử dụng các hạt nghiền làm từ hỗn hợp chrom – thép, và tỷ trọng của chúng nặng hơn thủy tinh 5 lần.

Thông thường lượng hạt nghiền tỷ lệ thuận với tốc độ phá tế bào.

Đây là phương pháp thô sơ nhất trong các phương pháp phá vỡ tế bào.

Phương pháp này có một số bất lợi sau:

- ✓ *Hiệu suất không cao.*
- ✓ *Hạn chế đối với khối lượng mẫu lớn.*
- ✓ *Gặp vấn đề về bọt và nhiệt độ.*

Hiện nay những thiết bị nghiền đã được cải tiến hơn, tinh vi hơn làm tăng hiệu suất phá vỡ tế bào và giảm tối đa nhiệt độ phát sinh.

1.3.4. Phương pháp phá màng sử dụng dung môi hữu cơ

Nguyên tắc: Những hợp chất ưa lipid (17oluene, ether, methanol, DMSO, v.v.) có khả năng tạo liên kết kỵ nước với lớp đôi phospholipid của màng tế bào. Sự gắn kết này làm giãn nở màng, làm biến đổi tính lỏng của màng, thậm chí có thể dẫn đến sự trương phồng của lớp đôi phospholipid. Hơn nữa, sự chèn vào của các dung môi này phá vỡ tương tác giữa lipid và protein, làm ảnh hưởng đến chức năng của màng sinh học.

Các nghiên cứu trong và ngoài nước:

Tobias Von der Haar (United Kingdom) phá tế bào bằng cách ngâm trong NaOH có chứa 2-ecraptoethanol và SDS để thu protein.

1.3.5. Phương pháp phá màng sử dụng enzyme

Enzyme hoạt động thông qua việc tấn công, thủy phân và phá vỡ những liên kết glycosidic trong trở thành peptidoglycan. Enzyme này đồng thời cũng có thể phá vỡ những liên kết glycosidic trong chitin

Cellulase có thể "phá vỡ" phân tử cellulose thành các monosaccharide ("đường đơn") như beta-glucose, hoặc thành các polysaccharide ngắn hơn và oligosaccharide.

1.4. Tổng quan về astaxanthin và hoạt tính sinh học

Astaxanthin trong thương mại được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa dầu (trên 95%), nhưng hiện nay, tảo đỏ *Haematococcus pluvialis* đang đem đến triển vọng trong sản xuất công nghệ sinh học để tạo ra astaxanthin với hiệu suất cao. Astaxanthin được ứng dụng ở nhiều lĩnh vực khác nhau như: NTTS, dinh dưỡng, thực phẩm, dược

và mỹ phẩm. Trong lĩnh vực dược phẩm, astaxanthin được chú ý của giới khoa học bởi các tác dụng dược lý quan trọng tiềm năng như: chống kháng đái tháo đường, ung thư, kháng viêm, và chống oxy hóa đồng thời tác dụng lên hệ thống thần kinh, tim mạch, mắt và đặc biệt các bệnh về da.

Astaxanthin được chứng minh đem đến nhiều lợi ích trong lĩnh vực làm đẹp như bảo vệ da khỏi tác hại tia UV, chống oxy hóa, kháng viêm, chống lão hóa.

Trong nghiên cứu kéo dài hơn 2 thập kỷ đã nhận ra rằng, hiện tượng stress oxy hóa liên tục dẫn đến viêm mạn tính, tạo ra các tổn thương như thoái hóa thần kinh, hủy hoại cấu trúc da và ung thư. Ở da, khi tiếp xúc với tia UV, các tế bào sừng phản ứng lại bằng cách phóng thích các chất trung gian tiền viêm. Nghiên cứu nhận thấy rằng, astaxanthin có khả năng chống viêm do tia tử ngoại bằng cách ức chế sản xuất các yếu tố tiền viêm, cytokin và sự chết tế bào sừng. Astaxanthin làm giảm đáng kể nồng độ oxid nitrit (iNOS), men cyclooxygenase (COX-2) cũng như giảm sự phóng thích prostaglandin E2 từ tế bào sừng sau khi tiếp xúc với tia UV

Astaxanthin có mặt trong một số loại hải sản, cá hồi, tôm hùm, v.v. với hàm lượng ở một số loài như sau:

- *Nhuễn thể* : 120 ppm (một phần triệu).
- *Tôm* : 1.200 ppm.
- *Nấm men* : 10.000 ppm.
- *Haematococcus pluvialis* : 40.000 ppm.

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) là một carotenoid thuộc nhóm xanthophyll có liên quan chặt chẽ với β -carotene, lycopene, zeaxanthin vì có liên quan đến nhau trong con đường sinh tổng hợp và đều mang những đặc tính sinh học của carotenoid. Carotenoid là họ sắc tố với hơn 600 sắc tố được tổng hợp trong thực vật bậc cao, tảo, vi khuẩn và nấm, được phân thành hai nhóm quan trọng nhất là: Nhóm chỉ chứa carbon và hydrogen và nhóm xanthophyll (dẫn xuất oxy). Trong nhóm xanthophyll, các phân tử có thể chỉ chứa nhóm chức hydroxyl (-OH) như zeaxanthin, hoặc chứa liên với nguyên tử oxy như anthaxanthin hoặc kết hợp cả hai (astaxanthin) [40], [60].

1.4.1. Tính chất vật lý – hóa học của astaxanthin

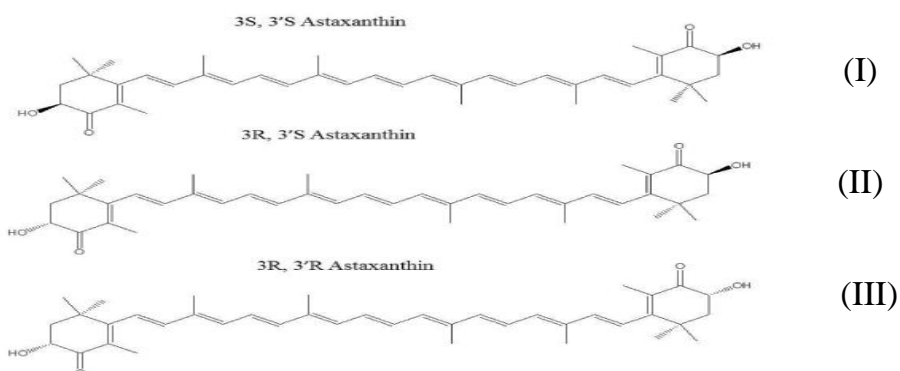
Astaxanthin có một số tính chất cơ bản được trình bày như ở Bảng 1.1

Bảng 1. 10: Một số tính chất vật lý cơ bản của astaxanthin

| | | |
|--|--|------|
| Công thức phân tử | $C_{40}H_{52}O_4$ | |
| Khối lượng phân tử | 596,86 đvC | [33] |
| Nhiệt độ nóng chảy | 216 °C (421 °F, 489 K) | |
| Nhiệt độ sôi | 774°C (1425 °F, 1047 K) | |
| Tính tan | Không tan trong nước và dung môi hữu cơ phân cực | [28] |
| | Hòa tan được trong dung môi như dichloromethane, chloroform, acetone, dimethylsulfoxide và các dung môi không phân cực | |
| Tinh thể | Hình kim màu đỏ | |
| Rf của astaxanthin chuẩn (hãng Chromadex) | 0,22 | |
| Bước sóng hấp thụ cực đại (tùy dung môi hòa tan astaxanthin) | 468 nm, 477 nm, 485 nm | |

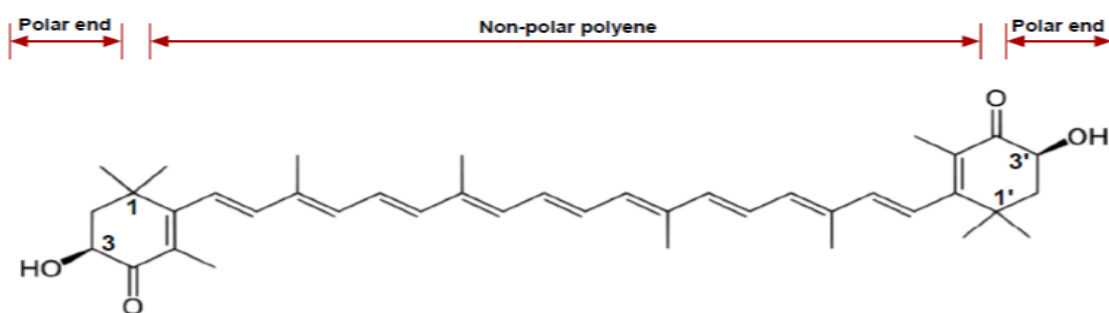
Sự hiện diện của nhóm hydroxyl và nhóm keto gắn trên mỗi vòng ionone (Hình 1.1) giúp giải thích một số đặc tính của astaxanthin như khả năng bị este hóa, đặc tính kháng oxy hóa cũng như có độ phân cực cao hơn các carotenoid khác. Ngoài ra dạng este hóa của astaxanthin trong tự nhiên giúp nó ổn định và giữ được tác dụng sinh học cao hơn.

Thành phần astaxanthin khác nhau giữa các nguồn thu nhận là do sự khác nhau về thành phần các dạng đồng phân của astaxanthin. Astaxanthin có ba dạng đồng phân lập thể: (3R, 3'R), (3S, 3'S), (3R, 3'S) phụ thuộc vào sự định hướng trong không gian của nhóm hydroxyl tại tâm carbon ở vị trí 3 và 3'[38].



Hình 1. 4: Các dạng đồng phân của astaxanthin [38]

Giống như hầu hết các carotenoid, astaxanthin thuộc nhóm tetraterpene ưa béo, được cấu tạo bởi tám đơn vị isoprene (C₅). Bộ khung cacbon đối xứng có nguồn gốc từ lycopene mạch hở, các cấu trúc tiền thân của carotenoid, 40 nguyên tử cacbon sắp xếp trong một chuỗi các liên kết đôi liên hợp. Nhiều carotenoid có cấu trúc hai vòng ở đầu và cuối. Trong phân tử astaxanthin mỗi vòng mang một nhóm 3-hydroxyl (OH), và 4-ketone (C=O). Do hai trung tâm bất đối xứng ở vị trí cacbon 3 và 3' trong mỗi vòng, astaxanthin có thể tồn tại được ở ba dạng lập thể khác nhau (3R, 3'R), (3S, 3'S) (hai dạng đối lập nhau) và (3R, 3'S) (dạng trung gian) (Hình 1.1). Các đồng phân (3S, 3'S) là dạng phổ biến ở tự nhiên được tìm thấy trong *H. pluvialis* và cá hồi trong tự nhiên. Đáng chú ý, *P. rhodozyma* sinh tổng hợp astaxanthin có cấu hình (3R, 3'R) đây là nguồn tự nhiên duy nhất cho đến nay tồn tại dạng đồng phân lập thể này [20].



Hình 1. 5: Phân tử trans-astaxanthin với các đầu phân cực [20], [69]

Astaxanthin gồm 2 dạng đồng phân hình học là cis và trans nhờ liên kết đôi trong chuỗi polyene. Tuy gần giống với các carotenoid nhưng astaxanthin còn có nhóm 3-hydroxyl và 4-ketone trên cả hai vòng ở hai đầu nên có những thuộc tính riêng như dễ tan hơn carotenoid và kháng oxy hóa mạnh hơn [42]. Dẫn đến kiểu cấu trúc polar-nonpolar-polar đặc trưng cho phân tử astaxanthin là chuỗi polyene không phân cực (non polar) nối giữa hai đầu phân cực (polar). Kiểu cấu trúc này cho phép các phân tử xuyên

qua lớp phospholipid trên màng tế bào và để lộ hai đầu ưa nước ra môi trường bên ngoài (Hình 1.2), [69]. Nhờ đặc điểm cấu trúc như vậy, astaxanthin không chỉ có khả năng kháng oxy hóa mạnh mẽ mà hoạt tính sinh học của nó trong mô, tế bào cũng cao hơn hẳn các carotenoid thông thường khác.

Về dạng tồn tại trong tự nhiên, astaxanthin có thể tồn tại ở nhiều dạng: dạng tự do hoặc dạng phức hợp với protein hoặc lipid. Dạng astaxanthin tự do rất nhạy cảm với các gốc oxy hóa. Vì vậy, trong tự nhiên, astaxanthin thường tồn tại ở dạng phức hợp với protein như trong exoskeleton ở giáp xác, hoặc dạng este hóa với các acid béo nhằm tăng cường tính hòa tan được và ổn định của astaxanthin trong tế bào [40], [69]. Môi trường lưu trữ astaxanthin cũng có thể làm thay đổi tính ổn định của phân tử này. Astaxanthin ổn định ở 70°C - 90°C trong cám gạo, dầu gừng và dầu cọ với 80 - 90% hàm lượng astaxanthin được giữ lại và có thể được sử dụng trong thực phẩm, dược phẩm và dinh dưỡng, trong khi hàm lượng astaxanthin giảm ở 120°C và 150°C [58].

1.4.2. Hoạt tính sinh học của astaxanthin

Astaxanthin (ASX) là chất chống oxy hóa mạnh. Dựa vào cấu trúc phân tử ổn định cao nên có thể trung hòa được nhiều gốc tự do. Bên cạnh đó, Astaxanthin còn tham gia kích hoạt enzyme chống oxy hóa của tế bào nên rất phù hợp đóng vai trò hoạt chất ngăn ngừa sự lão hóa do UV. Ngoài ra, Astaxanthin còn có khả năng len lỏi qua màng tế bào, nhân giúp bảo vệ màng tế bào khỏi các tác nhân ROS, không có tính chất prooxidation, sử dụng an toàn trên người.

1.4.2.1. Tác dụng kháng oxy hóa

Trong cơ thể, các gốc tự do được sinh ra khi oxy kết hợp với các phân tử trong quá trình trao đổi chất. Các gốc tự do thường làm cho phân tử mang nó không ổn định và dễ dàng phản ứng và phá hủy cấu trúc khác của tế bào. Khi các gốc này phản ứng được gọi là “quá trình oxy hóa”. Khi quá trình oxy hóa bắt đầu, nó có thể tạo ra một phản ứng dây chuyền và tiếp tục tạo ra các gốc tự do nhiều hơn. Các gốc tự do như superoxide (O_2^*), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl (OH^*), và anion peroxynitrite ($ONOO^-$) gây tổn thương cho các thành tế bào, làm suy yếu hoặc có thể phá hủy các tế bào và DNA trong tế bào. Đây là những nguyên nhân gây ra sự lão hóa, rối loạn hoạt động của tế bào, làm suy yếu hệ miễn dịch hay hình thành các dòng tế bào ung thư.

Các gốc tự do cần phải được vô hiệu hóa để duy trì chức năng thích hợp của tế bào và để bảo vệ các tế bào khỏi sự suy thoái và lão hóa. Trong khẩu phần ăn hằng ngày

chúng ta cũng đã tiếp tục cung cấp các chất chống oxy hóa như cà chua, cam quýt, nho, rượu vang, các loại thực phẩm khác. Nhưng trong một số trường hợp bệnh lý, hoạt động thể chất hay stress do tác động của môi trường có thể tạo ra nhiều gốc tự do mà ta không thể ăn một lượng lớn các thực phẩm có chứa chất chống oxy hóa có hàm lượng và hoạt tính không cao, vì vậy chúng ta cần các chất có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn [51].

Một trong các chất có hoạt tính chống oxy hóa hiệu quả là astaxanthin, vì astaxanthin có đặc điểm là mang các nhóm hydroxyl và nhóm ketone chức năng nên nó có hoạt tính cao hơn so với các chất có hoạt tính chống oxy hóa khác. Hussein và cộng sự (2006) đã mô tả tác dụng bảo vệ của astaxanthin trên bệnh loét vị dạ dày ở chuột kèm theo tác dụng đáng kể của astaxanthin trong hoạt động bắt gốc tự do [38]. Theo nghiên cứu thực tế thì astaxanthin có hoạt tính cao hơn gấp 65 lần so với vitamin C, hơn 500 lần với vitamin E và 11 lần hiệu quả hơn beta-carotene cho nên astaxanthin còn được gọi là một “siêu vitamin E” [32].

1.4.2.2. Tác dụng kháng ung thư

Nghiên cứu ung thư gan di căn gây ra bởi sự stress lâu dài quá mức ở chuột, kết quả nghiên cứu cho thấy astaxanthin ức chế sự stress gây ra sự peroxide hóa lipid. Nghiên cứu của Leung và Bertram (2005) trên người và các tế bào động vật đã chứng minh rằng protein connexin 43 (Cx43) - loại connexin hiện diện nhiều nhất trong các mô, điều hòa các tín hiệu và protein nhờ các retinoid, carotenoid và giảm sự phát triển của khối u. Sự kết hợp của astaxanthin và retinoid làm tăng biểu hiện protein Cx43 và tăng việc kết nối các thông tin liên lạc giữa các tế bào [38].

1.4.2.3. Tác dụng kháng viêm

Nghiên cứu về astaxanthin *in vitro* và *ex vivo* của Lee và cộng sự (2003) đã chỉ ra rằng astaxanthin có thể ngăn chặn quá trình viêm bằng cách ngăn chặn sự biểu hiện của gene tiền viêm (pro-inflammatory), kết quả là làm ức chế yếu tố nhân kappaB. Hiệu quả của 100mg/kg astaxanthin tương đương với hiệu quả 10 mg/kg prednisolone, prednisolone là một loại thuốc kháng viêm nhóm corticosteroid [38], [65].

1.4.2.4. Tác dụng kháng khuẩn

Thí nghiệm của Uma và cộng sự, (2013) cũng cho thấy astaxanthin có hiệu quả chống lại vi khuẩn gram âm và gram dương khi so sánh với kháng sinh chloramphenicol [67].

Theo nghiên cứu Suganya V và S.T.Asheeba (2015) cũng cho thấy hoạt tính kháng

khuẩn của astaxanthin thu nhận từ 3 loài cua *Portunus sanguinolentus* (Three Spotted Crab), *Callinectes sapidus* (Blue Crab) và *Paralithodes brevipes* (Spiny King Crab) và astaxanthin chuẩn kháng lại vi khuẩn (*E.coli*) từ sữa và thịt thối. Các sắc tố astaxanthin đã được tìm thấy có hiệu quả kháng khuẩn tại nồng độ 50 µg, có đường kính kháng khuẩn là $10,05 \pm 0,53$ mm đến $12,11 \pm 0,95$ mm. Nghiên cứu chỉ ra rằng astaxanthin được phân lập từ ba giống cua có tiềm năng chống oxy hoá và hoạt tính kháng khuẩn có thể được sử dụng trong thực phẩm và dược phẩm [66].

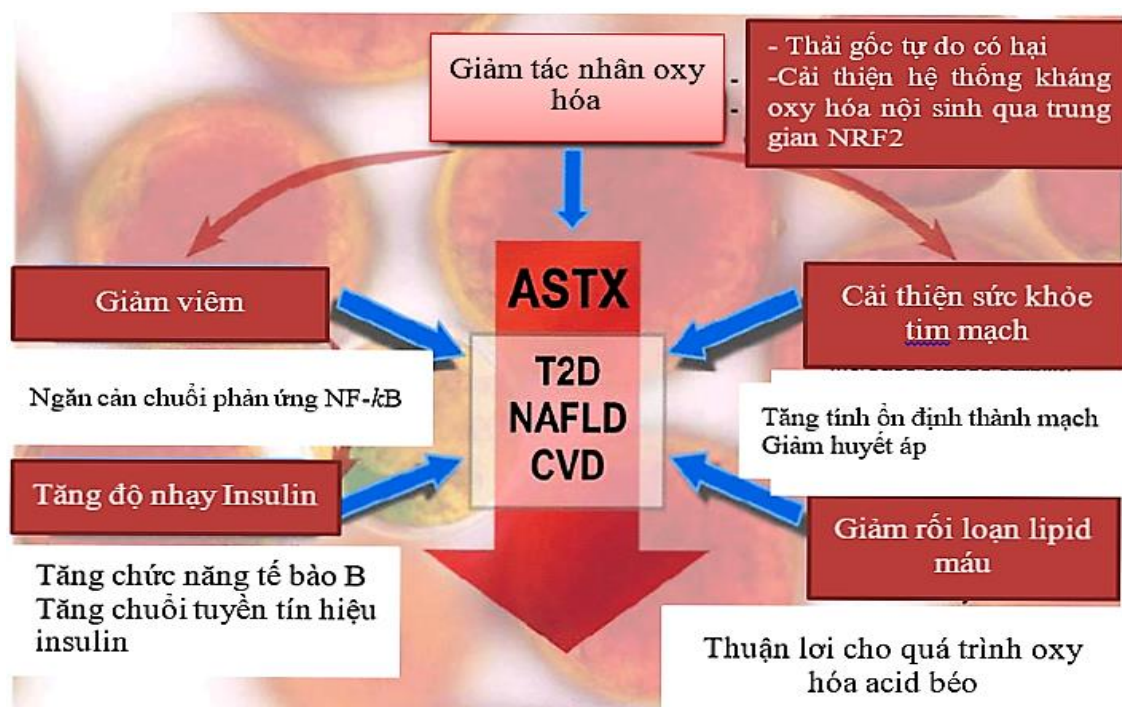
1.4.2.5. Một số tác dụng tích cực khác của astaxanthin đối với sức khỏe con người

Theo dõi thử nghiệm miễn dịch và kiểm tra tuberculin ở nhóm nữ tình nguyện viên cho bổ sung astaxanthin vào bữa ăn và nhóm dùng giả dược để đối chứng. Kết quả cho thấy bổ sung astaxanthin vào bữa ăn đối với phụ nữ trẻ tuổi giúp giảm nhân tố có hại DNA và protein giai đoạn cấp tính, đồng thời tăng phản ứng miễn dịch [42].

Hơn nữa, trong một mô hình màng tế bào trong ống nghiệm, astaxanthin duy trì tính toàn vẹn của màng và ức chế có hiệu quả peroxide lipid, trong khi lutein và β -carotene phá vỡ cấu trúc màng tế bào và tăng mức độ hydroperoxides lipid.

Tiềm năng của astaxanthin một phần do cấu trúc hóa học độc đáo của nó. Là một carotenoid, nó có thể bắt lấy các nguyên tử oxy hoạt động và đưa nó dọc theo chuỗi liên kết đôi polyene, vì thế chấm dứt các phản ứng [50].

Sử dụng astaxanthin có thể cung cấp những hiệu ứng có lợi cho sức khỏe bằng cách ngăn chặn sự oxy hóa thông qua sự kích hoạt của hệ thống kháng oxy hóa nội sinh qua trung gian NRF2; ức chế viêm bằng cách ngăn cản chuỗi phản ứng NF-kB và ức chế sản xuất cytokine; tăng độ nhạy insulin; ức chế rối loạn lipid máu; và cải thiện sức khỏe tim mạch, v.v. [69].



Hình 1. 6: Tóm tắt các tác động của astaxanthin trong phòng, chống các bệnh chuyển hóa và cơ chế cơ bản. ASTX: Astaxanthin; T2D: Bệnh tiểu đường type 2; NAFLD: Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu; Bệnh tim mạch [71]

Astaxanthin trong phòng chống bệnh: cải thiện sức khỏe tim mạch làm tăng tính ổn định thành mạch giảm huyết áp, giảm rối loạn lipid máu, thuận lợi cho quá trình oxy hóa acid béo. Giảm viêm thì astaxanthin giúp ngăn ngừa chuỗi phản ứng NF-*k*B, tăng chức năng tế bào B, tăng chuỗi tín hiệu insulin, v.v.

Liều khuyến cáo ở trong khoảng từ 4-12mg mỗi căn cứ theo tác dụng mong muốn. Với 4mg mỗi ngày có tác dụng tích cực làm giảm viêm và 12mg mỗi ngày dành cho người cần chất chống oxy hóa cao hơn.

1.5. Tình hình nghiên cứu về tảo *Haematococcus pluvialis*

1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Từ đầu những năm 90 của thế kỷ trước, *H. pluvialis* đã được nuôi thương mại hóa trong hệ thống bể hở dung tích 30.000 - 1.000.000 lít (Johnson và An, 1991). Bubrick cũng đã thiết kế hệ thống bể nuôi theo tiêu chuẩn của bể raceway có guồng trên diện tích 38.000m² để nuôi thương mại loài vi tảo này. Tuy nhiên, chúng rất dễ bị nhiễm tạp và bị lấn át do sinh trưởng nhanh chóng của các loài tảo nhiễm khác như *Chlorella* và các loài ăn tảo khác. Bên cạnh đó, trong điều kiện nuôi như vậy, loài vi tảo này giữ nguyên trạng thái sinh dưỡng cho đến khi được thu hoạch (Gong, 1997). Đây là những hạn chế rất lớn của việc nuôi loài vi

tảo này trong hệ thống bể hở để thu astaxanthin. Nhóm tác giả ở Tây Ban Nha và Nhật Bản nghiên cứu từ khá lâu, từ năm 2000 trở lại đây, và đã được thương mại hóa các mô hình nuôi loài vi tảo này. *Haematococcus pluvialis* đã được nuôi trồng ở quy mô thương mại để làm thực phẩm chức năng ở Cyanotec corporation USA, Mera pharmaceuticals Inc USA. Theo FAO (2010), hàng năm, khối lượng sinh khối khô của *H. pluvialis* đạt khoảng 300 tấn, chủ yếu từ Hoa Kỳ, Ấn Độ và Israel cung cấp cho nuôi trồng thủy sản là 50 €/L và cho sản xuất astaxanthin là 7.150 €/kg. Các sản phẩm chứa astaxanthin được sản xuất từ loài vi tảo này của các công ty ParryPharmaceuticals (India), AlgaTechnologies (Israel) có giá 10.000 USD/kg. Ở Trung Quốc, loài vi tảo này được dùng để sản xuất astaxanthin lớn nhất ở Giang Châu, tỉnh Hồ Bắc (Lovatelli và Chen, 2009).

Trong nghiên cứu của Fábregas và cs., (1988), *H. pluvialis* được nuôi ở môi trường thiếu hụt nitơ và magie với điều kiện thiếu ánh sáng 40 và 230 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$. Nồng độ astaxanthin cao nhất đạt được là 49,5 $\mu\text{g/mL}$ trong điều kiện thiếu hụt nitơ và cường độ ánh sáng 230 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$. Sự thiếu hụt nitơ có ảnh hưởng lớn hơn so với cường độ ánh sáng lên sự tổng hợp astaxanthin, bởi sự thiếu hụt nitơ tác dụng mạnh mẽ hơn lên sự phân chia của tế bào. Khi thiếu hụt cả nitơ và magie, nồng độ astaxanthin đạt được thấp hơn so với môi trường chỉ thiếu hụt nitơ nhưng cao hơn so với môi trường chỉ thiếu hụt magie.

Olaizola (2000) đã công bố kết quả của 9 tháng vận hành hệ thống kín nuôi loài vi tảo này có tên là Aquasearch Growth Module (AGM) dung tích 25.000 lít, có sử dụng hệ thống máy tính để điều khiển các quá trình, diện tích bề mặt là 100 m^2 , sử dụng ánh sáng tự nhiên. Hệ thống AGM được cấu tạo từ hệ thống ống lắp song song, đường kính 18 - 41cm, nhiệt độ dao động 20 - 25°C, năng suất sinh khối vào khoảng 50 - 90 g/m^2 (0,2 - 0,36 g/L ; 4 - 19 $\text{g/m}^2/\text{ngày}$). Khi nghiên cứu trong hệ thống photobioreactor dạng ống và dạng trụ đứng có cùng dung tích 55L ở điều kiện ngoài trời, sau 16 ngày nuôi sinh trưởng, loài vi tảo này sinh trưởng trong hệ thống dạng ống tốt hơn ở hệ thống trụ đứng với khối lượng sinh khối tương ứng là 7,0 g/L và 1,4 g/L và hàm lượng carotenoid tương ứng là 2,0 và 0,5% khối lượng sinh khối khô (Lopez và cs., 2006).

Hàm lượng astaxanthin ở giai đoạn bào nang trưởng thành chiếm tới 4% trọng lượng khô của tế bào tảo *H. pluvialis* (Yuan và cs., 2000), tuy nhiên để thu nhận lượng lớn astaxanthin thì phụ thuộc vào nhiều yếu tố cũng như quy trình nuôi cấy tảo. Theo

các tài liệu đã công bố, để sinh khối tảo nuôi cấy có hàm lượng astaxanthin cao thì *H. pluvialis* cần được nuôi cấy theo mô hình 2 pha. Pha I tảo *H. pluvialis* được nuôi ở điều kiện thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển để tăng sinh khối tối đa. Sau đó tảo được chuyển vào nuôi pha II trong điều kiện thích hợp cho sự tích lũy hàm lượng astaxanthin bằng cách thay đổi tạo bất lợi trong điều kiện môi trường sống, chủ yếu là chiếu sáng với cường độ cao, nhiệt độ cao hoặc thay đổi môi trường dinh dưỡng. Theo Johnson và An (1991) cho rằng, khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *H. pluvialis* phụ thuộc rất lớn vào mức độ bất lợi của điều kiện nuôi trồng như: ánh sáng, chất dinh dưỡng, v.v.

Theo nghiên cứu của Esra Imamoglu và cộng sự (2009), ban đầu quá trình tăng sinh tế bào *H. pluvialis* được thực hiện trong môi trường BG11 đến khi tế bào đạt mật độ cao nhất thì được chuyển môi trường RM với những thay đổi về thành phần dinh dưỡng và cường độ chiếu sáng để gây stress. Kết quả thu được là trong môi trường RM không có sự hiện diện của nitơ dưới cường độ chiếu sáng 546 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ thì hàm lượng astaxanthin tích lũy cao nhất (30,07 mg/g) vào ngày thứ 13 (Ye và ctv, 2012).

Năm 2011, Issarapayup và cs., công bố những điều kiện nuôi trồng tối ưu cho *H. pluvialis* trong hệ thống kín dạng phẳng có tốc độ sinh trưởng và mật độ tế bào tương ứng là 0,52/ngày và 41×10^4 TB/mL. Cũng trong hệ thống nuôi dạng này ở quy mô 17 - 200 lít, tốc độ sinh trưởng đạt 0,45 - 0,53/ ngày với mật độ tế bào đạt cực đại 1,1 - $2,9 \times 10^6$ TB/mL. Cheng-Wu và cs., (2011) nghiên cứu những ảnh hưởng của các nồng độ nitơ khác nhau lên sự tăng trưởng, đặc điểm sinh lý, lượng sắc tố trên *Haematococcus pluvialis* CG-06 trong môi trường BBM với bốn nồng độ nitơ (0; 13,7; 27,5; 41,2 mg/mL). Kết quả thể hiện rằng sự tích lũy astaxanthin bên trong *H. pluvialis* CG-06 có mối tương quan nghịch với nồng độ nitơ ban đầu. Lượng astaxanthin trong tế bào *H. pluvialis* trưởng thành trong môi trường BBM không có nitơ lên tới 4,95 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vào ngày thứ 3. Trong khi đó, tế bào *H. pluvialis* trong môi BBM (đối chứng) bắt đầu tích lũy astaxanthin vào ngày thứ 9, và lượng astaxanthin tối đa là 4,17 mg/g. Li và cs. (2011) cũng đã đánh giá hiệu quả kinh tế của việc sản xuất astaxanthin từ nuôi trồng *Haematococcus pluvialis* ở quy mô lớn tại Trung Quốc với một mô hình nuôi trồng hai giai đoạn loài vi tảo này. Trong đó, giai đoạn đầu nuôi theo kiểu bán liên tục trong hệ thống photobioreactor kín có dung tích 8.000 lít, giai đoạn sau chuyển ra bể 100 m² cho quá trình chuyển giai đoạn. Nguồn giống lúc ban đầu được nuôi trong hệ thống photobioreactor kín 20 lít, chuyển dần lên hệ thống 1.000 lít và 8.000 lít. Mật độ tế bào

trong hệ thống kín đạt cao nhất lên tới khoảng 10^6 TB/mL và thường duy trì ở mật độ $0,5 \times 10^6$ TB/mL. Với mô hình này, giá thành của sinh khối tảo khô và astaxanthin giảm đi đáng kể. Tuy nhiên, mật độ các tế bào ở các hệ thống kín dạng ống với quy mô nhỏ hơn thường có mật độ tế bào cao hơn và duy trì trạng thái sinh dưỡng tốt hơn các hệ thống quy mô lớn. Với hệ thống dung tích 2 lít, mật độ tế bào có thể đạt được lên tới $1,1 - 2 \times 10^6$ TB/mL (Vega-Estrada và cs., 2005; Riso, 2005) và lên tới $5 - 7 \times 10^6$ TB/mL ở hệ thống 1 lít (Ranjbar, 2008). Nhưng cũng đối với hệ thống dạng này khi nâng quy mô lên 55 lít, sinh khối lại đạt được thấp hơn 5 lần so với dạng hệ thống dạng ống tròn có cùng một dung tích và điều kiện môi trường nuôi (Lopez và cs., 2006).

Nghiên cứu về sự thay đổi hình thái ở *H. pluvialis* trong chu kỳ đời sống của Makio Kobayashi và cộng sự (1997) đã đưa ra những kết luận về sự khác biệt trong hình thái tế bào tảo ở những giai đoạn khác nhau, hay nghiên cứu của Esra Imamoglu và cộng sự (2009) về tác động của các môi trường khác nhau lên quá trình tích lũy astaxanthin ở *H. pluvialis* và có kết luận rằng nước cất có sục khí CO_2 dưới cường độ ánh sáng cao là điều kiện tốt nhất cho quá trình tích lũy astaxanthin. Nghiên cứu về sự ảnh hưởng của mật độ sinh khối ban đầu đến sự tăng trưởng và tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* của Junfeng Wang và cộng sự (2013) đã cho thấy mật độ sinh khối ban đầu ảnh hưởng rất lớn đến đời sống của *H. pluvialis*.

Fábregas và cs., (2001) sử dụng công nghệ nuôi cấy hai pha và sử dụng ánh sáng $240 \mu\text{mol photon m}^2/\text{s}$ để sản xuất astaxanthin từ *H. pluvialis*, sau 15 ngày hàm lượng astaxanthin tích lũy là $9,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{ngày}^{-1}$. Trong nghiên cứu của Dominguez-Bocanegra và cs., (2004), *H. pluvialis* được nuôi cấy trong môi trường BAR, cường độ ánh sáng $345 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$, bổ sung 1g/L sodium acetate và không sục khí, lượng astaxanthin cao nhất đạt được là 98 mg/g sinh khối.

1.5.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Hiện nay ở trong nước, loài vi tảo này mới đang được nghiên cứu và từng bước tìm cách tối ưu các điều kiện nuôi trồng cũng như các điều kiện để tích lũy astaxanthin cao nhất. Trường đại học Khoa học tự nhiên, đại học Quốc gia Hà Nội cũng đã nghiên cứu phân lập được 5 chủng khác nhau và tuyển chọn được một chủng có hàm lượng astaxanthin cao nhất là $0,143\%$ (Nguyễn Thị Hường và cs., 2008).

Đinh Đức Hoàng và cs., (2011), đã nghiên cứu được vòng đời của vi tảo lục *H. pluvialis* trong điều kiện ở phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy, vòng đời tự nhiên của

vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường C và RM đều trải qua bốn giai đoạn tương ứng với bốn dạng hình thái tế bào có các đặc điểm khác nhau. Ở giai đoạn sinh dưỡng, tế bào sinh dưỡng có hình elip, có hai roi chuyển động, màu xanh, kích thước tế bào từ 10 - 20 μm , giai đoạn này kéo dài khoảng 10 ngày nuôi cấy. Giai đoạn tạo bào nang non (encyst) các tế bào có dạng hình cầu, mất roi, không có khả năng chuyển động và kéo dài từ 10 đến 20 ngày nuôi. Kích thước tế bào tăng lên đáng kể với khoảng 40 μm . Ở giai đoạn này, trong nội chất có sự biến đổi màu sắc từ xanh sang nâu đậm. Ở giai đoạn tạo bào nang hoàn chỉnh (cyst), các tế bào nang non chuyển thành nang hoàn chỉnh, có màu đỏ đậm, đây là giai đoạn tích lũy astaxanthin cao nhất và sau 50 ngày nuôi cấy. Hàm lượng sắc tố astaxanthin và chlorophyll a có xu hướng tăng chậm ở 20 ngày đầu tiên khi tảo được nuôi trong cả hai môi trường C và RM. Sau 40 ngày nuôi cấy, hàm lượng astaxanthin tăng đột ngột, hàm lượng chlorophyll a lại bị giảm dần. Hàm lượng các sắc tố trong môi trường RM cao hơn môi trường C. Hàm lượng astaxanthin đạt cực đại trong môi trường RM là 942,23 $\mu\text{g/l}$.

Đặng Diễm Hồng và cs., (2012) đã đánh giá ảnh hưởng kết hợp giữa chế độ chiếu sáng và nồng độ nitrate lên sinh trưởng của vi tảo *H. Pluvialis* khi nuôi ở bình nhựa thể tích 10 lít. Kết quả thể hiện khi nồng độ nitrate trong môi trường nuôi cấy tăng lên gấp 4 lần thì mật độ tế bào cực đại tăng 25%, đạt $0,95 \times 10^6$ TB/ml. Song song đó, phương pháp nuôi cấy *H. pluvialis* ở môi trường có nồng độ nitrate cao và kết hợp với điều chỉnh chế độ chiếu sáng và làm mới môi trường là phương pháp hiệu quả để đạt mật độ tế bào cao.

Lưu Thị Tâm và cs., (2012), nghiên cứu quá trình tăng sinh *H. pluvialis* được thực hiện trong môi trường C, sau đó quá trình kích thích tích lũy astaxanthin được thực hiện trong môi trường RM dưới tác nhân gây stress là nồng độ muối cao. Kết quả thu được là nồng độ muối 2,5 % kèm với nhiệt độ cao thì sau 8 giờ đã bắt đầu có sự tích lũy astaxanthin.

Lê Thị Thơm và cs., (2013) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nitrate ở môi trường nuôi cấy tác động đến sinh trưởng của *H. pluvialis* Flotow điều kiện bình tam giác 250 mL. Các nồng độ nitrate thí nghiệm được thiết kế gồm 219, 438, 876, 1314, 1752, 2190 mg/L, trong đó nồng độ nitrate 876 mg/L (tức cao gấp 4 lần so với môi trường RM cơ bản) được xác định là phù hợp nhất cho sinh trưởng của loài vi tảo này. Tại nồng độ nitrate phù hợp nêu trên, hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin, mật độ

tế bào đạt cao nhất là 2081 $\mu\text{g/L}$, 1053 $\mu\text{g/L}$, $1,74 \times 10^6$ TB/mL, tương ứng.

1.5.3. Một số kết quả nghiên cứu về bổ sung sắc tố astaxanthin vào trong thức ăn cho cá cảnh



Hình 1. 7: Quạt màu dùng so sánh màu sắc cho cơ thịt cá hồi (Diler và cs., 2002)

Theo Diler và cs., (2002), các loài thủy sản nuôi áp dụng bổ sung sắc tố trong thức ăn như: các loài cá biển: cá hồi vân, họ cá hồi biển (Salmonid), cá vược đỏ; Cá nước ngọt: cá rô phi, họ cá chép, cá vàng; Giáp xác: tôm nước ngọt và tôm biển. Tương tự, Lovatelli và cs., (2009) cũng báo cáo rằng astaxanthin là sắc tố đã được sử dụng từ lâu để phục vụ sản xuất thức ăn cho các ngành công nghiệp nuôi cá hồi. Theo những nghiên cứu của Buttle và cs., (2001) đã phát hiện ra rằng sự hấp thụ 2 loại sắc tố astaxanthin và canthaxanthin phụ thuộc vào loài. Để đánh giá màu sắc cơ thịt của cá hồi hoặc so sánh màu sắc được hấp thụ trong cơ thịt của cá nuôi so với cá tự nhiên, người ta dùng quạt với màu sắc được đánh số làm căn cứ để so sánh.

Carotenoid trong khẩu phần thức ăn cung cấp có thể cải tiến và gia tăng màu sắc của da như ở cá cảnh. Sắc tố của cá vàng và cá koi được cải tiến bởi việc bổ sung carotenoid và những loài cá này có khả năng chuyển hóa zeaxanthin thành astaxanthin. Tuy nhiên, cá vàng lại thiếu khả năng chuyển hóa lutein đồng thời cũng giới hạn khả năng chuyển đổi β -carotene thành astaxanthin. Sắc tố trên da của cá tứ vân *Barbus tetrazona* được báo cáo là gia tăng khi cho ăn khẩu phần thức ăn chứa carotenoid từ bột tôm, cánh hoa cúc vạn thọ và chiết xuất từ hạt điều đỏ. Tảo lam cũng được sử dụng như nguồn tạo sắc tố trên cá koi. Ở cá đuôi kiếm đỏ (*Xiphophorus helleri*), cá gấm (*Pseudomugil furcatus*) và cá vây cứng hoàng ngọc (*Cichlasoma myrnae*), cường độ màu sắc có ý nghĩa được cải tiến khi khẩu phần ăn chứa 1,5 - 2% giống tảo giàu carotenoid *Spirulina platensis* và 1% *Haematococcus pluvialis* trong 3 tuần (Gupta và cs., 2007).

Ở Nhật, bột tảo *Haematococcus* đã được chấp thuận như nguồn thực phẩm tạo sắc tố đỏ tự nhiên và là sắc tố trong thức ăn cá. Ngoài ra, ở Canada và ở Mỹ *Haematococcus* được sử dụng như là 1 sắc tố bổ sung trong thức ăn cho cá hồi và chúng được sử dụng như sắc tố trong NTTS với nhiều chức năng như: (1) chất chống oxy hóa, (2) tiền chất của hormone, (3) gia tăng tính miễn dịch, (4) tiền chất của hoạt tính vitamin A, tham gia trong sinh sản, (6) tăng trưởng, (7) sự quang bảo vệ. Các nhà nghiên cứu đề nghị carotenoid như là chất dinh dưỡng thiết yếu nên bổ sung trong tất cả các khẩu phần ăn của ĐVTS với nồng độ tối thiểu là 5 - 10 ppm (Lorenz và cs., 2000).

Tippawan Paripatananont và cs., (1999), đã thực hiện thí nghiệm để xác định được liều astaxanthin tối ưu của đối với cá vàng (*Carassius auratus*). Cá vàng được cho ăn nhiều khẩu phần có chứa 0,25; 50; 75 và 100 mg astaxanthin/kg trong thời gian 4 tuần. Sự hình thành sắc tố trên da cá được ước lượng thông qua đánh giá cảm quan và đếm số lượng các tế bào sắc tố được sản sinh trong tế bào hạ bì của da cá. Cả hai phương pháp đều cho thấy cùng kết quả là 36 – 37 mg/kg là liều astaxanthin tối ưu để kích thích màu sắc ở cá. Tiếp tục quan sát cá thí nghiệm trong 4 tuần sau đó cho thấy cá được kích thích bởi chế độ ăn astaxanthin thể hiện màu sắc ổn định. Vì vậy, thức ăn có bổ sung astaxanthin có thể là một phương pháp phù hợp đối với những sản xuất cá vàng để kích thích màu sắc của cá trưởng thành trong điều kiện nuôi trong môi trường không có tảo. Ngoài ra, tỷ lệ sống được cải thiện đáng kể khi trong khẩu phần thức ăn của cá có bổ sung sắc tố astaxanthin so với lô đối chứng. Tuy nhiên tác dụng của astaxanthin đối tương ứng với tăng trọng của cá thì không đáng kể.

Đối với cá chép cảnh (*Cyprinus carpio*), nghiên cứu khả năng tiêu hóa carotenoid có nguồn gốc tự nhiên bao gồm astaxanthin và lutein ở 500 µg/kg thức ăn. Astaxanthin được hấp thụ tốt hơn lutein và có sự chuyển hóa lutein thành astaxanthin. Điều này có ý nghĩa trong hoạt động sản xuất thức ăn cho cá cảnh và khẩu phần thức ăn chứa carotenoid nên được cá ăn trong vòng 15 phút để tránh lượng sắc tố trong thức ăn thất thoát ra môi trường nước (Yuangsoi và cs., 2011).

Nghiên cứu sắc tố của Trịnh Thị Lan Chi (2010), về thử nghiệm bổ sung astaxanthin và canthaxanthin vào thức ăn cho cá chép Nhật (cá chép koi – *cyprinus carpio*) cho thấy: với hàm lượng bổ sung > 25 mg/kg thức ăn, astaxanthin thể hiện tác dụng tích cực trong cải thiện màu sắc ở cá chép Nhật, trong đó hàm lượng hiệu đạt quả nhất là $78,22 \pm 5,84$ mg/kg thức ăn. Định kỳ 3 tháng/lần cho cá ăn thức ăn có bổ sung

78,22 ± 5,84 mg/kg astaxanthin liên tục trong 2 tháng sau đó ngưng 1 tháng rồi lại tiếp tục lặp lại chu kỳ trên. Hoặc cho cá ăn thức ăn có bổ sung astaxanthin với hàm lượng 80 mg/kg trong 2 tháng, sau đó giảm còn 51,5 ± 13,86 mg/kg thức ăn để duy trì màu sắc của cá. Tương tự như vậy, với hàm lượng bổ sung > 25 mg/kg canthaxanthin có tác dụng cải thiện màu sắc ở cá chép Nhật và hàm lượng hiệu quả nhất ở mức 137,97 ± 7,20 mg/kg. Chu kỳ bổ sung canthaxanthin vào thức ăn cho cá chép Nhật hiệu quả nhất là 3 tháng/lần cho cá ăn liên tục thức ăn có bổ sung 137,97 ± 7,20 mg/kg trong 2 tháng sau đó ngưng 1 tháng rồi lại tiếp tục lặp lại chu kỳ trên.

1.6. Tình hình nghiên cứu astaxanthin từ *Rhodospiridium* sp.

1.6.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Hiện nay, chủng *Rhodospiridium toruloides* được biết đến như một loài có khả năng tích lũy lipid với hàm lượng cao. Trong nghiên cứu của Yonghong Li và cộng sự (2007) chủng *Rhodospiridium toruloides* Y4 nuôi cấy liên tục (fed-bath culture) trong 25 ngày liên tục đạt mức sinh khối là **151,5 g/l** và hàm lượng lipid tích lũy trong tế bào là 48,0%. Để nâng cao hàm lượng thu nhận carotenoid và giảm chi phí trong quá trình sản xuất, các nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện bằng việc tối ưu hóa môi trường nuôi cấy tập trung vào các yếu tố: nguồn carbon và nitơ, khoáng chất, vitamin, pH, nhiệt độ, ánh sáng cũng như các yếu tố gây stress có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng của tế bào nấm men và năng suất tổng hợp carotenoid (Fregova G.I. và Beshkova D.M., 2009).

Ramirez và cộng sự (2000) đã đưa ra việc dùng môi trường cơ bản nhưng bổ sung thêm dịch chiết trái cây đóng vai trò như nguồn cung cấp nguồn carbon cho việc thu nhận hàm lượng astaxanthin cao hơn gấp 2,5 lần so với khi chỉ nuôi cấy trên môi trường yeast malt (YM) cơ bản, lượng astaxanthin thu được có thể đạt 8,1 mg/l, cao hơn so với nuôi trong điều kiện cơ bản (Rodríguez- M., Luis J. và Barredo J. L. (2010).

Phaffia rhodozyma nuôi trên môi trường 10% rỉ đường thu được hàm lượng astaxanthin tương ứng là 1,1 mg/g (tính trên gam sinh khối khô) và 15,3 µg/ml (tính trên thể tích dịch nuôi cấy), cao hơn gấp 3 lần so với khi sử dụng glucose. Ba thành phần đường chính có trong rỉ đường là saccharose, glucose và fructose, nhưng fructose được vi sinh vật tiêu thụ chậm. Trong thành phần rỉ đường thì hàm lượng nitơ và phospho bị hạn chế. An và cộng sự (2001) bổ sung thêm muối urea và sodium phosphate vào môi

trường nuôi cấy rỉ đường sẽ cho hàm lượng sinh khối tối đa là 36 g/l và hàm lượng carotenoid thu được là 40 mg/l.

Trong khi phần cơm dừa chủ yếu phục vụ trong công nghiệp sản xuất dầu gôi, bánh kẹo và thực phẩm thì phần nước dừa có thể được sử dụng để tăng cường sản xuất astaxanthin. Bocanegra và Muñoz (2004) áp dụng quá trình lên men *Phaffia rhodozyma* trên môi trường nước dừa thu được 1,8 mg/g astaxanthin.

Rodríguez-M., Luis J. và Barredo J. L. (2010) đã chứng minh một số hydrocarbon lỏng đã được thử nghiệm như là tác nhân oxy để thúc đẩy sự lên men và sản xuất carotenoid trong các môi trường nuôi cấy lắc chũng *Phaffia rhodozyma*, kết hợp bổ sung n-hexadecan 9% (v/v) vào môi trường nuôi cấy lỏng giúp tăng sản lượng carotenoid lên 58% (từ 9,2 mg/l lên 14,5 mg/l).

Tinoi và cộng sự (2006), sử dụng phế liệu sau khi xử lý trong công nghiệp sản xuất mù tạc làm môi trường nuôi cấy *Phaffia rhodozyma*, kết quả tạo ra lượng sinh khối và lượng astaxanthin tương ứng là 19,6 g/l và 25,8 mg/l, cải thiện lên 11 lần so với khi nuôi cấy trên môi trường yeast malt (YM) cơ bản.

Nhiều nguồn carbon bao gồm pentose và hexose, disaccharide, glycerol, n-alkan, hoặc nhiều loại phế phụ phẩm có nguồn gốc từ nông nghiệp, công nghiệp được coi là nguồn carbon tiềm năng cho công nghệ sinh học sản xuất carotenoid. Carotenoid tích tụ sắc tố ở hầu hết các nấm men bắt đầu vào cuối pha logarit và tiếp tục trong pha ổn định. Xu hướng của các nghiên cứu gần đây trên thế giới tận dụng các nguồn nguyên liệu giá rẻ và các sản phẩm có nguồn gốc từ nông nghiệp, công nghiệp nhằm giảm chi phí sản xuất cũng như giảm thiểu các vấn đề môi trường và năng lượng phát sinh trong quá trình sản xuất. Chủng nấm men được nghiên cứu nhiều nhất vẫn là *Phaffia rhodozyma*. Quá trình sản xuất theo quy mô công nghiệp cơ bản tiến hành theo hai giai đoạn: **giai đoạn nuôi cấy và giai đoạn thu hồi sản phẩm**. Một khía cạnh quan trọng của quá trình nuôi cấy là tìm ra môi trường nuôi cấy phù hợp để có được năng suất sản phẩm mong muốn. Ở quy mô công nghiệp trước đây, phương pháp nuôi cấy mẻ (batch) vẫn được sử dụng, song phương pháp này lại có hạn chế là qua một thời gian liên tục nuôi cấy thì hàm lượng các chất dinh dưỡng trong môi trường giảm dần, kéo theo hàm lượng sắc tố cũng giảm theo. Chính vì vậy, các nhà sản xuất chuyển sang phương pháp nuôi cấy mẻ có bổ sung (fed-batch), kết quả thu được theo nghiên cứu của Ramirez và cộng sự (2006), hàm lượng astaxanthin thu nhận ở chủng *Phaffia rhodozyma* là **23,81 mg/l** ở pH 6,0, cao gấp

4,8 lần so với khi dùng phương pháp nuôi cấy mẻ truyền thống Marova I., Certik M. và Breierova E., (2011); Và Ramírez J., Obledo N., Arellano M., Herrera E. (2006).

Latha, Jeevaratnam, Murali và Manjia (2005) đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành carotenoid ở chủng *Rhodotorula glutinis*. Khi khảo sát các nguồn carbon khác nhau, fructose cho hàm lượng carotenoid cao nhất (**3,8 mg/l**), kế đến là glucose (3,5 mg/l) và saccharose (**3,4 mg/l**). Khi khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau, sodium nitrate (NaNO_3) cho hàm lượng carotenoid cao nhất (3,3 mg/l), kế đến là urea (**2,2 mg/l**) và cao nấm men (2,1 mg/l). pH được khảo sát tại giá trị pH 5,5 cho hàm lượng carotenoid cao nhất (3,3 mg/l), và giá trị nhiệt độ thích hợp cho chủng *Rhodotorula glutinis* tổng hợp carotenoid là 5 - 26°C, cụ thể là tại 15°C cho hàm lượng carotenoid tối đa là **3,5 mg/l**.

Ngoài ra, để gia tăng sản xuất astaxanthin, nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp đột biến hoặc tối ưu hoá quá trình lên men. Miao L và cs., (2010), sử dụng nhiệt độ trung bình, tạo chủng đột biến *P. rhodozym* (MK19) ở các gen NTG và Co60. So sánh với chủng hoang dại JCM9042, nồng độ acid béo thấp, năng suất tối ưu hoá astaxanthin cao hơn 17 nếp gấp. β -caroten và các phân tử trung gian (dẫn xuất keto) được chuyển đổi tạo sản phẩm cuối cùng astaxanthin nhiều hơn trong chủng MK19 so với JCM9042, phần trăm của astaxanthin tăng 61-62%, và tỉ lệ liên kết giữa β -carotene và dẫn xuất keto giảm từ 28 - 14%.

Yimyoo, Yongmanitchai và Limtong (2011) đã khảo sát môi trường nuôi cấy chủng *Rhodospiridium pakudigenum* sử dụng glycerol làm nguồn carbon nhằm thu nhận carotenoid ở các điều kiện sau: nhiệt độ 32°C, pH 6,0, glycerol 40 g/l, urea 0,559 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l và KH_2PO_4 1,0 g/l. Kết quả thu được sau 132 giờ nuôi cấy: lượng sinh khối khô là **7,59 g/l** và hàm lượng carotenoid là **3,42 mg/l**.

Yang Jinsong PP. và cs., (2011), sử dụng môi trường chứa cơ chất sẵn là nguồn nguyên liệu chính để lên men *Phaffia rhodozyma* sản xuất astaxanthin. Sử dụng hệ thống Box-Behnken, khảo sát hàm lượng đường, độ pH và nồng độ nitrogen để tối ưu hoá lên men sản xuất astaxanthin. Nhóm tác giả đã tối ưu hoá điều kiện lên men: hàm lượng đường 40 g/l, độ pH 4 và nồng độ nitrogen 8 g/l. Và kết quả năng suất astaxanthin lên tới 2.98 mg/L.

Ferrao và Garg (2012) cũng tập trung vào khảo sát 2 yếu tố ảnh hưởng chính là carbon và nitơ đến sự thu nhận β -carotene ở chủng *Rhodotorula graminis*. Nghiên cứu

cho thấy manitol (đóng vai trò là nguồn cung cấp carbon) có tác động tích cực đến sự tích lũy sinh khối và hàm lượng β -carotene, với hàm lượng manitol dao động từ 10 - 20 g/l và nguồn nitơ được chọn là cao nấm men với hàm lượng dao động trong khoảng 9,5 - 10 g/l, kết quả trọng lượng sinh khối khô tối đa đạt được là 3,8 - 4,3 g/l và hàm lượng β -carotene tối đa là 190 - 220 mg/l.

Kiyotaka Y Hara và cs., 2014, cho rằng các carotenoid được phân bố rộng rãi trong tự nhiên và chỉ được tổng hợp bởi thực vật và các tế bào vi sinh vật. Một số sản phẩm sinh học carotenoid quan trọng trong ngành dược như artemisinin và Taxol được tạo ra nhờ kỹ thuật di truyền thông qua các vi sinh vật như *Saccharomyces cerevisiae* và *Escherichia coli*. Tuy nhiên, theo Melillo và cs., loài nấm đỏ *Phaffia rhodozyma* (dạng giới tính, *Xanthophyllomyces dendrorhous*) sản xuất isoprenoid cao hơn so với *S. cerevisiae* và *E. coli*.

Anfeng Xiao và cộng sự (2015), nghiên cứu về mối liên quan giữa chất chuyển hoá nội bào và tích lũy astaxanthin trong quá trình lên men 4 chủng đột biến *Phaffia rhodozyma*. Kết quả cho thấy, sự tích lũy ethanol, protein nội bào, và các acid béo tác động cạnh tranh trên sự tổng hợp astaxanthin. Trong đó, chủng *P. rhodozyma* JMU-VDL668 và JMU-7B12 đạt sản lượng thấp (**1.7 và 1.2 mg/L**) hơn so với 2 chủng JMU-MVP14 và JMU-17W (**20.4 và 3.9 mg/L**).

Carla Dias và cs., 2016 đã nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy (3,5-6,0) trên carotenoid và lipid (như axit béo) sản xuất bởi các men *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921, kết quả cho thấy nồng độ sinh khối nấm men và lipid là cực đại ở pH 4,0 (5,90 g/L và 21,85% w/w, tương ứng), trong khi hàm lượng carotenoid tối đa (63,37 mg/g) thu được ở pH 5,0. Các kết quả báo cáo có thể đóng góp cho quá trình tối ưu hóa lên men về *Rhodospiridium toruloides*.

1.6.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Những nghiên cứu về ứng dụng loài nấm men để thu nhận astaxanthin ở Việt Nam còn rất ít. Năm 2006, nhóm tác giả Tống Kim Thuận, Trần Thanh Thủy, Phạm Công Hoạt đã phân lập được chủng *Phaffia rhodozyma* NT5 có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin từ nước ven bờ biển Nha Trang, Khánh Hòa thu được hàm lượng astaxanthin là **285,4 μ g/g** trọng lượng khô sau 120 giờ nuôi cấy môi trường lỏng 2% saccharose pH 5 ở 22°C.

Năm 2011, nhóm tác giả Bùi Ngọc Phương Khánh, Ngô Đại Nghiệp đã phân lập

và định danh theo tài liệu phân loại nấm men của Lodder và kết hợp phương pháp sinh học phân tử giải trình tự đoạn gen ITS 5,8S rDNA xác định được chủng nấm men sinh sắc tố chứa astaxanthin là *Rhodospodium toruloides*, thuộc chi *Rhodospodium*, họ Ustilaginaceae, bộ Ustilaginales, lớp Ustilaginomycetes, ngành Basidiomycota (nấm đấm) có bào tử đấm, khuẩn lạc có thể màu trắng hoặc màu cam, đỏ hoặc hơi vàng, dạng bờ đến hơi nhầy. Tế bào hình trứng, ngoại hình trứng kéo dài, đôi khi có sợi giả. Chủng nấm men *Rhodospodium toruloides* này có khả năng tích lũy lipid đến 75% khi ở điều kiện giới hạn nitơ và cao hơn 60% lipid trên trọng lượng khô khi sử dụng glucose như nguồn carbon. Hơn nữa, chủng nấm men này có thể nuôi cấy trên dịch thủy phân tinh bột khoai mì (sắn) với nồng độ 8% trong 144 giờ thu được 63,2% dầu, tương tự chủng nấm men *R. mucilaginosa* T JY15a cũng tích trữ 47,9% dầu bên trong tế bào, so với chủng nấm men *Phaffia rhodozyma*, nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển là 22,5°C và chúng không phát triển ở nhiệt độ trên 27°C cho đến nay vẫn chưa thành công trong việc nâng cao khả năng chịu nhiệt của chủng này. Hơn nữa, hàm lượng astaxanthin tích lũy trong tế bào của chủng nấm men *Rhodospodium toruloides* phân lập được và nuôi cấy lỏng với một số điều kiện thích hợp đã thu được hàm lượng astaxanthin là 1.651,429 µg/l dịch nuôi cấy hay **368,13µg/g** trọng lượng khô, có hàm lượng astaxanthin cao hơn chủng nấm men hoang dại *Phaffia rhodozyma* ATCC2402 (303,3µg/g), thậm chí với thời gian nuôi cấy ngắn hơn chỉ 72 giờ với nhiệt độ phòng (28 °C ± 2) cũng có hàm lượng astaxanthin cao hơn cả chủng *Phaffia rhodozyma* NT5 phân lập từ nước ven bờ biển Nha Trang, Khánh Hòa có hàm lượng astaxanthin là **285,4 µg/g** trọng lượng khô sau 120 giờ nuôi cấy môi trường lỏng 2% saccharose pH 5 ở 22°C.

Lê Vũ Khánh Trang và cs., (2015) đã tiến hành khảo sát các nguồn cacbon khác nhau sử dụng để nuôi cấy chủng *Rhodospodium toruloides* bao gồm ri đường, glucose, saccharose và glycerol nhằm thu nhận được hàm lượng carotenoid cao nhất. Kết quả cho thấy khi nuôi chủng *Rhodospodium toruloides* với ri đường là nguồn cacbon thu được hàm lượng carotenoid cao nhất (2,5 ml/L dịch nuôi cấy).

CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides* có khả năng tổng hợp astaxanthin, được cung cấp bởi bộ môn Sinh hóa, Khoa sinh học - Công nghệ sinh học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP.HCM. *Rhodospiridium toruloides* được giải trình tự rDNA-ITS với một cặp môi ITS1-ITS4-5.8S rDNA tại Nam Khoa BioTek. Trình tự DNA sau đó là so sánh đối chiếu tại National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) với Entrez và BLAST.



Hình 2. 1: Khuẩn lạc *Rhodospiridium toruloides* trên môi trường thạch Hansen

Chủng tảo *Haematococcus pluvialis* có khả năng tổng hợp astaxanthin được cung cấp bởi Phòng Sinh học Thực nghiệm - Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II (Số 116 Nguyễn Đình Chiểu, Phường Đa Kao, Quận 1, TP. Hồ Chí Minh).

2.1.1. Môi trường giữ giống

Bảo quản giống trong môi trường Hansen thạch, cấy chuyển một tháng một lần. Hoạt hóa môi trường Hansen lỏng trong 48 giờ trước khi cấy chuyển.

Thành phần môi trường Hansen:

- Glucose 50 g/l
- Peptone 10 g/l
- KH_2PO_4 3 g/l
- $MgSO_4$ 3 g/l
- Agar 25 g/l (đối với môi trường thạch)
- Chỉnh pH = 6 bằng dung dịch NaOH 0,1 N, hấp khử trùng 121°C, 1 atm, 15 phút.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy (Môi trường rỉ đường)

Môi trường lỏng nghiên cứu: Sử dụng rỉ đường làm nguồn carbon, bổ sung urea

làm nguồn nitơ, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 làm nguồn khoáng.

Xác định hàm lượng canxi, phospho, đường tổng, đường khử trong nguyên liệu để bổ sung thành phần thích cho nuôi cấy *Rhodospiridium toruloides*.

Trước khi nuôi cấy, rỉ đường được xử lý để loại canxi (Ca^{2+}), sau đó pha loãng đến hàm lượng đường tổng thích hợp. Chính pH = 6 bằng dung dịch NaOH 0.1 N, hấp khử trùng $121^\circ C$, 1 atm, 15 phút.

2.1.3. Môi trường rỉ đường

Loại thành phần không cần thiết trong nguyên liệu như bụi, tạp chất, thành phần khoáng cao như canxi, kali....

❖ Quy trình xử lý rỉ đường với các bước sau [39].

- Pha loãng đường với nước tỉ lệ 1:1 (m:w)
 - Acid hóa dung dịch rỉ đường đã pha loãng bằng H_2SO_4 từng nồng độ (0,1 N, 0,2 N, 0,3 N, 0,4 N, 0,5 N) thêm từ từ acid vào, vừa thêm vừa khuấy đều tỷ lệ 1:2 (trong đó 2 acid và 1 rỉ đường pha loãng).

- Đun hỗn hợp ở nhiệt độ $90^\circ C$ trong 50 – 55 phút, trong thời gian gia nhiệt nên khuấy thường xuyên.

- Ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch bỏ tủa

- Điều chỉnh dung dịch rỉ đường đã xử lý về pH 6 bằng NaOH 1N.

Theo nghiên cứu của tác giả Roukas (1998) trong việc thực hiện các phương pháp xử lý rỉ đường, tác giả cho rằng kết quả xử lý rỉ đường bằng dung dịch acid sulfuric cho hiệu quả loại bỏ các kim loại nặng tốt hơn các phương pháp còn lại [63].

2.2. Nghiên cứu nuôi cấy thu nhận astaxanthin trên tảo *H. pluvialis*

2.2.1. Chọn lọc môi trường, thiết lập điều kiện nhân sinh khối *H. pluvialis*

Chọn bốn môi trường dinh dưỡng khác nhau là RM, C, F2, B để bố trí thí nghiệm nhằm tìm ra môi trường tối ưu cho nhân nuôi tảo *H. pluvialis*. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện bình nhựa 10 lít chứa 4 lít môi trường, với bốn công thức (CT), mỗi công thức lặp lại 3 lần:

CT1: môi trường RM

CT2: môi trường C

CT3: môi trường F2

CT4: môi trường Bristol

Bảng 2.1. Thành phần dinh dưỡng của môi trường C, RM, F/2 và B

| Thành phần môi trường | Môi trường (mg/l) | | | |
|--|--------------------|-------------------------|-----------------------------|------|
| | C (Ichimura, 1971) | RM (Rudic và ctv, 2000) | F/2 (Guillard và ctv, 1962) | B |
| NaNO ₃ | - | 300 | 75 | 250 |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | - | - | 5 | - |
| Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O | - | - | 30 | - |
| Na ₂ EDTA | 2,71 | - | 4,36 | - |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,012 | - | 0,01 | - |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | - | 0,08 | 0,01 | 0,06 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 5,888 | 17 | 3,15 | - |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,108 | - | 0,18 | - |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,0075 | - | 0,006 | - |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,066 | 0,1 | 0,022 | 0,2 |
| HCl Thiamin | 0,01 | - | 0,1 | - |
| Biotin | 0,0001 | - | 0,0005 | - |
| B ₁₂ | 0,0001 | - | 0,0005 | - |
| K ₂ HPO ₄ | - | 80 | - | 75 |
| KH ₂ PO ₄ | - | 20 | - | 175 |
| CaCl ₂ | - | - | - | 25 |
| NaCl | - | 20 | - | 25 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 40 | 10 | - | 75 |
| FeCl ₃ | - | - | - | 0,3 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | - | - | - | 0,3 |
| H ₃ BO ₃ | - | 0,3 | - | 0,2 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 150 | - | - | - |
| KNO ₃ | 100 | - | - | - |
| β -Na ₂ glycerolphosphate | 50 | - | - | - |
| CaCl ₂ . 2 H ₂ O | - | 58,5 | - | - |
| EDTA | - | 7,5 | - | - |
| MnSO ₄ . H ₂ O | - | 1,5 | - | - |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O | - | 0,3 | - | - |
| Co(NO ₃). 6 H ₂ O | - | 0,26 | - | - |
| Trisaminomethiane | 500 | - | - | - |

Điều kiện thí nghiệm: mật độ tảo ban đầu 10^5 tế bào (TB)/ml, sục khí vào liên tục, cung cấp khí CO₂ để tảo quang hợp và nồng độ CO₂ được điều chỉnh dựa vào độ pH của nước. Sử dụng loại ánh sáng trắng với cường độ chiếu sáng khoảng 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ cùng nhiệt độ được duy trì ổn định từ $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ điều chỉnh bằng máy lạnh. Sự sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* được đánh giá thông qua mật độ tế bào, hàm lượng sắc tố và trọng lượng khô trong bốn loại môi trường.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của loại ánh sáng đến vòng đời tăng trưởng của *H. pluvialis*.

Chúng tôi sử dụng ánh sáng đơn sắc từ đèn led có bước sóng khác nhau để bố trí. Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện bình nhựa 10 lít chứa 4 lít môi trường RM, với bốn công thức (CT), mỗi công thức lặp lại 3 lần:

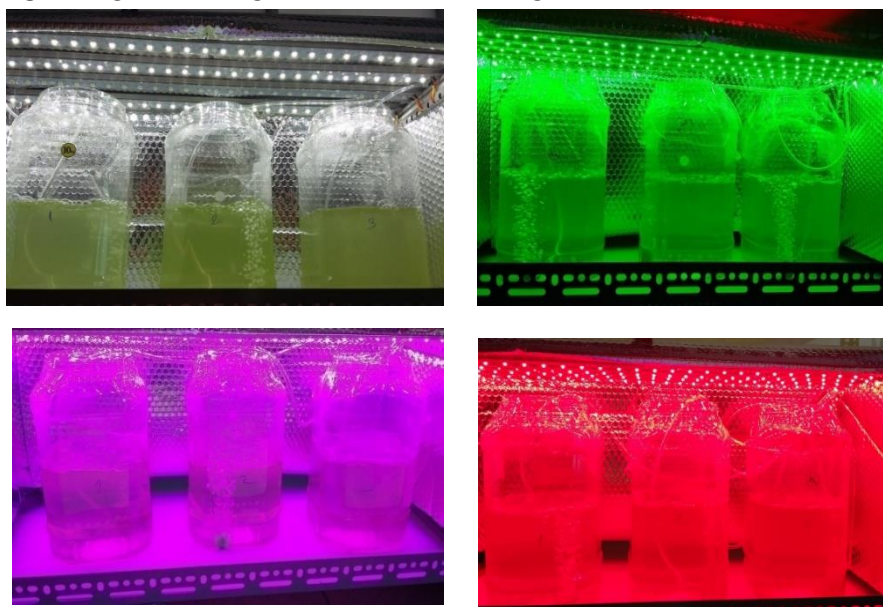
CT1: Led đỏ ($610 < \lambda < 760$)

CT2: Led xanh ($500 < \lambda < 570$)

CT3: Led tím (< 380)

CT4: Led trắng

Điều kiện thí nghiệm: mật độ tảo ban đầu 10^5 tế bào (TB)/ml, sục khí liên tục, cung cấp CO₂ cho tảo quang hợp và nồng độ CO₂ được điều chỉnh thông qua độ pH của nước, cường độ chiếu sáng 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ. Chúng tôi sử dụng bạt cách nhiệt ngăn tầng lô thí nghiệm để các ánh sáng không ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Sự sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* được đánh giá thông qua mật độ tế bào, hàm lượng sắc tố và trọng lượng khô trong bốn loại môi trường.



Hình 2. 2: Các loại ánh sáng khác nhau trong thí nghiệm (Led Trắng/Xanh/Tím/Đỏ)

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của chế độ ánh sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*.

Sau khi xác định được ánh sáng trắng thích hợp cho vòng đời tăng trưởng của tảo, chúng tôi sử dụng tiếp ánh sáng này để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên việc tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*. Theo các tài liệu đã công bố, để sinh khối tảo nuôi cấy có hàm lượng astaxanthin cao thì *H. pluvialis* cần được nuôi cấy theo mô hình 2 pha.

Pha I tảo *H. pluvialis* được nuôi ở điều kiện thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển để tăng sinh khối tối đa. Sau đó tảo được chuyển vào nuôi pha II với điều kiện thích hợp cho sự tích lũy astaxanthin bằng cách thay đổi điều kiện môi trường trở nên bất lợi, chủ yếu là chiếu sáng với cường độ cao, nhiệt độ cao hoặc thay đổi môi trường dinh dưỡng, khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *H. pluvialis* phụ thuộc rất lớn vào mức độ bất lợi của điều kiện nuôi trồng như: ánh sáng, chất dinh dưỡng, v.v. Nội dung nghiên cứu của chúng tôi cũng tiến hành theo mô hình 2 pha như trên.

2.2.3.1. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*.

Tảo được nuôi cấy trong môi trường tối ưu từ các kết quả trên (môi trường RM, cường độ chiếu sáng là $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng tối 12:12, nhiệt độ là 25°C) đến khi tảo bước vào pha ổn định (ngày thứ 14) thì sinh khối tảo được chuyển vào bình erlen để tiến hành gây sốc tảo bằng cách thay đổi cường độ ánh sáng:

CT ĐC: $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

CT2: $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

CT3: $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

Quan sát sự thay đổi kích thước và thành phần sắc tố bên trong của tảo sau mỗi 24 giờ dưới kính hiển vi.

2.2.3.2. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*

Tảo được nuôi cấy trong môi trường tối ưu từ các kết quả trên (môi trường RM, cường độ chiếu sáng là $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (do thí nghiệm này bố trí cùng lúc với thí nghiệm trên nên chúng tôi chưa kế thừa kết quả tốt nhất từ thí nghiệm trên), chu kỳ sáng tối 12:12, nhiệt độ là 25°C) đến khi tảo bước vào pha ổn định (ngày thứ 14) thì sinh khối tảo được chuyển sang các bình erlen để tiến hành gây sốc tảo bằng cách thay đổi thời gian chiếu sáng:

CT ĐC: thời gian chiếu sáng 12 giờ

CT2: thời gian chiếu sáng 16 giờ

CT3: thời gian chiếu sáng 24 giờ

Quan sát sự thay đổi kích thước và thành phần sắc tố bên trong của tảo sau mỗi 24 giờ dưới kính hiển vi.

2.2.3.3. Xác định thời điểm dừng quá trình gây stress ở tảo *H. pluvialis*

Tế bào vi tảo chuyển sang giai đoạn bào nang khi gặp điều kiện bất lợi, lúc này quá trình tích lũy astaxanthin bắt đầu diễn ra trong nhân tế bào, khi trở thành bào nang trưởng thành thì tế bào có màu đỏ (Kobayshi, 1997).

Cách tiến hành: Sử dụng kính hiển vi để theo dõi sự thay đổi kích thước, hình thái và màu sắc trong tế bào *H. pluvialis* từ khi bắt đầu quá trình gây stress. Quá trình này sẽ dừng lại khi tế bào phát triển thành bào nang trưởng thành.

2.2.4. Ảnh hưởng nguồn nitơ và nồng độ nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng của tảo *H. pluvialis*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên hai yếu tố: yếu tố A: nguồn nitơ (NaNO_3 , NH_4Cl , NH_4NO_3), và yếu tố B: nồng độ. Tổng nghiệm thức thí nghiệm là 12, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Yếu tố A: A1: NaNO_3

A2: NH_4Cl

A3: NH_4NO_3

Yếu tố B: B1: RM-[N]-1X

B2: RM-[N]-2X

B3: RM-[N]-4X

B4: RM-[N]-6X

Trong đó X là hàm lượng nitơ có trong môi trường ban đầu.

Nuôi cấy tảo trên môi trường sơ cấp, bổ sung vào bình 1,5 lít chứa 1 lít môi trường với với tỉ lệ 10%. Môi trường thí nghiệm là môi trường RM, thay thế thành phần NaNO_3 bằng các nguồn nitơ từ NaNO_3 , NH_4Cl , NH_4NO_3 với các nồng độ như trên.

2.2.5. Ảnh hưởng của sự thiếu hụt nitơ lên sự tích lũy astaxanthin của tảo *H. pluvialis*

Các tế bào ở giai đoạn sinh dưỡng có màu xanh đạt mật độ nhất định được ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ dịch, bổ sung tế bào vào môi trường thí nghiệm

với nồng độ nitơ từ 0, 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 và so với nồng độ của nitơ có trong môi trường RM. Thí nghiệm được bố trí một cách ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức được lặp lại tuần tự 3 lần.

Bảng 2. 1: Nồng độ của nitơ có trong môi trường RM ở các nghiệm thức

| Nghiem thức | Nồng độ nitơ so với nồng độ nitơ có trong môi trường RM | [NaNO ₃] (mg/L) |
|-------------|---|-----------------------------|
| NT0 | 0 | 0 |
| NT1 | 1/5 | 60 |
| NT2 | 2/5 | 120 |
| NT3 | 3/5 | 180 |
| NT4 | 4/5 | 240 |
| NT5 (ĐC) | 1 | 300 |

2.2.6. Chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm

Đối với tất cả các nghiệm thức, tảo được lấy mẫu 2 ngày/lần (Nội dung 1 và 2 thực hiện lấy mẫu 2 ngày/lần, nội dung 3 thực hiện lấy mẫu 1 ngày/lần) để xác định các thông số:

- Mật độ tế bào được đếm bằng buồng đếm hồng cầu. Vortex mẫu cần đếm, pha loãng nếu cần thiết. Tiến hành đếm trên cả 16 ô lớn trong buồng đếm. Mật độ tế bào được tính theo công thức:

$$D = A \cdot n \cdot 10^4$$

Trong đó: D: mật độ tế bào (TB/mL)

A: Tổng số tế bào trong cả buồng đếm

n: Hệ số pha loãng

- Hàm lượng sắc tố chlorophyll a, b, carotenoid (Nguyễn Đức Lượng, 2013): ly tâm 2 mL dịch tảo trong một eppendorf 2 mL (16.000 vòng/phút, 5 phút). Loại bỏ dịch, bổ sung 1 mL aceton 90% và bi, cho vào máy nghiền bi, phá mẫu tảo với tần số 30 s⁻¹ trong 60 phút. Ly tâm 16.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch, định mức dịch thu được. Phần dịch trong được đo với các bước sóng 665, 645, 630 và 480 nm (toàn bộ quá trình được tiến hành trong tối). Hàm lượng các sắc tố được tính bằng công thức sau:

$$\text{Hàm lượng sắc tố } (\mu) = C/V \text{ } (\mu\text{g/L})$$

Trong đó: V là lượng thể tích dịch tảo đem lọc (lít)

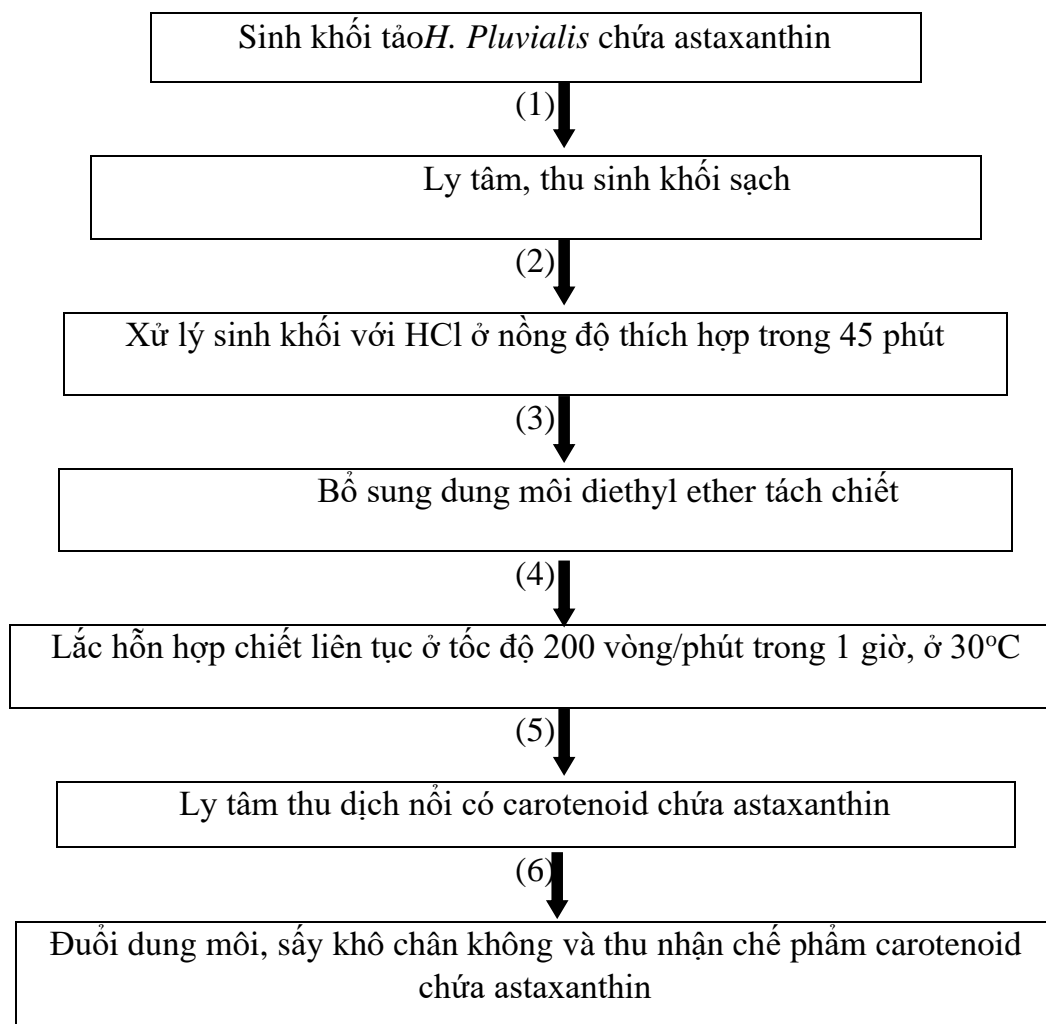
C (chlorophyll a) = $11,6 \times E_{665} - 1,31 \times E_{654} - 0,14 \times E_{630}$

C (chlorophyll b) = $20,7 \times E_{645} - 4,34 \times E_{665} - 4,42 \times E_{630}$

C (carotenoid) = $4,0 \times E_{480}$

2.2.7. Quy trình tách chiết và định lượng carotenoid chứa astaxanthin từ tảo *H. pluvialis*.

2.2.7.1. Sơ đồ quy trình tách chiết:



2.2.7.2. Phương pháp định lượng hàm lượng sắc tố carotenoid chứa astaxanthin

Định lượng carotenoid chứa astaxanthin: Ở vi tảo *H. pluvialis*, hàm lượng carotenoid tổng của tế bào chủ yếu là astaxanthin và hấp thụ ở bước sóng 480 nm. Vì vậy, hàm lượng carotenoid ở tảo *H. pluvialis* để xác định chính là hàm lượng của astaxanthin (Jeffrey và cs., 1997). Được tính theo công thức sau:

Hàm lượng sắc tố ($\mu\text{g/l}$) = C/V

V: lượng thể tích dịch tảo đem lọc (lít)

C (carotenoid tổng số) = $4,0 * E_{480}$

2.2.7.3. Phương pháp tách chiết astaxanthin trong tảo *H. pluvialis*

Quá trình tách chiết hợp chất astaxanthin từ sinh khối vi tảo, có chất lượng và hàm lượng phù hợp cho mục đích làm Dược phẩm, mỹ phẩm gặp nhiều khó khăn, do tế bào vi tảo có vách polysaccharide dày khó phá vỡ. Astaxanthin là hợp chất màu và không tan trong nước. Nhiều phương pháp tách chiết hiện đại đã được áp dụng và thu được astaxanthin dùng cho nhiều mục đích khác nhau. Kobayashi et al., (1992) có xử lý tế bào vi tảo *H. pluvialis* với acetone 40% (v/v) trong 2 phút ở nhiệt độ 80°C và sau đó thủy giải bằng enzyme đã thu được astaxanthin với hiệu suất khoảng 70% [12]. Kang và Sim (2008) tách chiết astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* bằng dầu thực vật và thu được hợp chất astaxanthin với hiệu suất 88% [13].

Dong et al., (2014) đã áp dụng 4 phương pháp tiếp cận tách chiết khác nhau, gồm kết hợp HCl và acetone, tách chiết lần lượt bằng methanol sau đó đến acetone, hỗn hợp hexan:isopropanol có tỉ lệ 4:6, và tách chiết bằng dầu thực vật. Kết quả cho thấy việc kết hợp HCl và acetone cho hiệu suất tách chiết cao nhất [14]. Tại Việt Nam, chưa có các nghiên cứu đầy đủ về việc tách chiết astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* cho mục đích thương mại, trừ một vài nghiên cứu của nhóm tác giả Đặng Diễm Hồng et al., (2010); Đặng Diễm Hồng et al., (2012); Đinh Đức Hoàng et al., (2011); Lê Thị Thom et al., (2013) sử dụng dung môi để tách chiết và định lượng hợp chất astaxanthin trong quá trình nghiên cứu về sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* [8-11].

Tách chiết astaxanthin từ *Haematococcus pluvialis* như sau:

Thành tế bào *H. pluvialis* khá vững chắc với 70 % là carbohydrate, 3% cellulose mà astaxanthin được tích lũy bên trong tế bào. Mà DMSO là dung môi có khả năng phá thành tế bào nên sẽ giúp quá trình chiết có hiệu quả tốt hơn.

Loại bỏ chlorophyll: các tế bào nang *H. pluvialis* được xử lý với 5% KOH trong 30% methanol (v/v) ở 70° trong 5 phút. Sau đó ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, phần tủa được rửa sạch với 2 ml nước cất và bổ sung vài giọt acid acetic để đưa pH về trung tính (Huang và cs., 2012).

Tách chiết astaxanthin bằng DMSO và acetone: Phần sinh khối khô sau khi loại chlorophyll sẽ ủ trong 10 ml DMSO ở 55°C. Ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch nổi chứa DMSO. Thực hiện phá thành tế bào 2 lần với DMSO. Thêm vào phần tủa 5 ml acetone, vortex kỹ sau đó ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5p, thu lại dịch nổi (chiết 2 - 3 lần đến khi phần cặn hết sắc tố). Gôm chung tất cả dịch chiết

DMSO và acetone vào bình lắng. Thêm petroleum ether (tỉ lệ petroleum ether: dịch chiết là 1:2) và 10 ml nước cất, thêm 5 ml NaCl bão hòa nếu sắc tố không tách pha.

Thu pha petroleum ether có chứa sắc tố ở phía trên. Thêm nước vào dịch chiết sắc tố (tỉ lệ 1:1) bỏ pha nước (chứa acetone, DMSO), thu lại dịch chiết sắc tố trong pha petroleum ether phía trên. Lặp lại các bước 3 - 5 lần để loại hoàn toàn DMSO và acetone. Thêm Na₂SO₄ khan để loại nước ra, thu dịch nổi sắc tố trong pha petroleum ether. Thêm petroleum ether để tất cả đạt một thể tích nhất định. Đo độ hấp thụ của dịch chiết ở bước sóng khoảng 468 nm (Buzzini và cs., 2007). Cuối cùng, dịch chiết được sấy khô bằng bình hút ẩm chân không và mẫu astaxanthin được bảo quản trong tủ lạnh 0°C.

2.3. Nghiên cứu thu nhận astaxanthin trên nấm men *Rhodosporidium toruloides*

2.3.1. Tối ưu hóa quy trình bằng phương pháp đáp ứng bề mặt Box - Behnken nhằm thu nhận carotenoid

Phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Method - RSM) là phương pháp được dùng để đánh giá mối quan hệ giữa các nhân tố thí nghiệm là biến độc lập với các kết quả thu nhận được là biến phụ thuộc. Phương pháp đáp ứng bề mặt được ứng dụng để xác định các thành phần môi trường để thu nhận hàm lượng carotenoid tối ưu. Thiết kế thí nghiệm được chọn trong nghiên cứu này là Box - Behnken gồm ba biến độc lập và một biến phụ thuộc là đáp ứng. Mô hình đánh giá tác động của mỗi biến đối với biến phụ thuộc. Phương trình bậc 2 được sử dụng để tính mối quan hệ giữa các biến độc lập và biến phụ thuộc [10].

$$y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

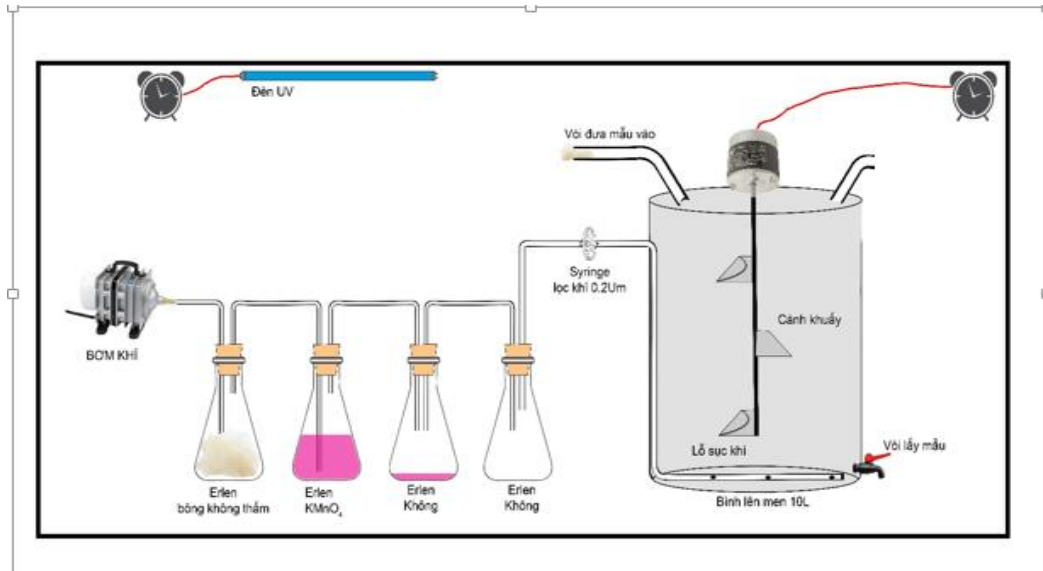
Các tính toán được tiến hành bằng phân tích hồi quy đa biến.

2.3.2. Nâng cấp và khảo sát điều kiện nuôi cấy thu nhận astaxanthin ở hệ thống lên men 10 lít

Hệ thống này, nhằm khảo sát và bổ sung thành phần khoáng để tạo điều kiện tăng trưởng nấm men hồng *Rhodosporidium toruloides* trên môi trường rỉ đường nhằm thu nhận hàm lượng astaxanthin cao nhất, đưa lên nuôi hệ thống pilot 10L.

Hệ thống tự thiết kế và quá trình vận hành hoạt động tốt. Khi khí được đưa từ máy bơm khí vào ống dẫn, được cản bụi và một số thành phần nhờ bông không thấm, tiếp

tục sát khuẩn qua dung dịch KMnO_4 N/50 và được bẫy tại một erlen - không để dung dịch KMnO_4 đi vào thiết bị, được lọc ở syringe lọc khí với kích thước lỗ 0,2 μm rồi mới đưa vào thiết bị. Lượng khí cho vào hệ thống đủ mạnh để làm xáo trộn dung dịch tạo điều kiện vi sinh vật có thể phát triển tốt ở điều kiện hiếu khí. Cánh khuấy giúp trộn và đảo đều dịch nuôi cấy, dòng chảy dịch lên men sẽ di chuyển từ tâm ra vách thùng, sau đó đi lên trên hay hướng xuống dưới và lại trở về tâm. Dòng chảy loại này hỗ trợ tốt cho sự truyền nhiệt, sự hòa tan vào chất lỏng, sự phân tán bọt khí, sự truyền chất.



Hình 2. 3: Hệ thống nuôi cấy 10 lít được thiết lập tại PTN. Bộ môn Sinh hóa - Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên TP.HCM

2.3.3. Định tính và định lượng carotenoid và astaxanthin từ *Rhodospiridium toruloides*.

2.3.3.1. Sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography - TLC)

Sau khi tách chiết sắc tố theo phương pháp đã nêu ở mục 2.2.6 tiến hành chạy sắc ký lớp mỏng: hệ dung môi acetone: n-hexan tỉ lệ 1:4 vào bồn sắc kí, đợi đến khi dung môi bão hòa cho bản mỏng đã chấm vào.

Để dung môi chạy cách đỉnh 1cm, lấy giấy sắc kí ra khỏi bồn, đánh dấu mức dung môi.

Để khô một cách tự nhiên và đo khoảng cách di chuyển của vạch màu, tính R_f của sắc tố

$$R_f = \frac{a}{b} = \frac{\text{Đoạn đường di chuyển của hợp chất}}{\text{Đoạn đường di chuyển của dung môi}}$$

2.3.3.2. Phương pháp đo quang

Chuẩn bị: thực hiện trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng thấp, vì các carotenoid rất nhạy với ánh sáng, nhiệt độ và oxy.

- Dịch chiết Astaxanthin (Chuẩn Astaxanthin - Sigma Chemical Company/trans-Astaxanthin)
- Acetone (minimum technical grade) chứa 500 mg/L BHT.
- Bình định mức (100 ml) và Bể siêu âm, máy đo phổ UV

Chuẩn bị dung dịch astaxanthin:

- Dung dịch mẹ: Hòa tan khoảng 3mg astaxanthin chuẩn trong bình định mức 100ml với 10ml chloroform, siêu âm cho tan hoàn toàn, làm đầy bình với hexan.

Dung dịch chuẩn: Chuyển 5; 10; 15; 20 ml dung dịch mẹ vào bình định mức 100 ml đã có 4 ml chloroform, làm đầy với hexan, siêu âm cho tan, thu được dung dịch chuẩn với nồng độ 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 ug/ml.

Ngay sau khi chuẩn bị mẫu chuẩn, đo độ hấp thu ở bước sóng cực đại 470 nm. Lượng astaxanthin được tính theo công thức:

Hàm lượng astaxanthin trên 1 gam sinh khối nấm men khô ($\mu\text{g/g}$) trong mẫu được tính theo công thức 2.5 (CT 2.2) của Kelly-Harmon (1972) [45].

$$X = \frac{A_{468} \times V \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{\%} \times G} \quad (\text{CT 2.2})$$

Trong đó:

X: Hàm lượng astaxanthin ($\mu\text{g/g}$)

A_{474} : Độ hấp thu của dịch chiết sắc tố trong dung môi petroleum ether ở bước sóng 474 nm

V: Thể tích dịch chiết sắc tố (ml)

$E_{1\text{cm}}^{\%} = 2100$: Độ hấp thu của dung dịch astaxanthin 1% trong dung môi petroleum ether (với cuvette 1 cm)

G: Trọng lượng của sinh khối nấm men khô đem cân để chiết (g)

Hàm lượng astaxanthin tính trên thể tích dịch nuôi cấy ($\mu\text{g/l}$) được tính theo công thức 2.6 như sau:

$$Y = X * M \quad (\text{CT 2.3})$$

Trong đó:

Y: Hàm lượng astaxanthin tính trên thể tích dịch nuôi cấy ($\mu\text{g/l}$)

X: Hàm lượng astaxanthin tính trên gram sinh khối khô ($\mu\text{g/g}$) (CT 2.2)

M: Trọng lượng sinh khối khô tính trên 1 lít dịch nuôi cấy (g/l)

2.3.3.3. HPLC

Astaxanthin sau khi được trích ly bằng ethanol được tiến hành xà phòng hóa để bề gãy liên kết ester tạo astaxanthin dạng mono (Sau khi quá trình khử ester, ASX trở thành dạng tự do tạo nên một đỉnh lớn duy nhất). Sau đó đo nồng độ bằng kỹ thuật sắc ký bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Dung dịch Astaxanthin chuẩn gốc – 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Cân 0.010 g chất chuẩn Astaxanthin vào bình định mức 10ml, thêm 1ml Dichloromethane và định mức tới vạch bằng Methanol. Chuẩn gốc được hòa tan với Methanol thành các chuẩn làm việc.

Trước khi phân tích dung dịch mẫu, chạy những dung dịch Astaxanthin chuẩn để thành lập đường chuẩn. Sử dụng đường cong hiệu chuẩn trong khoảng từ 1-10 ppm

Hệ thống sắc ký lỏng với đầu dò UV 474 nm

Cột sắc ký: Ecosil C18, 250 x 4,6 mm, kích thước hạt 5 μm

- Cân 1g mẫu (chính xác đến 0,01g) vào falcon 50 ml, thêm 7 ml ethanol, lắc đều rồi đem xử lý siêu âm ở 50°C trong 20 phút. Sau đó tiến hành ly tâm 4.000 vòng/ 10 phút. Thu lấy dịch và lặp lại quá trình trên 3 lần hoặc đến khi thu được dịch chiết trong suốt.

- Dịch chiết được chỉnh pH đến 10 với KOH 10% và xà phòng hóa ở 4°C trong 3 giờ. Kết thúc quá trình xà phòng hóa bằng cách đưa pH về 7 với HCl. Hỗn hợp dịch chiết thu được sau đó được làm bay hơi ở 35°C trong điều kiện áp suất thấp.

- Cuối cùng, phần cặn được hòa tan trong (V) ml Methanol sao cho nồng độ trong khoảng 1 - 10 ppm.

- Lọc qua màng lọc 0.22 μm và tiến hành phân tích HPLC.

2.3.4. Khảo sát sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tương ứng với quá trình tăng trưởng chủng *Rhodosporium toruloides*

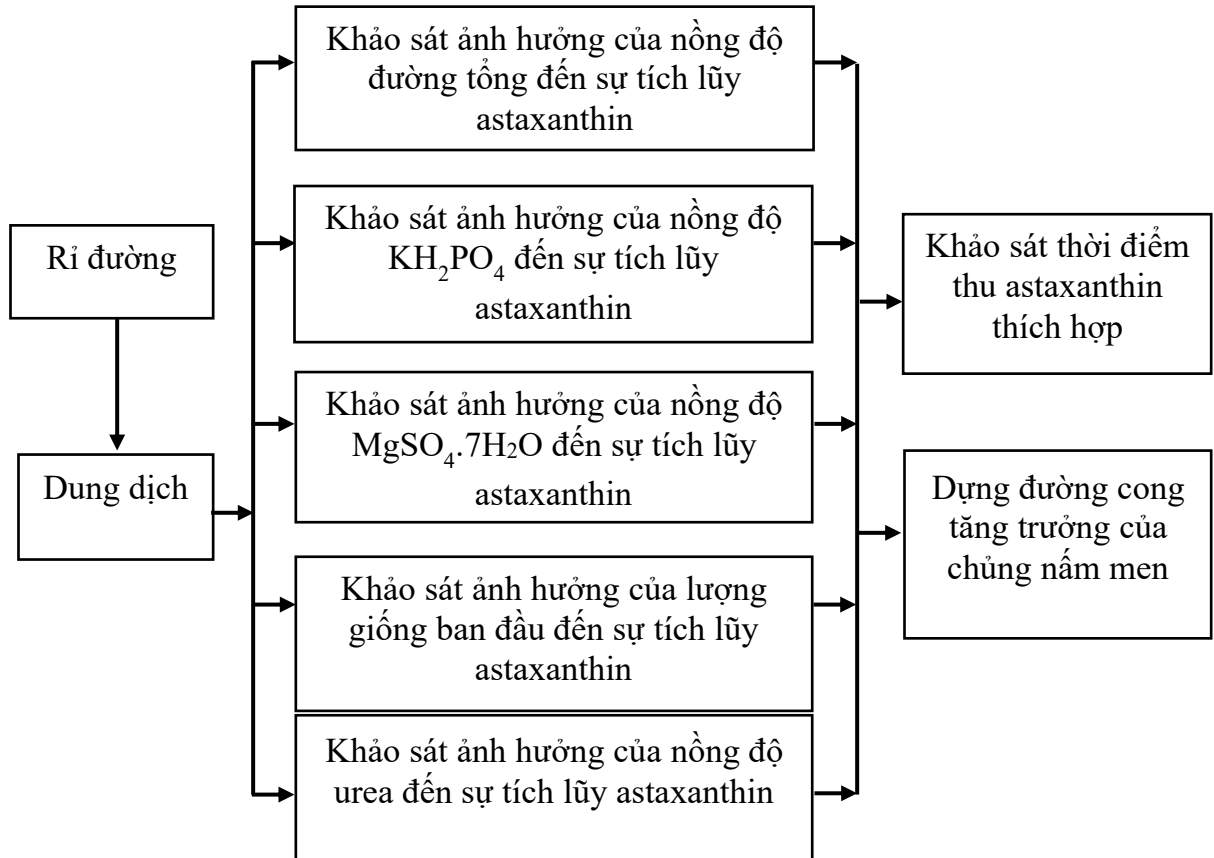
Xác định thời điểm astaxanthin đạt hàm lượng cao nhất tính trên thể tích dịch nuôi cấy, từ đó xác định thời điểm thích hợp cho việc thu sinh khối để thu nhận sắc tố.

Nuôi cấy lắc chủng nấm men trên môi trường đã khảo sát các yếu tố thích hợp ở điều kiện ánh sáng tự nhiên và nhiệt độ phòng. Tiến hành thu nhận sinh khối và định

lượng hàm lượng sắc tố sau mỗi 12 giờ nuôi cấy.

Sinh khối ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau được thu nhận, tách chiết sắc tố và định lượng astaxanthin.

2.3.5. Khảo sát môi trường rỉ đường nuôi cấy *Rhodospiridium toruloides*



Hình 2. 4: Sơ đồ Quy trình khảo sát điều kiện nuôi cấy nấm men trên môi trường rỉ đường

Các thí nghiệm khảo sát điều kiện nuôi cấy được bố trí theo phương pháp khảo sát ngẫu nhiên một yếu tố.

Môi trường khảo sát: Môi trường rỉ đường lỏng. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp nuôi cấy mẻ. Môi trường được chuẩn bị với thể tích 100 ml trong các chai nuôi dung tích 250 ml. Chúng tôi cố định các thành phần như urea 0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/l, KH_2PO_4 1 g/l và tỷ lệ giống là 10% so với thể tích dịch rỉ đường nuôi cấy. Các thí nghiệm tiếp tục thực hiện khảo sát từng yếu tố và cố định các yếu tố còn lại.

❖ Quá trình khảo sát: Ảnh hưởng hàm lượng đường tổng (10 g/l, 15 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l) đến sự tích lũy sắc tố được khảo sát đầu tiên. Tiếp theo, nấm men hồng *Rhodospiridium* sp. được nuôi cấy trên môi trường có hàm lượng đường tổng thích hợp như đã xác định trước đó nhưng bổ sung urea với hàm lượng khác nhau (từ 0 g/l,

0,2 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l) để khảo sát ảnh hưởng urea đến sinh trưởng và tổng hợp sắc tố ở nấm men.

Môi trường có nồng độ đường và nồng độ urea thích hợp như đã khảo sát trước đó, được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo là khảo sát ảnh hưởng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l) và KH_2PO_4 (0 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l).

Tỷ lệ giống cây chuyen được khảo sát (6%, 8%, 10%, 12%, 14% so với thể tích dịch nuôi cấy với mật độ giống ban đầu môi trường Hansen trong giai đoạn pha cân bằng (mật độ tế bào từ 8 đến 10×10^6 tế bào/ml) cho vào môi trường có hàm lượng đường tổng và $MgSO_4$, urea, KH_2PO_4 thích hợp.

Cuối cùng, xây dựng đường cong tăng trưởng của chủng nấm men, sự thay đổi lượng sinh khối và hàm lượng sắc tố qua thời gian nuôi cấy được khảo sát để xác định sự tăng trưởng của chủng và thời điểm thu nhận sắc tố thích hợp nhất.

2.3.6. Thu sinh khối và tách chiết astaxanthin từ *Rhodospodium toruloides*

Dịch nuôi cấy lỏng được ly tâm 4.000 vòng/phút trong 5 phút để thu sinh khối, sinh khối được rửa hai lần với nước cất. Sau đó sấy ở $105^\circ C$ đến khối lượng không đổi. Thu được sinh khối nấm men khô.

Quy trình tách chiết chung:

+ Cân m (g) sinh khối nấm men khô, phá màng tế bào bằng acid HCl/enzyme cellulase.

+ Vortex kỹ trong 3 phút. Ly tâm 4.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch nổi có chứa sắc tố.

+ Thêm vào phần cặn 10 ml dung môi cần khảo sát (acetone, ethanol và methanol), vortex kỹ rồi ly đem ly tâm 4.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch nổi (chiết 2 - 3 lần đến khi phần cặn hết sắc tố).

+ Thu tất cả dịch chiết cần khảo sát (acetone, ethanol và methanol) và dịch nổi chứa sắc tố rồi gộp chúng lại với nhau. Thêm vào petroleum ether (PE) (tỷ lệ PE: dịch chiết là 1:2) và 10 ml nước cất, bổ sung NaCl 20% (w/w). Thu pha petroleum ether có chứa sắc tố ở phía trên.

- Thu dịch nổi sắc tố trong pha petroleum ether.
- Định mức về một thể tích nhất định (V ml) bằng PE.
- Đo $OD_{468\text{ nm}}$ và tính hàm lượng astaxanthin.

2.4. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của astaxanthin

2.4.1. Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa DPPH

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa của sắc tố trong dịch chiết và chất đối chứng bằng cách khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH như sau:

Pha mẫu astaxanthin thành các nồng độ từ 0 đến 8 $\mu\text{g/ml}$ bằng DMSO và đối chứng dương là BHA, vitamin C. Dựng đường tương quan giữa mật độ quang OD và nồng độ của chất đang khảo sát: Cho 1 ml mẫu với nồng độ khác nhau vào từng ống nghiệm, thêm vào 1,5 ml DPPH 20 $\mu\text{g/ml}$, lắc đều và ủ tối 30 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thu ở bước sóng 517 nm. BHA và vitamin C được sử dụng làm chứng dương.

Từ kết quả thu được dựng đồ thị biểu thị tương quan giữa mật độ quang $OD_{517\text{ nm}}$ và nồng độ của chất đang khảo sát, đồ thị dạng $y = ax + b$ với y là mật độ quang, x là nồng độ mẫu.

Tỉ lệ phần trăm ức chế DPPH được tính theo công thức 2.4

$$\text{Tỉ lệ bắt gốc DPPH (\%)} = (A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{mẫu}}) * 100 / A_{\text{đối chứng}} \quad (\text{CT 2.4})$$

Trong đó:

$A_{\text{đối chứng}}$ là độ hấp thu của ống đối chứng

$A_{\text{mẫu}}$ là độ hấp thu của dung dịch mẫu và DPPH

❖ Cách tính IC_{50}

Trong trường hợp này, IC_{50} là giá trị ứng với nồng độ chất thử nghiệm có khả năng bắt được 50% gốc tự do DPPH hiện diện trong dung dịch.

Thay hiệu quả bắt gốc tự do DPPH (%) bằng 50% vào công thức 2.7, ta tính được $A_{\text{mẫu}}$.

Từ $A_{\text{mẫu}}$ và đường tương quan xác định được nồng độ của mẫu tương ứng (IC_{50}).

Từ kết quả thu được dựng đồ thị biểu thị tương quan giữa mật độ quang.

Kết quả cần đạt

- Tỷ lệ bắt gốc DPPH của các mẫu astaxanthin, vitamin C và BHA.
- So sánh giá trị IC_{50} của các mẫu astaxanthin, vitamin C và BHA, từ đó kết luận mẫu nào có hoạt tính bắt gốc DPPH cao nhất.

2.4.1.1. Khảo sát hoạt tính bắt gốc ABTS+

Chuẩn bị dung dịch gốc tự do ABTS+

Lắc nhẹ 10 ml dung dịch ABTS 7 mM với 10 ml dung dịch potassium persulphate 2,45 mM (không màu), để yên 12 - 16 giờ trong tối ở nhiệt độ phòng.

Trước khi sử dụng, thêm methanol vào dung dịch gốc tự do ABTS⁺ để được độ hấp thụ $0,7 \pm 0,2$ ở bước sóng 734 nm.

- Mẫu astaxanthin được pha thành các nồng độ từ 0 đến 25 $\mu\text{g/ml}$ bằng methanol (cách nhau 5 đơn vị).

- Cho 0,2 ml mẫu thử được thêm vào 1,8 ml dung dịch gốc tự do ABTS⁺, lắc đều và ủ 6 phút trong tối ở nhiệt độ phòng.

Đo mật độ quang ở bước sóng 734 nm.

- Mẫu trắng được thực hiện bằng cách dùng methanol thay thế thuốc thử.

- Ống không với mẫu thay thế bằng methanol.

- Sử dụng vitamin C, BHA làm đối chứng dương.

➤ Cách tính tỷ lệ bắt gốc tự do ABTS⁺

Tỷ lệ bắt gốc ABTS⁺ (%) = $(1 - (A_i - A_j)/A_0) \times 100\%$ (CT 2.5)

Trong đó:

A₀: Mật độ quang của ống không

A_i: Mật độ quang của mẫu

A_j: Mật độ quang mẫu trắng

Kết quả cần đạt

- Tỷ lệ bắt gốc ABTS⁺ của các mẫu astaxanthin, vitamin C và BHA.

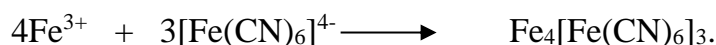
- So sánh giá trị IC₅₀ của các mẫu astaxanthin, vitamin C và BHA, từ đó kết luận mẫu nào có hoạt tính bắt gốc ABTS⁺ cao nhất.

2.4.1.2. Phương pháp khảo sát năng lực khử

Năng lực khử của một chất là khả năng chất đó cho điện tử khi chất đó tham gia vào phản ứng oxy hóa khử. Trong phương pháp của Oyaizu (1986), chất khử sẽ khử potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]) thành potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆]), hay nói cách khác ion Fe³⁺ trong phân tử potassium ferricyanide sẽ bị khử thành Fe²⁺ trong phân tử potassium ferrocyanide. Phương trình phản ứng như sau:



Sau đó, Fe³⁺ được bổ sung vào tạo thành một phức hợp ferrocyanide màu xanh cường độ màu tỷ lệ với hàm lượng ion ferrocyanide, tức là tỷ lệ với khả năng khử của hợp chất thử nghiệm [54].



❖ Cách tiến hành

Lấy 1,2 ml hỗn hợp phản ứng gồm chất thử nghiệm astaxanthin pha loãng thành các nồng độ từ 0 đến 25 $\mu\text{g/ml}$ bằng methanol, sau đó cho đệm phosphate 0,2 M, pH = 6 và được ủ với potassium ferricyanide (1%, w/v) ở 50°C trong 20 phút. Dừng phản ứng bằng dung dịch TCA (10% w/v) và ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút. Độ hấp thụ của dung dịch được đo bằng máy quang phổ kế ở bước sóng 700 nm. Độ hấp thụ của dung dịch tỷ lệ với năng lực khử của chất thử nghiệm. BHA và vitamin C được sử dụng làm chứng dương.

Kết quả cần đạt

- Giá trị $\Delta\text{OD}_{700\text{ nm}}$ của các mẫu astaxanthin, vitamin C và BHA, từ đó so sánh năng lực khử của các mẫu.

2.4.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của astaxanthin thu nhận từ nấm men *Rhodosporidium turoloides*

2.4.2.1. Định tính bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Chuẩn bị môi trường cao thịt pepton: Pha môi trường cao thịt pepton với các thành phần như đã trình bày ở trên. Sau đó, môi trường cao thịt pepton được hấp khử trùng và đổ vào các đĩa petri ($\Phi = 10$) với thể tích khoảng 25 ml để tạo mặt thạch.

Chuẩn bị các chủng vi khuẩn thử nghiệm: Cấy các chủng vi khuẩn thử nghiệm vào môi trường cao thịt pepton đã được khử trùng. Ủ ở 37°C trong thời gian từ 6 - 8 giờ để hoạt hóa các chủng vi khuẩn: *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*. So sánh độ đục của dịch vi khuẩn nuôi cấy với độ đục chuẩn 0,5 Mcfarland, tương ứng với mật độ vi khuẩn trong khoảng $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml. Mật độ vi khuẩn này được cố định để tiến hành sử dụng cho thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết astaxanthin.

Các lỗ thạch có đường kính là 5 mm, mỗi đĩa sẽ đục 6 lỗ tương ứng với từng nồng độ astaxanthin khảo sát (25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$) và đối chứng âm DMSO, đối chứng dương là kháng sinh (KS) chloramphenicol 5 $\mu\text{g/ml}$.

Chuẩn bị các chất thử nghiệm: Astaxanthin được hòa tan trong DMSO với từng nồng độ ($\mu\text{g/ml}$): 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$. Đối chứng âm được sử dụng cũng chính là DMSO. Đối chứng dương là kháng sinh (KS) chloramphenicol.

Sau đó dùng pipetman hút chính xác 50 μl các chất thử nghiệm cho vào các lỗ thạch. Các thao tác phải được tiến hành trong điều kiện vô trùng.

Ủ những đĩa petri này trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau cùng, quan sát kết quả dựa vào vòng vô khuẩn. Nếu mẫu có tạo vòng vô khuẩn chứng tỏ chất thử nghiệm có khả năng kháng được chủng vi khuẩn thử nghiệm.

2.4.2.2. Khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

- Tăng sinh chủng vi khuẩn cần khảo sát trong môi trường cao thịt pepton.
- Sử dụng đĩa 96 giếng, tiến hành pha loãng astaxanthin bằng DMSO 10% để đạt các nồng độ 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml như đã nêu trên với tổng thể tích của chế phẩm là 100 µl.
- Tiếp tục thêm 100 µl dịch vi khuẩn cần khảo sát vào giếng.
- Chứng âm là DMSO 10% và chứng dương là kháng sinh chloramphenicol 5 µg/ml.
- Tiến hành đo OD_{600 nm} tại thời điểm 0 giờ rồi đem ủ ở 37°C, cách 60 phút đo một lần, thực hiện trong 6 giờ.
- Tính $\Delta OD_{600 nm}$ với giá trị OD lúc 0 giờ của mỗi mẫu và dựng đường cong tăng trưởng của vi khuẩn.

Từ đó xác định nồng độ ức chế tối thiểu mà astaxanthin có thể kháng được vi khuẩn nghiên cứu.

2.4.3. Đánh giá khả năng tăng màu sắc trên cá đĩa đỏ *Symphysodon sp.*

- Đối tượng thí nghiệm: Cá đĩa đỏ thí nghiệm được nuôi dưỡng trong bể chứa những cá cùng kích thước để bố trí thí nghiệm, cá có kích thước 6 cm (cá 3 tháng tuổi), sức mạnh và không dị tật.
- Bể kính kích thước 1,2 m x 0,6 m x 0,6 m.
- Thức ăn chính cho đĩa cá đỏ: Thức ăn chế biến (tim bò 97,9%, vitamin tổng hợp).
- Các test kiểm tra chất lượng nước như pH, oxy, độ cứng.
- Thử nghiệm bố trí:
- Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên 1 element, prefix astaxanthin 4 mức độ (0 mg / kg, 25 mg / kg, 50 mg / kg, 75 mg / kg). Thí nghiệm gồm 8 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần lặp lại bố trí 1 bể cá có 30 đĩa cá đỏ. Quá trình thử nghiệm được tiến hành với các điều kiện thông số chất lượng nước thích hợp, pH = 6,5, nhiệt độ 28 - 30°C, độ cứng nước 8 - 10 °dH.

Bảng 2. 2: Phương pháp bố trí thí nghiệm

| Nghiệm thức | A0(ĐC) | A25 | A50 | A75 |
|--|---------------|------------|------------|------------|
| Astaxanthin chiết xuất (sản phẩm của đề tài) mg/kg | 0 | 25 | 50 | 75 |
| Astaxanthin trên thị trường (đối chứng) mg/kg | 0 | 25 | 50 | 75 |
| Số lượng cá thí nghiệm (con) | 30 | 30 | 30 | 30 |

- Astaxanthin hàm lượng được bổ sung vào thức ăn như sau: Tim bò được xay nhuyễn, bổ sung các tiền tố bằng cách hòa tan sắc tố trong nước ấm (60⁰C) sau đó kết hợp cho đến khi kết hợp có màu đỏ cam, ép tim bò thành miếng mỏng, trữ ở nhiệt độ từ - 5⁰C cho cá ăn dần.

- Trong thời gian thí nghiệm cá được cho ăn 2 lần/ngày với thức ăn có kết hợp astaxanthin. Ăn thức ăn được kiểm tra và điều chỉnh theo nhu cầu. Thức ăn bao gồm chứng thực nghiệm thức (tim bò + tổng hợp vitamin).

- Thời gian thực nghiệm 90 ngày.

- Trước khi bắt đầu thử nghiệm, thu 30 mẫu cá/ nghiệm thức để đánh giá màu sắc chỉ số. Trong thời gian thử nghiệm cá được đánh giá chỉ số màu sắc 2 tuần/ lần.

- So sánh kết quả thu được từ các công thức để xác định liều lượng bổ sung hiệu quả nhất hợp chất astaxanthin vào thức ăn cho cá.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Chỉ số màu sắc: 2 tuần/ lần.

- Các chỉ tiêu chất lượng nước: Hàm lượng oxy hòa tan (mg/L), pH, nhiệt độ nước, hàm lượng amonia (mg/L), NO₂.

- Kết quả dự kiến đạt được: liều lượng, bổ sung hiệu quả nhất của astaxanthin vào thức ăn cho cá đĩa đỏ.

2.5. Xử lý số liệu

- Các số liệu được xử lý và xác định ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2013, phần mềm xử lý Statgraphics (Statistics graphics system). Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$ (p : Probability) của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau.

- Các số liệu được tính trung bình và dùng sai số chuẩn của giá trị trung bình để tính sai số. Trình bày số liệu MEAN \pm SE.

- Dùng phần mềm Design Expert 7.0.

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

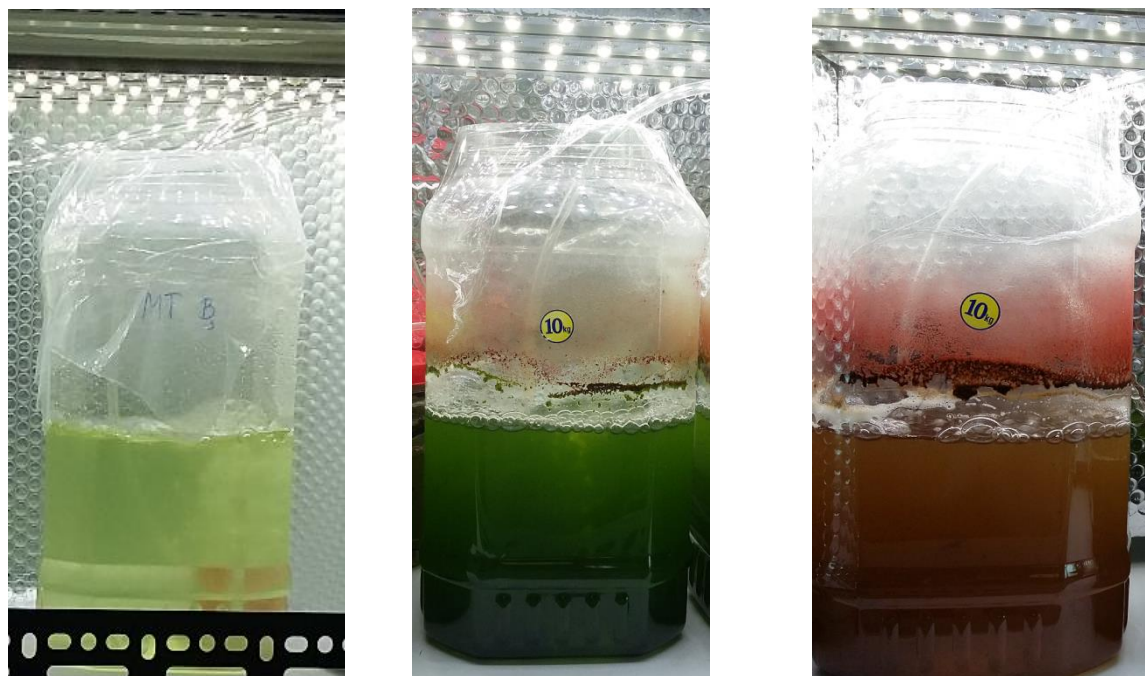
3.1. Nghiên cứu thu nhận astaxanthin trên tảo *H. pluvialis*

3.1.1. Hình thái tế bào và các giai đoạn đặc trưng của tảo *H. pluvialis*

Nhiều công trình nghiên cứu về vòng đời của vi tảo *H. pluvialis* đã chỉ ra rằng sinh trưởng của loài tảo này trải qua 4 giai đoạn với hình thái, kích thước và hàm lượng sắc tố khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã quan sát được 4 giai đoạn sinh trưởng cơ bản của tảo: giai đoạn tế bào (TB) sinh dưỡng, giai đoạn tạo bào nang, giai đoạn TB nang hoàn chỉnh và giai đoạn nảy mầm. Ở điều kiện thuận lợi, tế bào tảo chủ yếu ở dạng sinh dưỡng hình elip màu xanh, có hai roi, chuyển động được, tảo phân chia tế bào để gia tăng số lượng, kích thước tế bào nhỏ khoảng 12 - 13nm, dạng tế bào này chiếm chủ yếu trong 12 ngày nuôi đầu tiên. Giai đoạn này, hàm lượng chlorophyll a trong tảo cao và hàm lượng carotenoid trong tế bào tảo thấp. Từ 12 đến 14 ngày nuôi tiếp theo, tảo chuyển sang giai đoạn tạo bào nang non, đây là dạng tế bào hình khối cầu, màu xanh, mất hai roi, không có khả năng chuyển động.

Khi gặp điều kiện bất lợi như thiếu hụt dinh dưỡng, cường độ ánh sáng cao, v.v., tế bào tảo chuyển sang giai đoạn nang bào tử, kích thước tế bào tăng đột ngột, tích lũy astaxanthin cao và hàm lượng chlorophyll a trong tế bào ở giai đoạn này giảm. Trong nghiên cứu này, từ 14 đến 20 ngày nuôi tiếp theo, tảo chuyển sang giai đoạn tạo bào nang, kích thước tế bào tăng lên khoảng 38 – 40nm nội chất bên trong tế bào có màu nâu do tảo bắt đầu tích lũy astaxanthin. Sau 18 ngày nuôi, các tế bào tảo chuyển sang dạng nang hoàn chỉnh, có màu đỏ đậm và sắc tố chủ yếu là astaxanthin.

Tế bào tảo ở trạng thái nang hoàn chỉnh khi gặp môi trường nuôi mới với các điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng, tảo sẽ chuyển sang giai đoạn nảy mầm. Ở giai đoạn này, hình thái và cấu tạo tế bào có sự thay đổi từ hình cầu chuyển sang hình elip có 2 roi và di chuyển được. Ngoài ra màu sắc bên trong tảo biến đổi từ đỏ đậm sang màu nâu và cuối cùng là màu xanh để bắt đầu một chu kỳ mới.



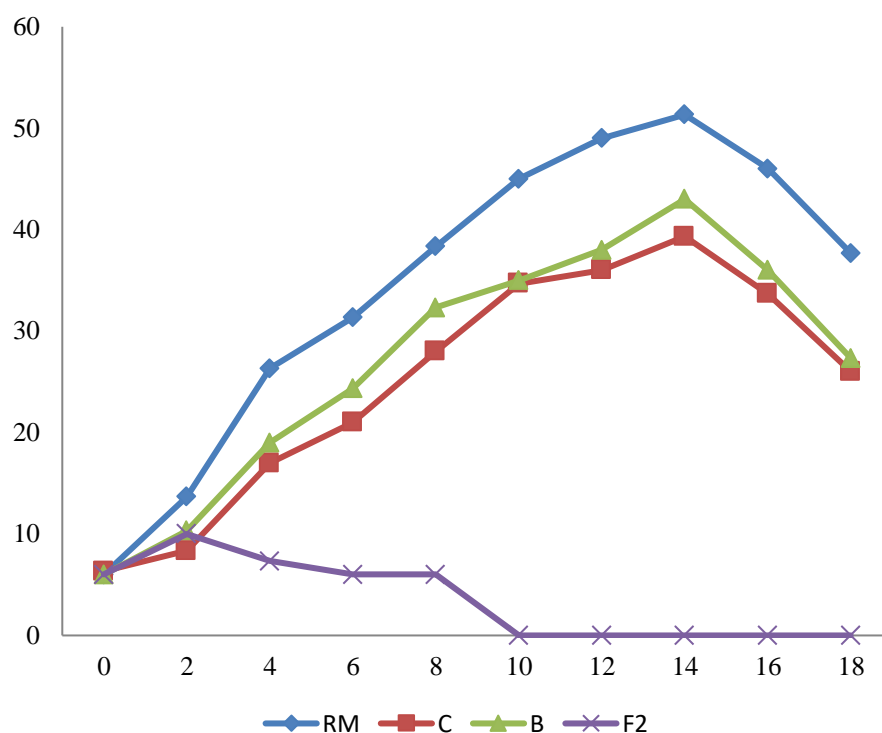
Hình 3. 1: Sự thay đổi màu sắc của tảo *H. pluvialis* (quy mô nuôi 10 lít)

3.1.2. Ảnh hưởng của các môi trường dinh dưỡng lên mật độ và trọng lượng khô của tảo *H. pluvialis*

Bảng 3. 1: Mật độ tế bào của *H. pluvialis* ở 4 loại môi trường RM, C, B và F2 ($\times 10^4$)

| NT | Ngày thí nghiệm | | | |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | 0 | 12 | 14 | 18 |
| RM | 6,00 \pm 1,00 ^a | 49,00 \pm 1,00 ^a | 51,33 \pm 1,16 ^a | 37,67 \pm 2,51 ^a |
| C | 6,33 \pm 1,53 ^a | 36,00 \pm 1,73 ^b | 39,33 \pm 2,08 ^b | 26,00 \pm 7,21 ^b |
| B | 6,00 \pm 0,00 ^a | 38,00 \pm 2,00 ^b | 43,00 \pm 1,00 ^b | 27,33 \pm 0,56 ^{ab} |
| F2 | 6,00 \pm 1,00 ^a | 0,00 \pm 0,00 ^c | 0,00 \pm 0,00 ^c | 0,00 \pm 0,00 ^c |

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn của từng nghiệm thức, số liệu trên cùng cột có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

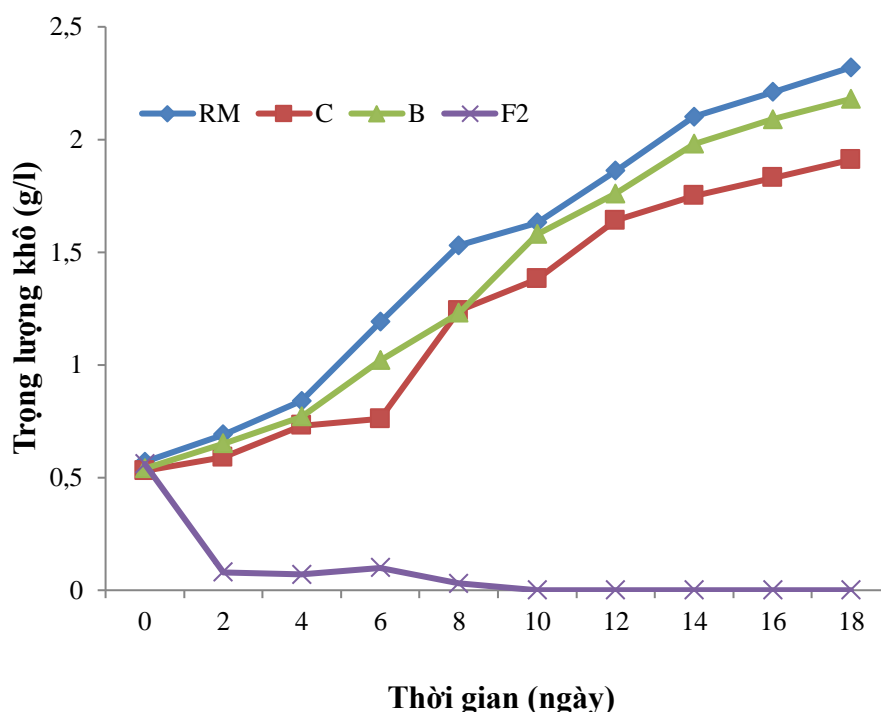


Hình 3. 2: Sự thay đổi mật độ tế bào của *H. pluvialis* ở 4 loại môi trường RM, C, B và F2

Bảng 3. 2: Trọng lượng khô của *H. pluvialis* ở 4 loại môi trường RM, C, B và F2

| NT | Ngày thí nghiệm | | | |
|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0 | 12 | 14 | 18 |
| RM | 0,57 ± 0,05 ^a | 1,86 ± 0,01 ^a | 2,10 ± 0,08 ^a | 2,32 ± 0,14 ^a |
| C | 0,53 ± 0,11 ^a | 1,64 ± 0,34 ^a | 1,75 ± 0,10 ^a | 1,91 ± 0,07 ^b |
| B | 0,54 ± 0,15 ^a | 1,74 ± 1,00 ^a | 1,98 ± 1,56 ^a | 2,18 ± 0,06 ^a |
| F2 | 0,56 ± 0,01 ^a | 0,00 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^c |

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của từng nghiệm thức, số liệu trên cùng cột có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Hình 3. 3: Trọng lượng khô của *H. pluvialis* ở 4 loại môi trường RM, C, B và F2

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của bốn loại môi trường dinh dưỡng khác nhau lên sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* được đánh giá thông qua mật độ tế bào (MĐTB) và trọng lượng khô được trình bày qua Hình 3.3 và 3.4.

Trong 14 ngày nuôi cấy đầu MĐTB tăng dần và đạt cực đại vào ngày nuôi thứ 14, sau đó mật độ giảm dần. Ngược lại, trọng lượng khô của tảo lại có xu hướng tăng dần theo thời gian nuôi. Điều này được giải thích là khi MĐTB tảo vào pha ổn định (ngày nuôi thứ 14) tế bào tảo giảm phân chia và tảo chuyển từ giai đoạn tế bào sinh dưỡng sang giai đoạn tạo bào nang nên kích thước tế bào giai đoạn này bắt đầu tăng lên do vậy mà trọng lượng khô của tảo cũng tăng dần.

Kết quả chúng tôi ghi nhận qua Bảng 3.1 và Hình 3.3 cho thấy, tảo có khả năng sinh trưởng, phát triển trên cả ba môi trường RM, C và B trong khi đó ở môi trường F2 thì không thích hợp cho sự phát triển của tảo, trong môi trường F2 tảo sinh trưởng kém có hiện tượng lắng đáy và tàn lụi vào ngày nuôi thứ 10. Tuy nhiên, trong ba môi trường RM, B, C ở cùng thời điểm khảo sát chúng ta thấy MĐTB khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Môi trường RM tảo sinh trưởng và đạt MĐTB cao nhất là $5,13 \times 10^5$ TB/ ml, kế đến là môi trường B với mật độ $4,3 \times 10^5$ TB/ ml và thấp nhất là môi trường C với mật độ là $3,93 \times 10^5$ TB/ ml. Như vậy, sự sinh trưởng và phát triển của tảo ở các môi

trường dinh dưỡng là khác nhau điều này có thể do thành phần dinh dưỡng trong môi trường đã ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm.

Theo công bố của nhiều tác giả trên thế giới thì nitrate đã được xem là một trong những nguồn nitơ tốt nhất cho sinh trưởng của *H. pluvialis* (Yuan và Chen, 2001). Đồng thời, nồng độ nitrate thích hợp trong môi trường cũng giúp kéo dài trạng thái sinh dưỡng của tế bào vi tảo (Ranjbar và cs., 2008). Thành phần môi trường RM, B và C trong nghiên cứu không khác nhau nhiều nhưng có sự chênh lệch về nồng độ khá lớn đặc biệt là nồng độ nitrate trong môi trường RM cao gấp 300 lần nồng độ nitrate trong môi trường C và tương đương với môi trường B. Điều này có thể là nguyên nhân dẫn đến tảo có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường RM và B hơn môi trường C. Ở môi trường F2 mặc dù trong thành phần môi trường có chứa nitrate (thấp hơn RM 4 lần) nhưng thành phần môi trường rất khác biệt so với môi trường RM, C và B.

Bên cạnh MĐTB thì trọng lượng khô của tảo cũng chịu ảnh hưởng từ 4 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau. Trọng lượng khô của tảo đạt cao nhất là 2,32 g/l ở môi trường RM sau 18 ngày nuôi cấy và khác biệt có ý nghĩa so với các môi trường còn lại. Kết quả thí nghiệm chúng tôi thu được phù hợp với công bố của Đặng Diễm Hồng và cs., (2010) đã xác định môi trường RM là tối ưu cho quá trình sinh trưởng của *H. pluvialis* khi nuôi ở bình thể tích 10 lít. Tuy nhiên MĐTB và trọng lượng khô trong nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và cs., (2010) lần lượt là $38,3 \times 10^4$ TB/ml, 1,86 g/l thấp hơn so với kết quả của chúng tôi, điều này có thể do điều kiện bố trí chúng tôi tối ưu hơn như cung cấp thêm CO₂ cho tảo quang hợp và sục khí liên tục trong thời gian thí nghiệm.

3.1.3. Ảnh hưởng của các môi trường dinh dưỡng lên hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin của tảo *H. pluvialis*

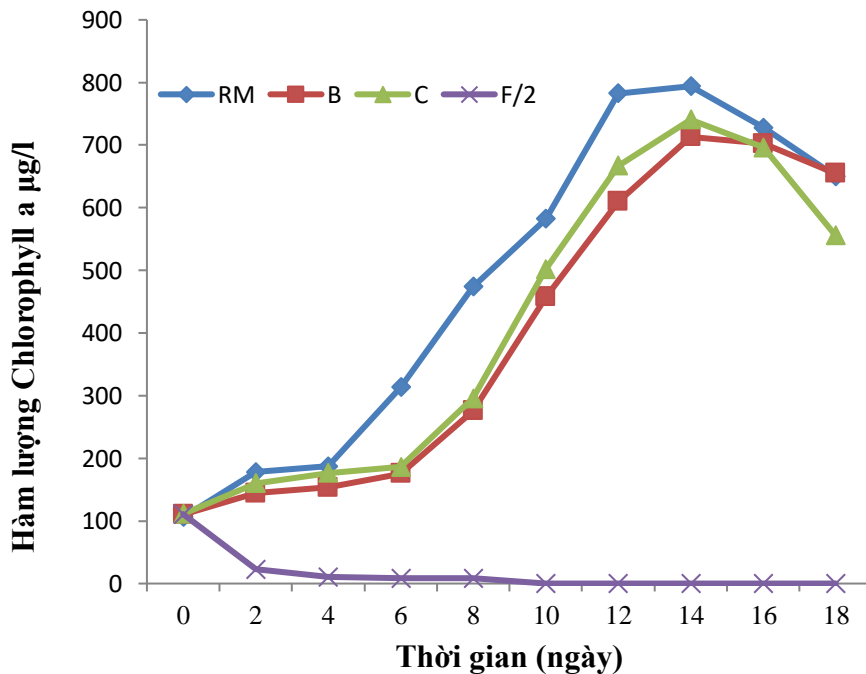
Song song với việc theo dõi MĐTB và trọng lượng khô của tảo, sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin của loài tảo này cũng được trình bày qua Hình 3.5 và 3.6. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin có sự thay đổi rõ nét theo hướng ngược chiều nhau trong suốt thời gian nuôi cấy. Hàm lượng chlorophyll a trong tế bào tăng dần theo thời gian nuôi cấy và đạt giá trị cực đại vào ngày nuôi thứ 14. Sau đó, hàm lượng này giảm dần ở những ngày nuôi cấy tiếp theo. Kết quả ghi nhận của chúng tôi phù hợp với công bố của Sperry (1970) đã kết luận rằng hàm lượng chlorophyll a có xu hướng giảm dần trong quá trình tích lũy astaxanthin.

Ngược lại thì hàm lượng astaxanthin lại tăng dần trong suốt thời gian thí nghiệm và sắc tố này đạt cực đại khi thời gian nuôi cấy sau 18 ngày, đây là lúc môi trường trở nên thiếu dinh dưỡng thích hợp cho quá trình tích lũy astaxanthin trong tế bào tảo.

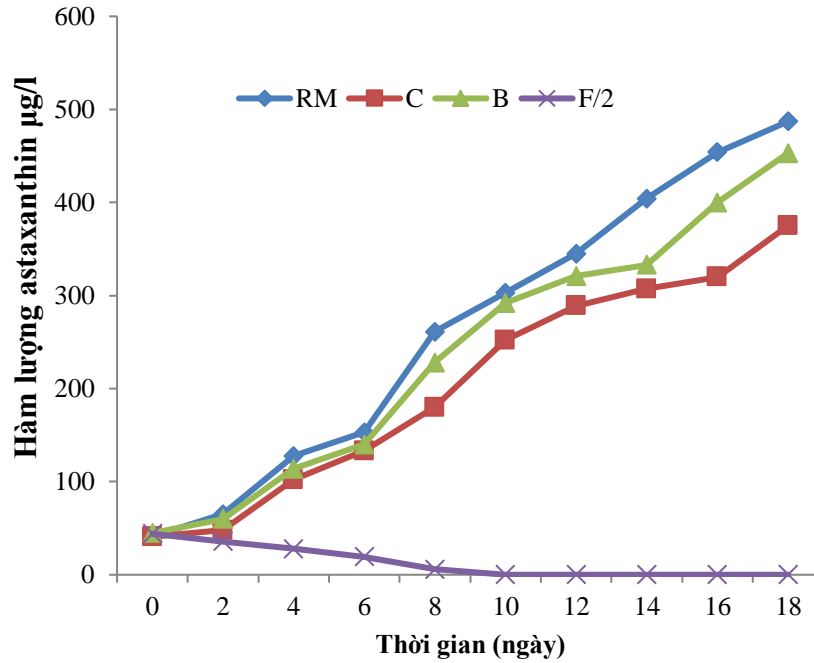
Bảng 3. 3: Hàm lượng chlorophyll a của *H. pluvialis* trong 4 môi trường nuôi cấy

| NT | Ngày thí nghiệm | | | |
|----|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | 0 | 12 | 14 | 18 |
| RM | 105,8 ± 8,61 ^a | 782,25 ± 2,7 ^a | 794,01 ± 29,01 ^a | 650,4 ± 58,78 ^a |
| C | 110,15 ± 24,02 ^a | 609,62 ± 144,2 ^a | 713,05 ± 103,69 ^a | 654,97 ± 32,41 ^a |
| B | 111,15 ± 22,83 ^a | 667,13 ± 120,7 ^a | 740,53 ± 65,07 ^a | 555,68 ± 16,04 ^a |
| F2 | 110,73 ± 22,64 ^a | 0,00 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^b |

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của từng nghiệm thức, số liệu trên cùng cột có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



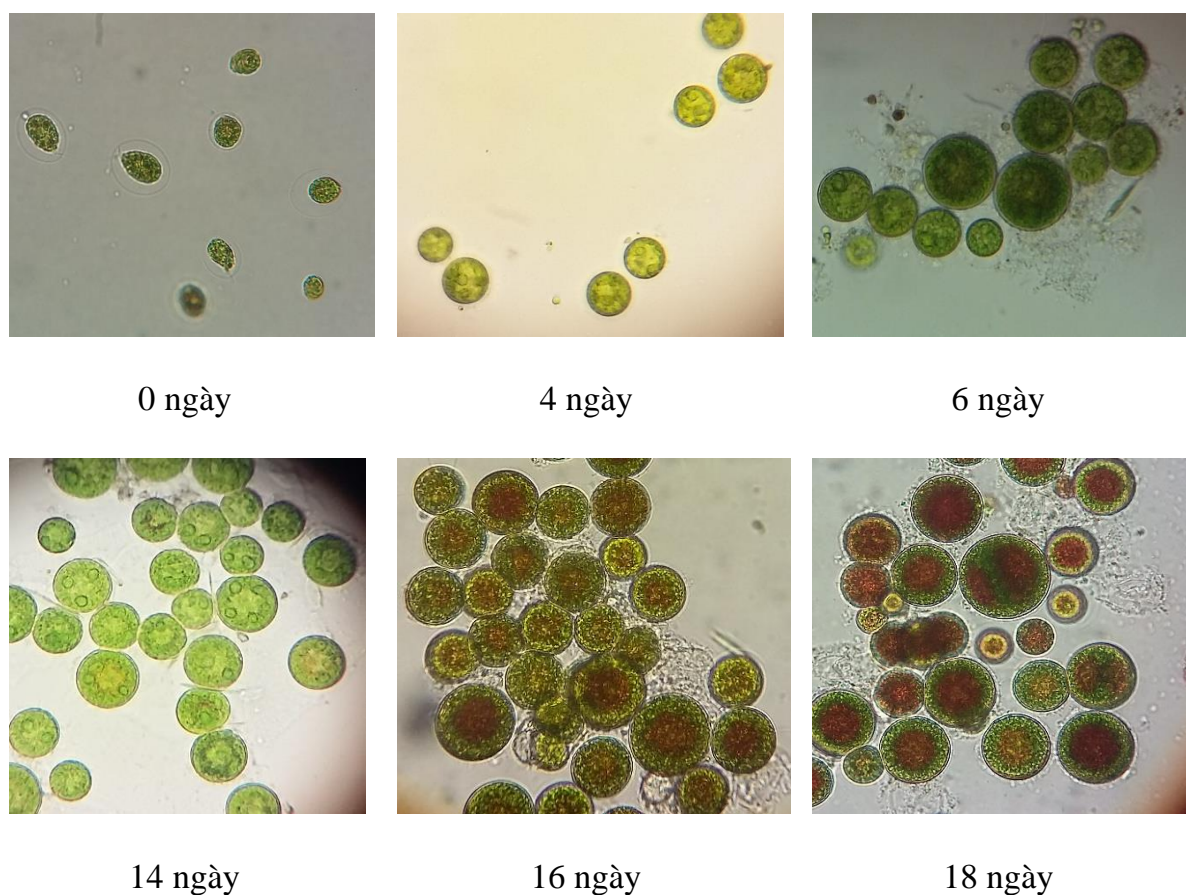
Hình 3. 1: Sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a của *H. pluvialis* trong 4 môi trường nuôi cấy



Hình 3. 2: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* trong 4 môi trường nuôi cấy

MĐTB và trọng lượng khô của tảo trong môi trường F2 là thấp nhất, thì hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin cũng thấp tương ứng. Sự thay đổi hàm lượng sắc tố trong ba môi trường còn lại cũng xảy ra tương tự với sự thay đổi MĐTB và trọng lượng khô của tảo.

Hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin của tảo trong môi trường C đạt chỉ số là 713,05 µg/l và 375 µg/l thấp hơn so với tảo trong môi trường B là 740,53 µg/l và 453 µg/l, môi trường RM có giá trị cao nhất tương ứng là 794,03 µg/l và 487 µg/l. Kết quả về sự thay đổi hàm lượng sắc tố astaxanthin trong 4 môi trường nuôi cấy của chúng tôi tương đương với kết quả của Đinh Đức Hoàng và cs., (2011) cũng nhận định rằng tảo nuôi cấy trong môi trường RM có hàm lượng sắc tố là cao nhất.



Hình 3. 3: Mật độ tế bào thay đổi theo thời gian thí nghiệm (x 400 lần)

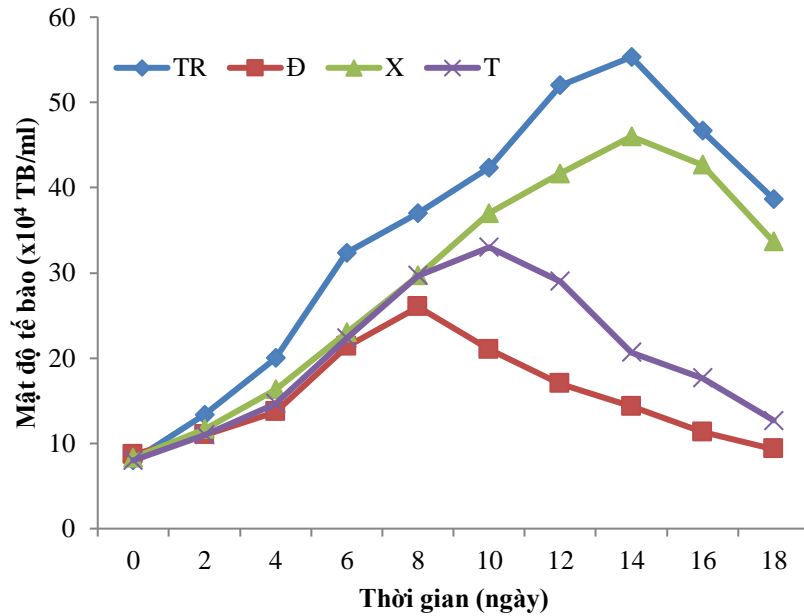
3.1.4. Ảnh hưởng ánh sáng đến vòng đời tăng trưởng của *H. pluvialis* (qui mô 10 lít)

Sự thay đổi các thông số nghiên cứu như MĐTB, trọng lượng khô và hàm lượng sắc tố của *H. pluvialis* với 4 loại ánh sáng khác nhau được thể hiện rõ trên Hình 3.8, 3.9, 3.10 và 3.11. Kết quả nghiên cứu cho thấy, MĐTB và hàm lượng chlorophyll a đạt cực đại là $5,53 \times 10^5$ TB/ml và $4,6 \times 10^5$ TB/ml; $777,34 \mu\text{g/l}$ và $664,52 \mu\text{g/l}$ tương ứng trên ánh sáng trắng và xanh vào ngày nuôi thứ 14, sau đó có xu hướng giảm dần theo thời gian nuôi. Khác với xu hướng thay đổi mật độ tế bào, trọng lượng khô và hàm lượng astaxanthin có chiều hướng tăng dần và cao nhất vào ngày nuôi thứ 18 của ánh sáng trắng là $2,35 \text{ g/l}$ và $469,33 \mu\text{g/l}$, ánh sáng xanh là $1,9 \text{ g/l}$ và $412 \mu\text{g/l}$ tương ứng. Đối với ánh sáng tím và đỏ thì MĐTB đạt cao vào ngày nuôi thứ 8 - 10 khoảng $2,6 - 3,3 \times 10^5$ TB/ml và sau đó tảo giảm nhanh, quan sát chúng tôi ghi nhận ở ánh sáng đỏ và tím tảo có màu nhạt dần và đa số tảo bị chết. Bên cạnh đó, hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin của tảo ở nghiệm thức ánh sáng tím, đỏ cũng thấp nhất và đều giảm dần theo thời gian thí nghiệm.

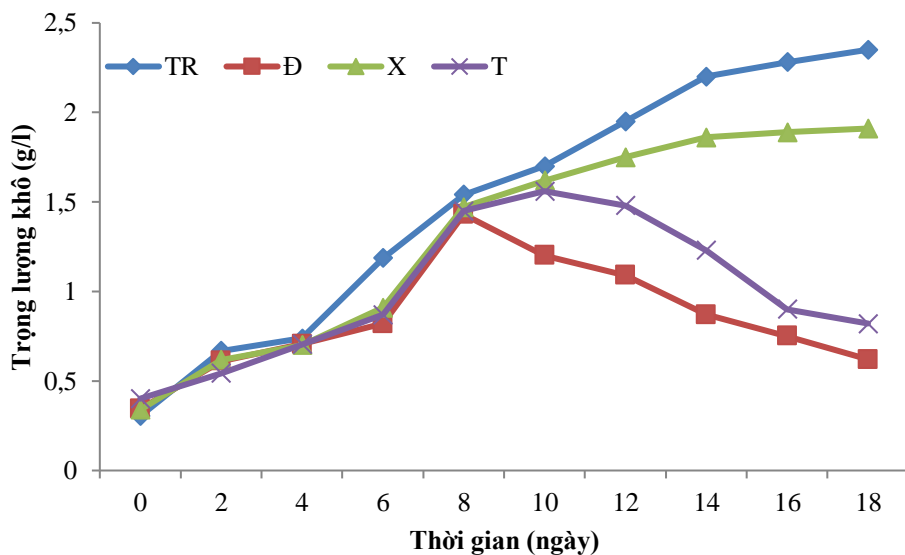
Như vậy, ở các loại ánh sáng khác nhau đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát

triển của tảo *H. pluviialis*. Điều này có thể do sự khác nhau về bước sóng, màu sắc của các ánh sáng đã ảnh hưởng đến nhiệt độ trong nuôi tảo.

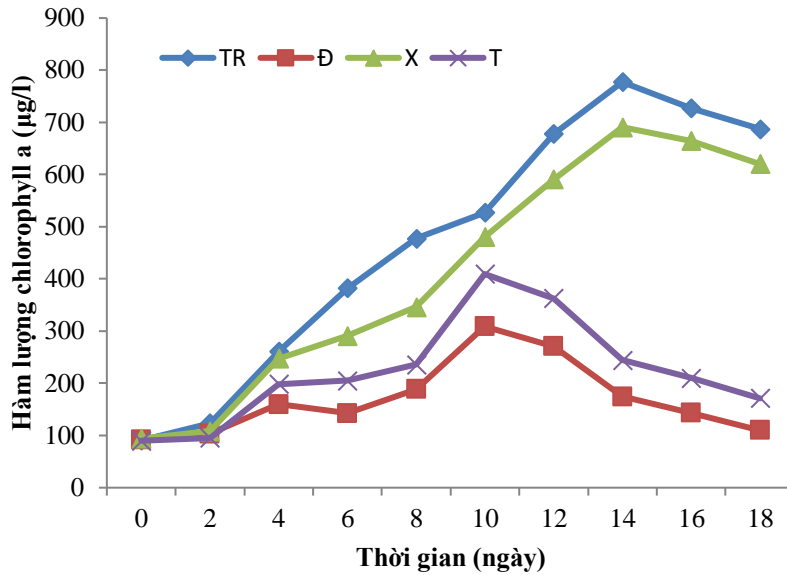
Ở ánh sáng đỏ với bước sóng cao ($610 < \lambda < 760$) nên nhiệt độ tảo ghi nhận là trên 40°C giá trị này cao hơn rất nhiều với giới hạn sinh trưởng của tảo *H. pluviialis* (nhiệt độ thích hợp cho tảo sinh trưởng khoảng $25 - 28^{\circ}\text{C}$) nên xảy ra hiện tượng tảo chết nhiều ở nghiệm thức này. Ánh sáng tím với bước sóng thấp ($\lambda < 380$) cũng không thích hợp cho tảo phát triển. Ở nghiệm thức ánh sáng trắng và xanh (bước sóng $500 < \lambda < 570$), nhiệt độ tảo là $25 - 26^{\circ}\text{C}$ nên thích hợp cho tảo trong thời gian thí nghiệm.



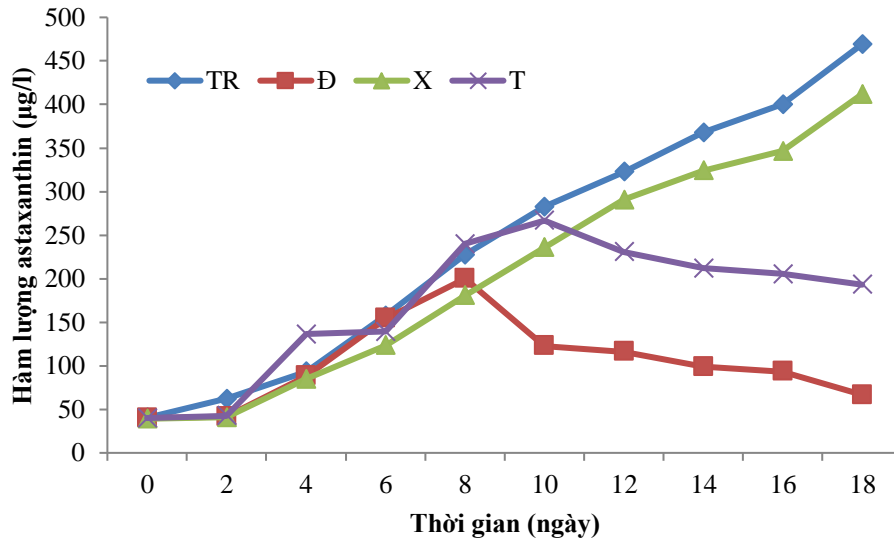
Hình 3. 4: Sự biến động mật độ tế bào của *H. pluviialis* dưới các loại ánh sáng khác nhau



Hình 3. 5: Trọng lượng khô của *H. pluviialis* ở 4 loại ánh sáng khác nhau



Hình 3. 6: Sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a của *H. pluvialis* ở 4 loại ánh sáng khác nhau



Hình 3. 7: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* ở 4 loại ánh sáng khác nhau

3.1.5. Ảnh hưởng của chế độ ánh sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*

Quá trình tế bào tảo *H. pluvialis* chuyển từ dạng sinh dưỡng sang dạng bào nang tổng hợp astaxanthin có thể thực hiện theo hai cách khác nhau. Một là qui trình nuôi tảo một pha: nuôi tảo trong môi trường cho đến khi dịch tảo chuyển sang màu đỏ do cạn kiệt môi trường dinh dưỡng. Ở hình thức này thời gian nuôi tảo kéo dài khoảng 30 ngày và hàm lượng astaxanthin tích lũy chưa cao. Hai là áp dụng qui trình nuôi tảo *H. pluvialis* 2 pha trong đó pha một nuôi cấy tảo dưới điều kiện tối ưu để đạt mật độ tế bào cực đại, sau đó tảo được chuyển vào pha 2 có các điều kiện thuận lợi cho việc tích lũy astaxanthin

đã được chứng minh là mô hình hiệu quả để thu được sinh khối *H. pluvialis* giàu astaxanthin (Olaizola, 2000).

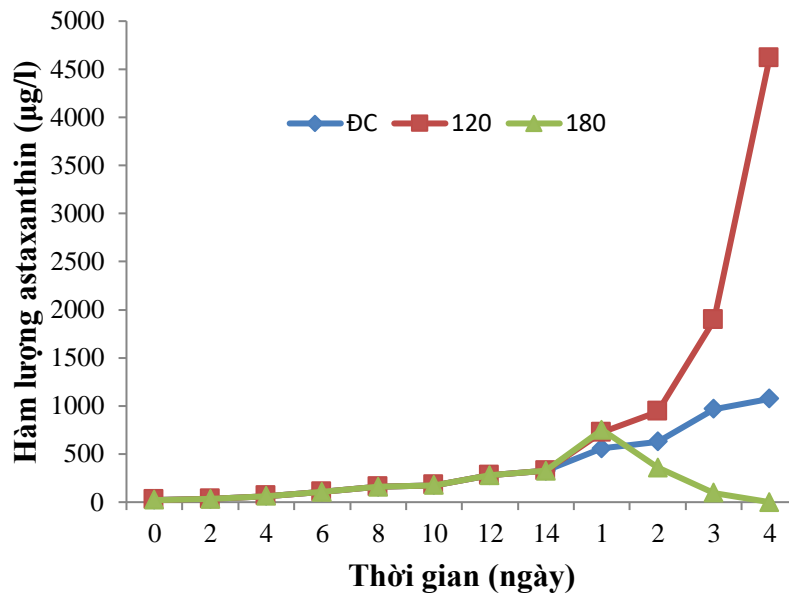
Trong thí nghiệm nuôi cấy 2 pha với pha 2 sức cường độ chiếu sáng và thời gian chiếu sáng, chúng tôi đã tiến hành theo đúng qui trình trên. Trong 14 ngày đầu tảo được nuôi trong điều kiện tối ưu cho đến khi tảo đi vào pha ổn định với mật độ tế bào cực đại. Tiếp theo, tảo được chuyển sang điều kiện sức cường độ chiếu sáng và thời gian chiếu sáng để kích thích tế bào chuyển sang giai đoạn bào xác có thể tích lũy astaxanthin cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự thay đổi hàm lượng astaxanthin trong 2 pha của thí nghiệm được trình bày qua Hình 3.12 - 3.15.

3.1.6. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*

Bảng 3. 4: Hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* khi gây sốc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau

| Ngày | Thí nghiệm | | |
|------|--|---|---|
| | ĐC ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) | 120 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) | 180 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) |
| 14 | $324,8 \pm 0,00^a$ | $324,8 \pm 0,00^a$ | $324,8 \pm 0,00^a$ |
| 1 | $558,93 \pm 26,06^b$ | $724,27 \pm 16,03^a$ | $752,53 \pm 33,57^a$ |
| 2 | $628,27 \pm 16,11^b$ | $942,4 \pm 31,96^a$ | $360 \pm 54,19^c$ |
| 3 | $968,53 \pm 54,19^b$ | $1891,2 \pm 3,2^a$ | $96 \pm 135,1^c$ |
| 4 | $1073,6 \pm 66,7^b$ | $4618,67 \pm 12,1^a$ | $0,00 \pm 0,00^c$ |

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn của từng thí nghiệm, số liệu trên cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Hình 3. 8: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* khi gây sốc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau

Sự thay đổi về hàm lượng sắc tố astaxanthin được trình bày qua Bảng 3.4 và Hình 3.12. Kết quả cho thấy, hàm lượng astaxanthin của công thức đối chứng và thí nghiệm có xu hướng tăng dần trong cả 2 pha. Tuy nhiên, khi có sử dụng tác nhân gây sốc là cường độ ánh sáng cao ở pha II thì hàm lượng astaxanthin tăng đột biến và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa công thức đối chứng và thí nghiệm.

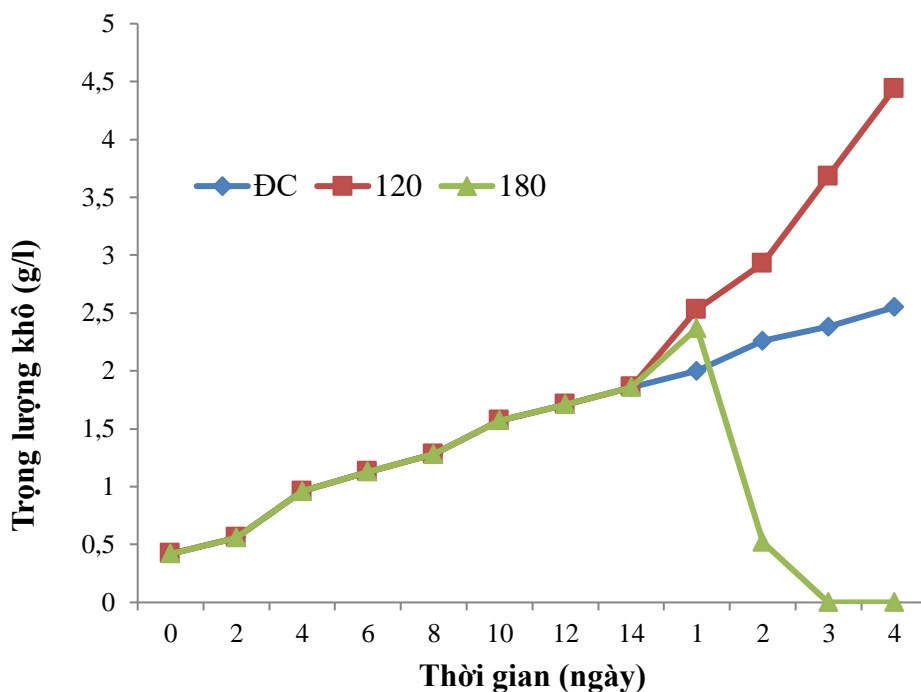
Sau bốn ngày gây stress, ở nghiệm thức cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ thì hàm lượng astaxanthin cao nhất với giá trị là 4618,67 $\mu\text{g}/\text{l}$, ở nghiệm thức đối chứng với cường độ chiếu sáng 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ thì hàm lượng astaxanthin thu được là 1073,6 $\mu\text{g}/\text{l}$. Riêng ở nghiệm thức có cường độ chiếu sáng là 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ thì hàm lượng astaxanthin lại giảm nhanh trong pha nuôi thứ hai, ở nghiệm thức này cường độ ánh sáng bị thay đổi cao nên đa phần tảo bị lắng đáy và chết dần. Như vậy, ở các cường độ chiếu sáng khác nhau đã ảnh hưởng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của tảo *H. pluvialis*. Điều này có thể do tương ứng với cường độ ánh sáng cao thì nhiệt độ nuôi tảo cũng tăng theo, kết quả chúng tôi ghi nhận ở nghiệm thức cường độ chiếu sáng là 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ nhiệt độ là trên 40⁰C đây là giá trị cao hơn rất nhiều so với giới hạn sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* (25 - 28⁰C). Ở nghiệm thức cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ nhiệt độ là 35⁰C, đây là nhiệt độ phù hợp cho sự tích lũy astaxanthin. Ở nghiệm thức đối chứng nhiệt độ được duy trì là 25⁰C. Kết quả của chúng tôi tương đương với kết quả của một số công trình đã công bố như cường độ ánh sáng cao là một trong những

yếu tố hiệu quả để kích thích tổng hợp astaxanthin do đó thường được dùng để tăng sản xuất astaxanthin (Choi và cs., 2011). Cường độ ánh sáng trong khoảng từ 60 đến 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, các tế bào tảo *H. pluvialis* tăng trưởng tốt nhất, trong khi cường độ ánh sáng thấp hơn từ 15 đến 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ hoặc cao hơn 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ tảo tăng trưởng kém (Park, 2011). Theo báo cáo của Tripathi và cộng sự (2002) (trích Smith, 1950) thì nhiệt độ thích hợp cho sự tích lũy astaxanthin là 35°C trong điều kiện này thì tế bào vi tảo sinh trưởng dị dưỡng.

Bảng 3. 5: Trọng lượng khô của *H. pluvialis* khi gây sốc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau

| Ngày | Nghiệm thức | | |
|------|--|---|---|
| | ĐC ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) | 120 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) | 180 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) |
| 14 | 1,86 ± 0,00 ^a | 1,86 ± 0,00 ^a | 1,86 ± 0,00 ^a |
| 1 | 2,00 ± 0,06 ^a | 2,53 ± 0,26 ^a | 2,37 ± 0,29 ^a |
| 2 | 2,26 ± 0,04 ^a | 2,93 ± 0,33 ^a | 0,52 ± 0,27 ^b |
| 3 | 2,38 ± 0,25 ^b | 3,68 ± 0,39 ^a | 0,00 ± 0,00 ^c |
| 4 | 2,55 ± 0,58 ^b | 4,44 ± 0,21 ^a | 0,00 ± 0,00 ^c |

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của từng nghiệm thức, số liệu trên cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Hình 3. 9: Trọng lượng khô của *H. pluvialis* khi sóc bằng cường độ chiếu sáng khác nhau

Trọng lượng khô của tảo cũng biến thiên tương tự với hàm lượng astaxanthin ở các nghiệm thức có cường độ chiếu sáng khác nhau trong thí nghiệm. Sau bốn ngày gây stress, trọng lượng khô của tảo ở nghiệm thức cường độ chiếu sáng $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ và nghiệm thức đối chứng là $4,44 \text{ g/l}$ và $2,55 \text{ g/l}$ tương ứng.

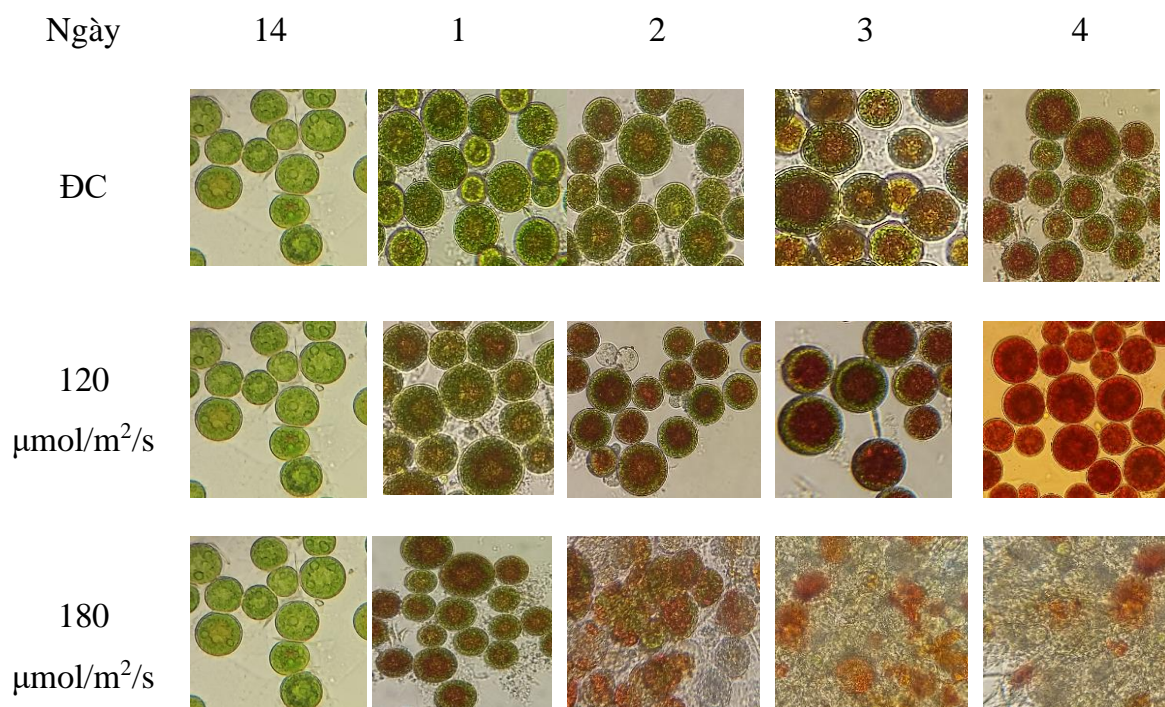
Quan sát kích thước tế bào tảo, chúng tôi nhận thấy ở ngày thứ 4 của nghiệm thức có cường độ chiếu sáng $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ tế bào tảo đã chín hoàn toàn kích thước tế bào lớn. Cùng thời điểm khảo sát thì ở nghiệm thức đối chứng phần lớn tế bào tảo còn ở trạng thái tạo bào nang và một số ít tế bào tích lũy astaxanthin. Nên có thể là lý do làm cho trọng lượng khô của tảo ở nghiệm thức cường độ chiếu sáng $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ cao gấp 1,7 lần so với nghiệm thức đối chứng. Ở nghiệm thức có cường độ chiếu sáng $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ thì phần lớn tảo chết vào ngày thứ hai gây sóc nên trọng lượng khô của tảo cũng có chiều hướng giảm dần trong thời gian thí nghiệm.

Bảng 3. 6: % astaxanthin/trọng lượng khô của tảo *H. pluvialis* ở cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

| Thời gian (ngày) | Trọng lượng khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin ($\mu\text{g}/\text{l}$) | % astaxanthin/TLK |
|---------------------|--------------------------|---|-------------------|
| 0 | 0,42 | 22,40 | 0,01 |
| 14 | 1,86 | 324,80 | 0,02 |
| 1 | 2,53 | 724,27 | 0,03 |
| 2 | 2,93 | 942,40 | 0,03 |
| 3 | 3,68 | 1.891,20 | 0,05 |
| 4 | 4,44 | 4.618,67 | 0,10 |

Kết quả chúng tôi ghi nhận qua Bảng 3.6 cho thấy, sinh khối tảo chứa astaxanthin tăng dần theo thời gian thí nghiệm, tại thời điểm kết thúc thí nghiệm (sau khi gây sốc 4 ngày) tế bào tảo đã chín hoàn toàn thì giá trị này cao gấp 10 lần so với lúc bắt đầu bố trí thí nghiệm. Tuy nhiên, sinh khối tảo chứa astaxanthin trong nghiên cứu này cao nhất là 0,1% TLK, mà theo kết luận của Yuan và cs., (2000) cho rằng vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* có khả năng tích lũy astaxanthin lên tới trên 4% trên sinh khối khô. Để đạt được giá trị này trong điều kiện nước ta thì còn nhiều vấn đề phải nghiên cứu.

Một số hình ảnh minh họa cho sự thay đổi kích thước của tế bào và hàm lượng sắc tố tảo *H. pluvialis* được trình bày qua Hình 3.15.



Hình 3. 10: Hình thái tế bào và hàm lượng sắc tố của tảo *H. pluvialis* dưới kính hiển vi

Hình ảnh tế bào chụp trên kính hiển vi quang học cho thấy rõ các dạng tế bào khác nhau trong từng công thức thí nghiệm. Ở công thức đối chứng, tại thời điểm kết thúc thí nghiệm thì phần lớn tảo vẫn còn ở giai đoạn tạo bào nang, trong khi đó ở công thức có cường độ chiếu sáng là $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ chúng tôi ghi nhận tất cả tảo đã ở trạng thái bào nang hoàn chỉnh và tích lũy một lượng lớn astaxanthin trong tế bào. Tuy nhiên, ở cường độ ánh sáng cao $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ thì tế bào tảo bị mất dần sắc tố và bị chết bắt đầu từ ngày thứ 2 sau khi gây sốc tảo.

3.1.7. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*

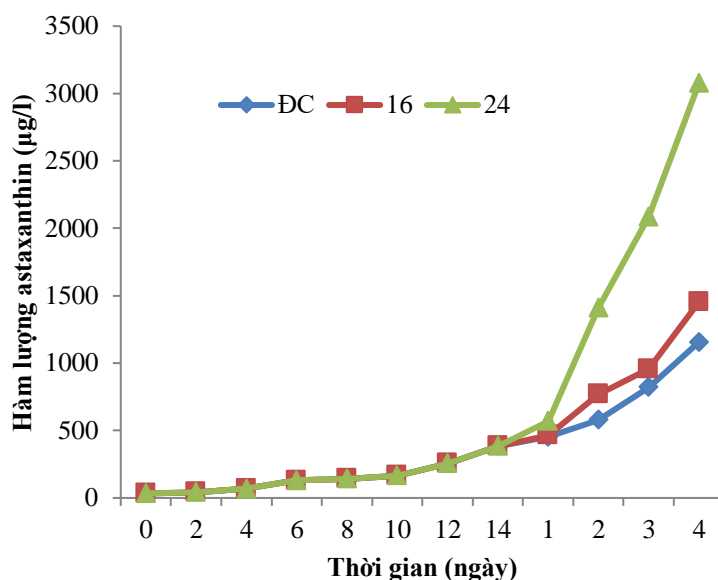
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến hiệu quả tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* được thể hiện qua Hình 3.16. Kết quả cho thấy, hàm lượng astaxanthin của công thức đối chứng và thí nghiệm cũng có xu hướng tăng dần trong cả 2 pha. Tuy nhiên, khi có sử dụng tác nhân gây sốc là thay đổi thời gian chiếu sáng ở pha II thì hàm lượng astaxanthin tăng đột biến và có sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) giữa công thức đối chứng và thí nghiệm. Ở nghiệm thức có thời gian chiếu sáng 24 giờ thì hàm lượng astaxanthin đạt cao nhất với giá trị là $3.076,8 \mu\text{g}/\text{l}$ sau 4 ngày gây sốc. Nghiệm thức có thời gian chiếu sáng là 12 giờ (ĐC) và nghiệm thức với thời gian chiếu sáng 16 giờ thì hàm lượng astaxanthin đạt cực đại tương ứng là $1.454,4 \mu\text{g}/\text{l}$ và $1.156,8$

$\mu\text{g/l}$. Như vậy, việc tăng thời gian chiếu sáng từ 12 lên 24 giờ đã có hiệu quả tích cực đến sự tích lũy astaxanthin của tảo *H. pluvialis*. Cũng giống như thí nghiệm sức cường độ ánh sáng, khi thời gian chiếu sáng tăng lên thì nhiệt độ ở các nghiệm thức cũng tăng lên tương ứng. Nghiệm thức có thời gian chiếu sáng là 16 giờ nhiệt độ ghi nhận là 28°C trong khi ở nghiệm thức có thời gian chiếu sáng là 24 giờ nhiệt độ tăng lên 33°C . Điều này được giải thích là khi gặp điều kiện bất lợi về nhiệt độ, tế bào tảo sẽ chuyển từ dạng sinh dưỡng sang dạng bào xác tích lũy astaxanthin cao. Kết luận này phù hợp với công bố của Boussiba và Vonshak (1991), khi tảo *H. pluvialis* gặp điều kiện bất lợi như cường độ ánh sáng cao, thời gian chiếu sáng dài, nhiệt độ cao (trên 30°C) thì tế bào tảo sẽ có cơ chế tự bảo vệ bằng cách ngừng sinh trưởng hoàn toàn, tế bào chuyển từ trạng thái sinh dưỡng, có màu xanh sang dạng bào xác, màu đỏ và tích lũy astaxanthin trong tế bào.

Bảng 3. 7: Hàm lượng astaxanthin của tảo *H. pluvialis* khi gây sốc bằng thời gian chiếu sáng khác nhau

| Ngày | Nghiệm thức | | |
|------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| | ĐC (giờ) | 16 (giờ) | 24 (giờ) |
| 14 | $384,00 \pm 0,00^a$ | $384,00 \pm 0,00^a$ | $384,00 \pm 0,00^a$ |
| 1 | $453,33 \pm 24,44^a$ | $464 \pm 27,71^a$ | $568,53 \pm 165,89^a$ |
| 2 | $579,73 \pm 84,5^b$ | $767,47 \pm 125,7^b$ | $1409,6 \pm 15,3^a$ |
| 3 | $819,73 \pm 197,8^b$ | $956,27 \pm 184,4^b$ | $2086,4 \pm 518,7^a$ |
| 4 | $1156,8 \pm 144,8^b$ | $1454,4 \pm 42^b$ | $3076,8 \pm 224,8^a$ |

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn của từng nghiệm thức, số liệu trên cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



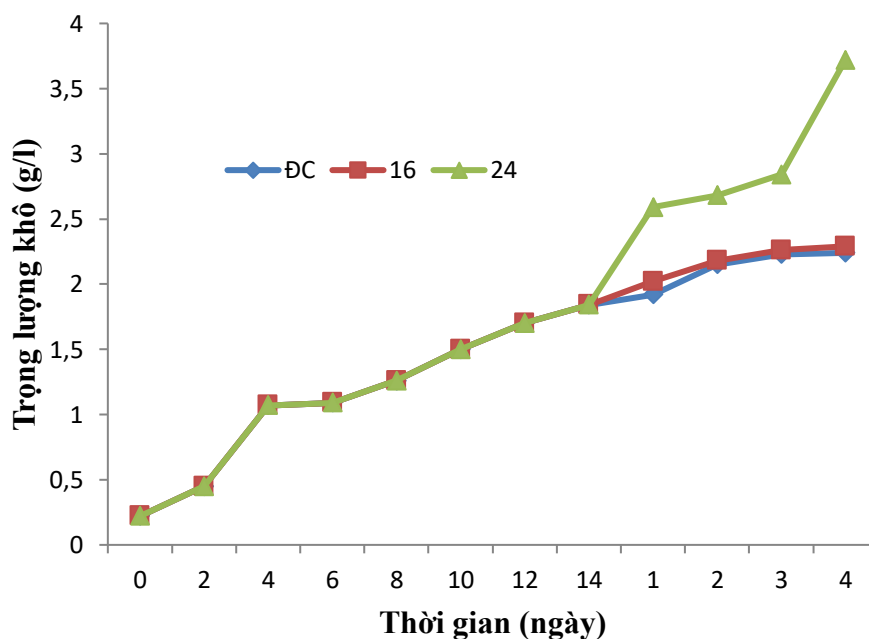
Hình 3. 11: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của tảo *H. pluvialis* khi gây sốc bằng thời gian chiếu sáng khác nhau

Kết quả cho thấy, trong 14 ngày của pha I trọng lượng khô có xu hướng tăng nhẹ và không khác biệt giữa các công thức. Sau đó, tảo được chuyển sang nuôi với thời gian chiếu sáng khác nhau để kích thích tế bào tích lũy astaxanthin. Lúc này trọng lượng khô của tảo trong pha II cũng có xu hướng tăng dần nhưng có sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) giữa công thức đối chứng và thí nghiệm (Bảng 3.8). Ở công thức đối chứng và công thức có thời gian chiếu sáng là 16 giờ thì trọng lượng khô có giá trị tương đương nhau sau bốn ngày gây sốc tương ứng là 2,24 g/l và 2,29 g/l. Công thức có thời gian chiếu sáng là 24 giờ trọng lượng khô thu được là 3,72 g/l cao hơn so với công thức đối chứng và công thức có thời gian chiếu sáng là 16 giờ. Quan sát kích thước tế bào tảo, chúng tôi cũng nhận thấy ở ngày thứ 4 của nghiệm thức có thời gian chiếu sáng là 24 giờ, tế bào tảo đã chín hoàn toàn kích thước tế bào lớn. Cùng thời điểm khảo sát thì ở nghiệm thức đối chứng phần lớn tế bào tảo còn ở trạng thái tạo bào nang và một số ít tế bào tích lũy astaxanthin ở công thức có thời gian chiếu sáng 16 giờ. Điều này có thể là lý do tạo nên sự khác biệt về trọng lượng khô giữa các công thức thí nghiệm.

Bảng 3. 8: Trọng lượng khô của tảo *H. pluvialis* khi gây sốc bằng thời gian chiếu sáng khác nhau

| Ngày | Nghiệm thức | | |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | ĐC (giờ) | 16 (giờ) | 24 (giờ) |
| 14 | 1,84 ± 0,00 ^a | 1,84 ± 0,00 ^a | 1,84 ± 0,00 ^a |
| 1 | 1,92 ± 0,15 ^b | 2,02 ± 0,1 ^b | 2,59 ± 0,11 ^a |
| 2 | 2,15 ± 0,09 ^a | 2,18 ± 0,19 ^a | 2,68 ± 0,38 ^a |
| 3 | 2,23 ± 0,06 ^a | 2,26 ± 0,24 ^a | 2,84 ± 0,9 ^a |
| 4 | 2,24 ± 0,15 ^b | 2,29 ± 0,22 ^b | 3,72 ± 0,06 ^a |

Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của từng nghiệm thức, số liệu trên cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

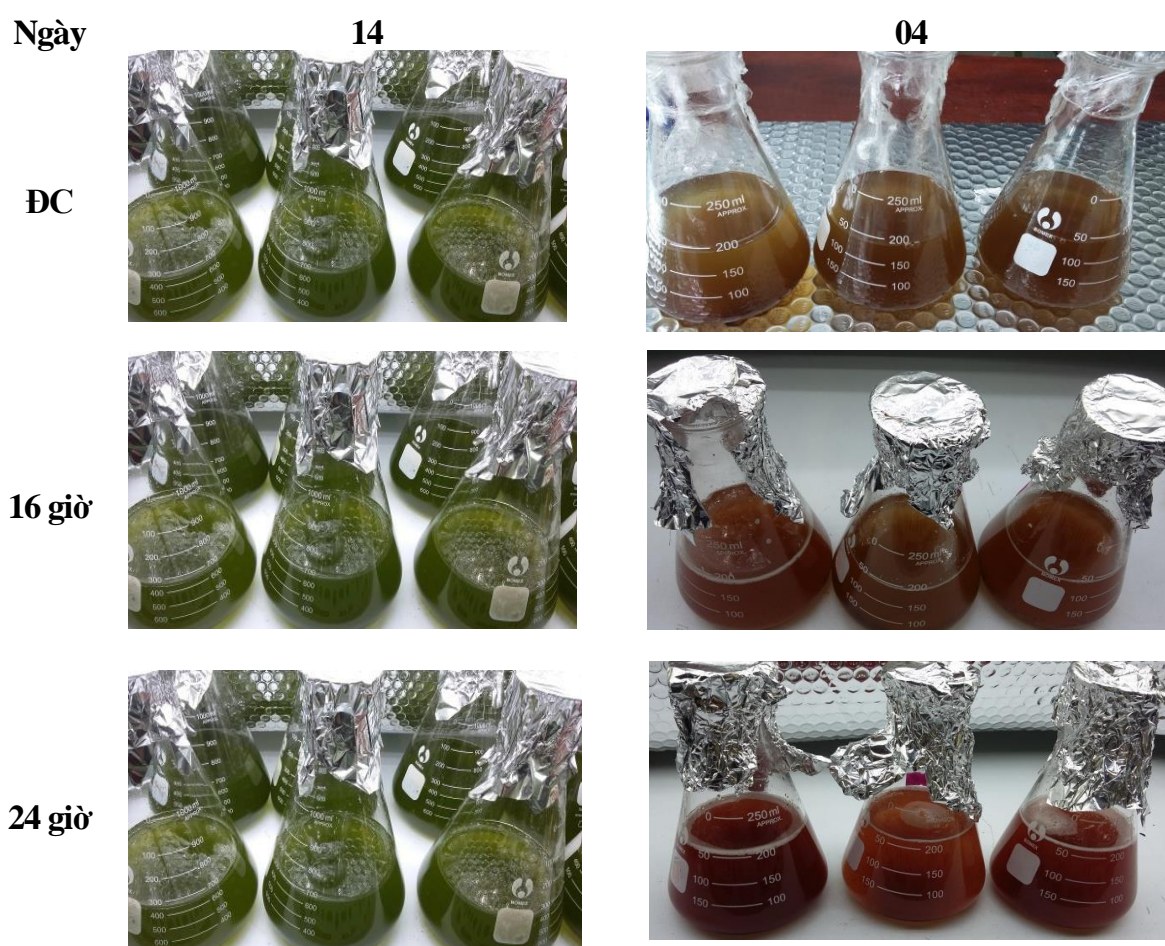


Hình 3. 12: Trọng lượng khô của *H. pluvialis* khi gây sốc bằng thời gian chiếu sáng khác nhau

Cũng giống như kết quả ở thí nghiệm sốc cường độ chiếu sáng, ở công thức có thời gian chiếu sáng 24 giờ tại thời điểm kết thúc thí nghiệm thì sinh khối tảo chứa astaxanthin là 0,08% TLK (Bảng 3.9).

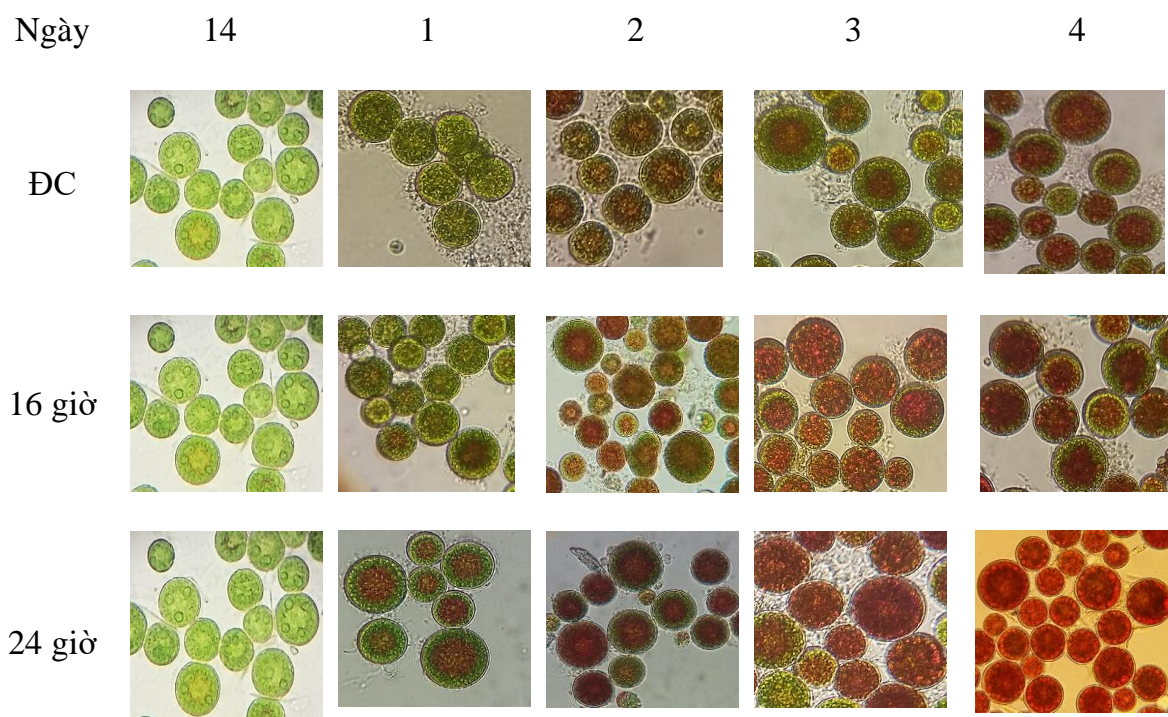
Bảng 3. 9: % astaxanthin/TLK của tảo *H. pluvialis* ở thời gian chiếu sáng là 24 giờ

| Thời gian (ngày) | Trọng lượng khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin ($\mu\text{g/l}$) | % astaxanthin/TLK |
|---------------------|--------------------------|--|-------------------|
| 0 | 0,22 | 33,60 | 0,02 |
| 14 | 1,84 | 384,00 | 0,02 |
| 1 | 2,59 | 568,53 | 0,02 |
| 2 | 2,68 | 1.409,60 | 0,05 |
| 3 | 2,84 | 2.086,40 | 0,07 |
| 4 | 3,72 | 3.076,80 | 0,08 |

**Hình 3. 13:** Sự thay đổi màu sắc của tảo *H. pluvialis* ở các thời gian chiếu sáng khác nhau

Khi sử dụng thời gian chiếu sáng 24 giờ thì sẽ rút ngắn được thời gian của quá trình chuyển giai đoạn từ tế bào sinh dưỡng sang dạng nang bào hoàn chỉnh. Đến ngày thứ 2 sau khi gây sốc, chúng tôi quan sát thấy dịch tảo chuyển sang màu nâu đỏ và tích lũy một lượng lớn astaxanthin bên trong tế bào của chúng. Bước sang ngày thứ 3 và thứ 4 thì dịch tảo có màu đỏ

đậm hơn, lượng astaxanthin cũng được tích lũy cao hơn, lúc này tất cả các tế bào đã ở trạng thái chín hoàn toàn và kích thước tế bào đạt cao nhất (Hình 3.17 và 3.18).



Hình 3. 14: Hình thái tế bào và hàm lượng sắc tố của tảo *H. pluvialis* dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần ở các thời gian chiếu sáng khác nhau

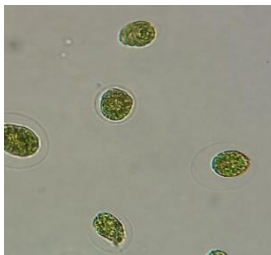

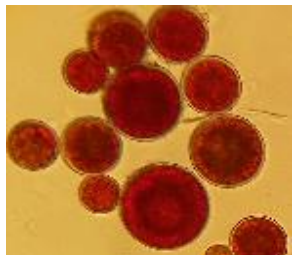
Như vậy, với tác nhân gây sốc tảo trong pha 2 là cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ hoặc thời gian chiếu sáng 24 giờ với nhiệt độ 35 $^{\circ}\text{C}$ là yếu tố làm tăng hàm lượng astaxanthin và rút ngắn được thời gian tích lũy astaxanthin trong tế bào tảo *H. pluvialis*. Kết quả nghiên cứu này tương đương với kết quả của Đặng Diễm Hồng và cs., (2012) cũng nuôi tảo theo qui trình 2 pha thì hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* ở công thức TN+UV đạt cực đại là 3.200 $\mu\text{g}/\text{L}$ sau 13 ngày nuôi cấy. Với qui trình nuôi tảo một pha thì tảo nuôi trong 2 pha của chúng tôi sẽ có hiệu quả tích lũy astaxanthin cao hơn, điều này được thể hiện qua so sánh tương quan với kết quả của một số công trình đã công bố như: Lê Thị Thơm kết luận rằng tảo nuôi cấy trong môi trường có nồng độ nitrate cao gấp 4 lần so với môi trường RM cơ bản thì hàm lượng astaxanthin thu được là 1.053 $\mu\text{g}/\text{L}$. Đinh Đức Hoàng và cs., (2011), đã nghiên cứu vòng đời của vi tảo lục *H. pluvialis* trong điều kiện phòng thí nghiệm đã kết luận rằng hàm lượng astaxanthin đạt cực đại trong môi trường RM là 942,23 $\mu\text{g}/\text{l}$ sau 46 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó hàm lượng astaxanthin ở công thức đối chứng của thí nghiệm 3 cao hơn so với kết quả ở thí nghiệm 1 và 2 nuôi tảo theo qui trình một pha. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của chúng

tôi chỉ dừng lại ở qui mô bình 10 lít trong phòng thí nghiệm hàm lượng astaxanthin chứa trong sinh khối tảo cao nhất là 0,1%, do vậy để nuôi vi tảo *H. pluvialis* đạt mật độ 4 - 6 triệu TB/ml, sinh khối tảo chứa astaxanthin từ 4 - 6% TLK trong điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam thì còn phụ thuộc vào rất nhiều vấn đề như nguồn gốc của chủng tảo *H. pluvialis*, nuôi tảo ở các qui mô khác nhau như nuôi theo dạng bể kín, hở, nuôi theo hệ thống tấm hoặc ống như công nghệ nuôi tảo của Isreal.

3.1.8. Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a của vi tảo *H. pluvialis*

Cùng với việc xác định các thông số về MĐTĐB, hàm lượng sắc tố, trọng lượng khô để xác định các giai đoạn trong vòng đời của tế bào tảo thì chúng tôi còn đánh giá thông qua tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a. Theo công trình công bố của Kobayashi và cs., (1992) về vòng đời của tảo *H. pluvialis*, tỷ lệ hàm lượng astaxanthin/chlorophyll a là một thông số tốt nhất để xác định pha sinh trưởng của tế bào. Nếu tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a $\leq 0,5$ thì tế bào được xem chủ yếu đang ở giai đoạn sinh dưỡng. Khi tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a dao động từ 0,5 - 1, tế bào chủ yếu được xem đang ở giai đoạn tạo bào nang.

Bảng 3. 10: Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a của tảo *H. pluvialis* ở các giai đoạn khác nhau

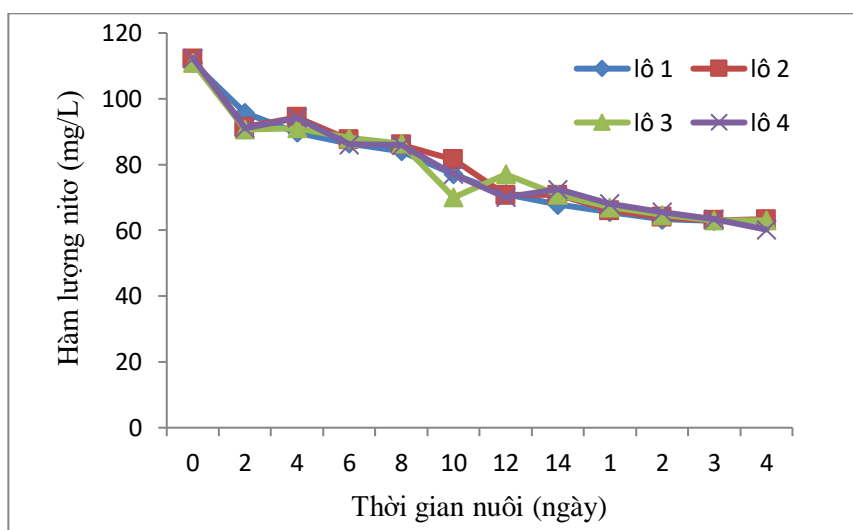
| Giai đoạn | Sinh dưỡng | Tạo bào nang | Nang hoàn chỉnh |
|--|---|--|---|
| Hình thái tế bào |  |  |  |
| | 0 ngày | 12 – 14 ngày nuôi | Ngày thứ 4 sau khi gây sốc |
| Tỷ lệ astaxanthin/ chlorophyll a | 0,4 | 0,95 | 6,39 |

Trong 10 ngày nuôi đầu, các tế bào tảo chủ yếu ở dạng sinh dưỡng có thể chuyển động được màu đặc trưng của tế bào ở giai đoạn này là màu xanh do phần nội bào giàu chlorophyll a, hàm lượng astaxanthin thấp. Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a đạt 0,4. Khi thời gian nuôi đạt tới 12 - 14 ngày, các tế bào chuyển sang giai đoạn tạo bào nang lúc

này hàm lượng chlorophyll a trong tế bào giảm và astaxanthin lại có xu hướng tăng dần. Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a là 0,95 đây cũng là thời kỳ chúng ta chuyển tảo vào nuôi pha 2 với điều kiện thuận lợi cho việc tích lũy astaxanthin. Ngày thứ 4 sau khi gây sốc tế bào chuyển sang giai đoạn bào nang hoàn chỉnh, trong tế bào xảy ra sự tích lũy astaxanthin nên phần nội chất bên trong chuyển hoàn toàn sang màu đỏ đậm. Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a đạt giá trị cao nhất là 6,39.

3.1.9. Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ trong quá trình nuôi cấy tảo *H. pluvialis* và thu nhận astaxanthin

Chúng tôi nhận thấy rằng trong suốt quá trình tảo *H. Pluvialis* tăng trưởng làm tiêu tốn một lượng lớn nitơ, cụ thể ở cả bốn lô thí nghiệm đều cho kết quả tương đồng, hàm lượng nitơ trong ngày nuôi cấy đầu tiên ở lô thứ 2 và thứ 3 là 112,14 mg/L và 112,42 mg/L còn ở lô 1 và 4 hàm lượng nitơ là 111,07 mg/L. Sau khi chúng tôi chuyển sang nuôi tảo *H. Pluvialis* trong pha 2, các giá trị này giảm dần cho đến khi tế bào tảo *H. Pluvialis* chuyển từ trạng thái bào nang sang bào nang hoàn chỉnh tức tích lũy một lượng lớn astaxanthin, lúc này hàm lượng nitơ ở lô thứ 2 giảm xuống còn 63,38 mg/L, lô 1 và lô 3 là 63,05 mg/L, riêng lô thứ 4 hàm lượng nitơ giảm còn 60,23 mg/L.



Hình 3. 15: Sự thay đổi hàm lượng nitơ theo thời gian nuôi cấy

Ở cả bốn lô thí nghiệm, sau khi tảo *H. Pluvialis* được đưa vào pha 2 gây sốc nhằm tăng khả năng tích lũy astaxanthin, sinh khối tảo cô đặc chứa hàm lượng sắc tố astaxanthin được chúng tôi gom lại theo từng lô, sau đó ly trích theo quy trình hình 3.20 và tiến hành định lượng ghi nhận được kết quả như sau:

Bảng 3. 11: Hàm lượng astaxanthin sau khi ly trích

| Thông số | lô 1 | lô 2 | lô 3 | lô 4 |
|--|---------|-------|-------|---------|
| sinh khối khô (g/L) | 0,25 | 0,3 | 0,22 | 0,3 |
| hàm lượng astaxantin ($\mu\text{g/L}$) | 6.530,5 | 7.520 | 5.144 | 7.535,8 |
| % astaxanthin trong sinh khối khô | 2,61 | 2,51 | 2,34 | 2,51 |

Dựa vào kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng astaxanthin sau khi ly trích dao động từ 5.144 $\mu\text{g/L}$ – 7.535,8 $\mu\text{g/L}$ tương ứng với 2,34 – 2,61 %/SKK.

Kết quả cho thấy hàm lượng nitơ giảm khi hàm lượng astaxanthin tăng lên và hàm lượng nitơ giảm dần theo thời gian thí nghiệm. So với quy trình nuôi cấy một pha thì quy trình nuôi cấy hai pha của chúng tôi cho giá trị hàm lượng sắc tố cao hơn gấp 4 - 5 lần, cụ thể: Đặng Diễm Hồng và cs., (2010) đã nghiên cứu lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* giàu astaxanthin. Kết quả chọn được môi trường RM là tốt nhất so với môi trường C, BG-11 cải tiến và OHM, với nồng độ tế bào $144,9 \times 10^4$ TB/mL, trọng lượng khô 4,92 g/L, hàm lượng astaxanthin 630 mg/L, hàm lượng chlorophyll a 2010 mg/L sau 30 ngày nuôi cấy; Đinh Đức Hoàng và cs., (2011), đã nghiên cứu vòng đời của vi tảo lục *H. pluvialis* trong điều kiện phòng thí nghiệm đã kết luận rằng hàm lượng astaxanthin đạt cực đại trong môi trường RM là 942,23 $\mu\text{g/l}$ sau 46 ngày nuôi cấy; Lê Thị Thơm và cs., (2013) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nitrate trong môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng của *H. pluvialis* Flotow ở cấp độ bình tam giác 250 mL. Các nồng độ nitrate thí nghiệm gồm 219, 438, 876, 1.314, 1.752, 2.190 mg/L, trong đó nồng độ nitrate 876 mg/L (tức nồng độ nitrate cao gấp 4 lần so với môi trường RM cơ bản) được xác định là thích hợp nhất cho sinh trưởng của loài vi tảo này.

Kết quả này của chúng tôi tương đồng với nhận định của một số tác giả: Trong nghiên cứu của Fábregas và cs., (1988), *H. pluvialis* được nuôi trong môi trường thiếu hụt nitơ và magie với điều kiện thiếu ánh sáng 40 và 230 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$; nồng độ astaxanthin cao nhất đạt được là 49,5 $\mu\text{g/mL}$ trong điều kiện thiếu hụt nitơ và cường độ ánh sáng 230 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$.

Cheng-Wu và cs., (2011) nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ nitơ khác nhau đến sự tăng trưởng, đặc điểm sinh lý, lượng sắc tố trên *H. pluvialis* CG-06 trong môi trường BBM với bốn mức nồng độ nitơ (0; 13,7; 27,5; 41,2 mg/mL). Kết quả cho thấy

rằng sự tích lũy astaxanthin trong *H. pluvialis* CG-06 và nồng độ nitơ ban đầu có mối tương quan nghịch với nhau.

3.2. Tách chiết astaxanthin thu nhận từ Tảo *Haematococcus pluvialis*

Hàm lượng astaxanthin được chiết bằng các phương pháp khác nhau (bảng 3.12) có sự khác nhau. Qua kết quả thu được có thể nhận thấy hàm lượng astaxanthin của mẫu được chiết bằng DMSO cao hơn mẫu được chiết bằng thủy tinh, điều này có thể là do trong quá trình nghiền sinh khối tảo với bột thủy tinh đã không phá hủy hoàn toàn thành tế bào nên lượng sắc tố thu được ít hơn.

Bảng 3. 12: Hàm lượng astaxanthin khi chiết bằng bột thủy tinh và DMSO

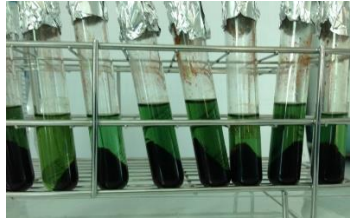
| Mẫu | Astaxanthin thu nhận bằng bột thủy tinh | Astaxanthin thu nhận bằng DMSO |
|---|---|--------------------------------|
| Hàm lượng astaxanthin ($\mu\text{g/g}$) | $11.988,11 \pm 217,59$ | $26.228,72 \pm 175,08$ |
| Phần trăm astaxanthin trong sinh khối khô (%) | $1,20 \pm 0,03$ | $2,62 \pm 0,02$ |

➤ *Chiết xuất astaxanthin trong tảo H. pluvialis*

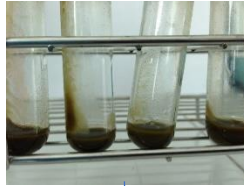
Sinh khối tảo *H. pluvialis* chứa astaxanthin



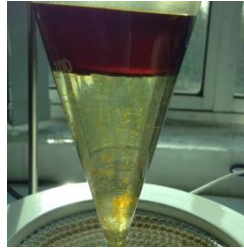
Loại Chlorophyll



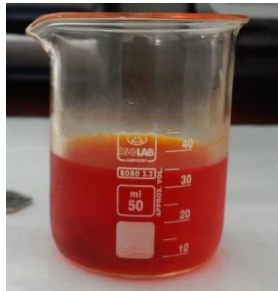
Cặn tảo sau khi chiết



Bổ sung dung môi tách chiết



Thu pha nổi chứa sắc tố astaxanthin



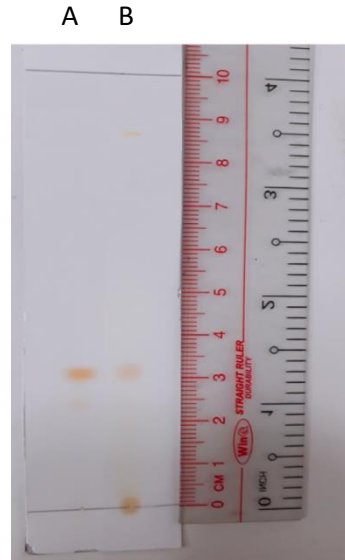
Astaxanthin sau ly trích

Hình 3. 16: Quy trình tách chiết astaxanthin trong tảo *H. pluvialis*

3.3. Thử nghiệm hoạt tính sinh học của astaxanthin thu nhận từ Tảo *Haematococcus pluvialis*

3.3.1. Kết quả định tính astaxanthin

Astaxanthin thu nhận từ tảo *Haematococcus pluvialis* có 2 vệt lần lượt có giá trị Rf là 0,31 và 0,86. Vạch thứ 1 có giá trị Rf = 0,31 và trùng với mẫu astaxanthin chuẩn.



Hình 3. 17: Kết quả định tính astaxanthin thu được bằng sắc ký bản mỏng

Trong đó:

A: Mẫu astaxanthin chuẩn

B: Mẫu Astaxanthin thu được từ tảo *Haematococcus pluvialis*

3.3.2. Định lượng astaxanthin

- *Xà phòng hóa:* Thực hiện phản ứng dựa trên thí nghiệm của Yuan và Chen có sửa đổi [1]. Hút 0,5ml ASX và 4,5ml methanol vào ống falcon 50ml được 5 ml dung dịch ASX (1:10), sau đó thêm 1ml NaOH (0,107 M), được 6ml hỗn hợp dung dịch, tiến hành sục N₂ đến khi thể tích đạt thể tích pha loãng ASX ban đầu (5ml). Đem ủ lạnh, tránh sáng, lần lượt dừng phản ứng (bỏ ngăn đông) sau 1h, 2h, 3h, 4h (10 phút lắc 1 lần). Lấy 200 ul ASX trước khi xà phòng hóa và 200 ul ASX sau khi thực hiện xà phòng hóa gửi đi phân tích HPLC

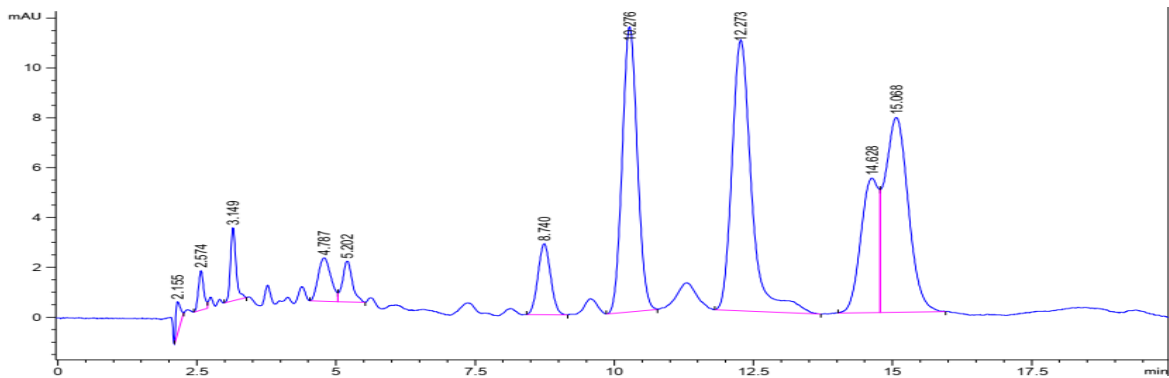
- *Quy trình chạy HPLC:* HPLC được tiến hành với 2 máy bơm 510, detector 996 photooxide và cột Beckman Ultrasphere C18 (250 × 4.6 mm; 5μm).

Pha động bao gồm dung môi A (dichloromethane/ methanol/acetonitrile/nước, 5.0:85.0:5.5:4.5, v/v) và dung môi B (dichloromethane/methanol/acetonitrile/water,

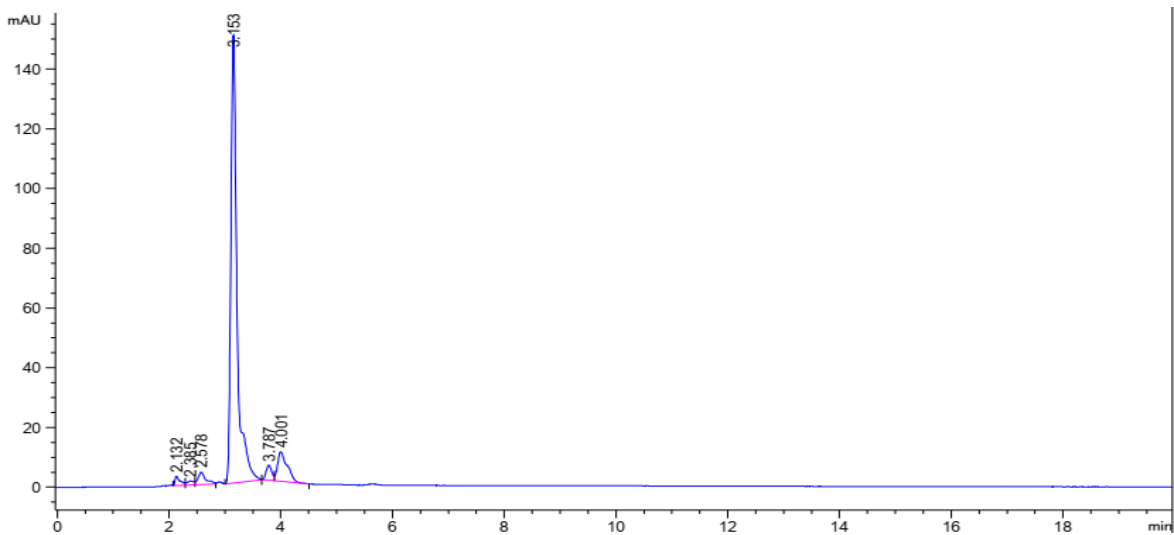
22.0:28.0:45.5:4.5, v/v). Quy trình chạy: 0% B trong 8 phút; tăng nồng độ B từ 0 tới 100% B trong 6 phút; 100% B trong 51 phút. Tốc độ dòng chảy 1.0 mL/phút. Đỉnh đo bước sóng 480 nm

- *Kết quả*

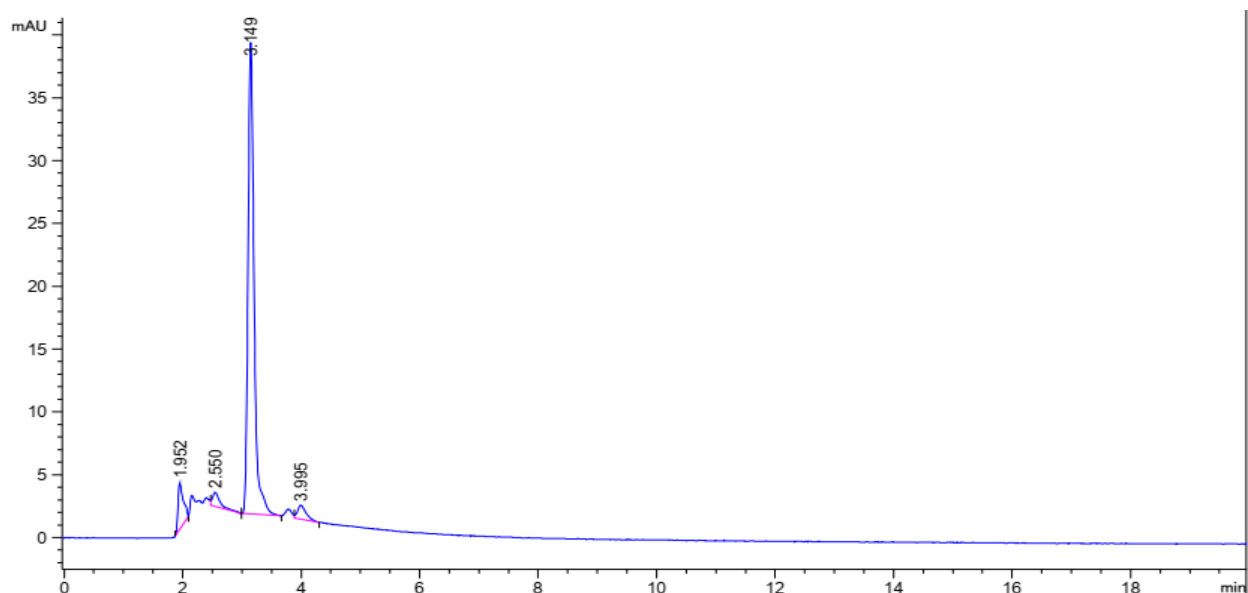
Kết quả HPLC cho thấy dịch astaxanthin có chứa dịch astaxanthin dạng tự do (4%) và dạng ester (96%).



Hình 3. 18: Kết quả HPLC dịch chiết tảo *H. pluvialis*



Hình 3. 19: Kết quả HPLC dịch chiết tảo *H. pluvialis* sau khi xà phòng hóa

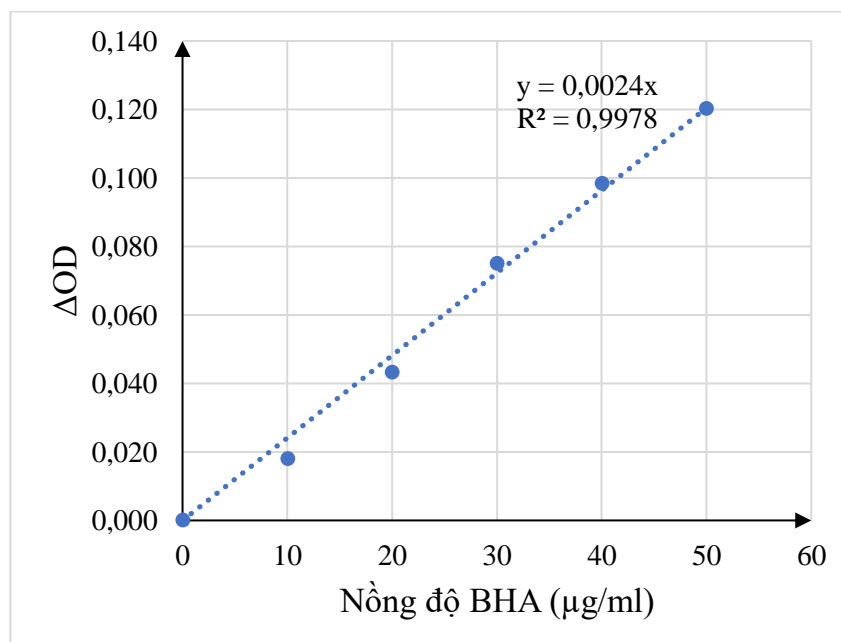


Hình 3. 20: Kết quả HPLC mẫu thương mại (Sigma) độ tinh khiết 97%

3.3.3. Đánh giá khả năng chống oxy hóa

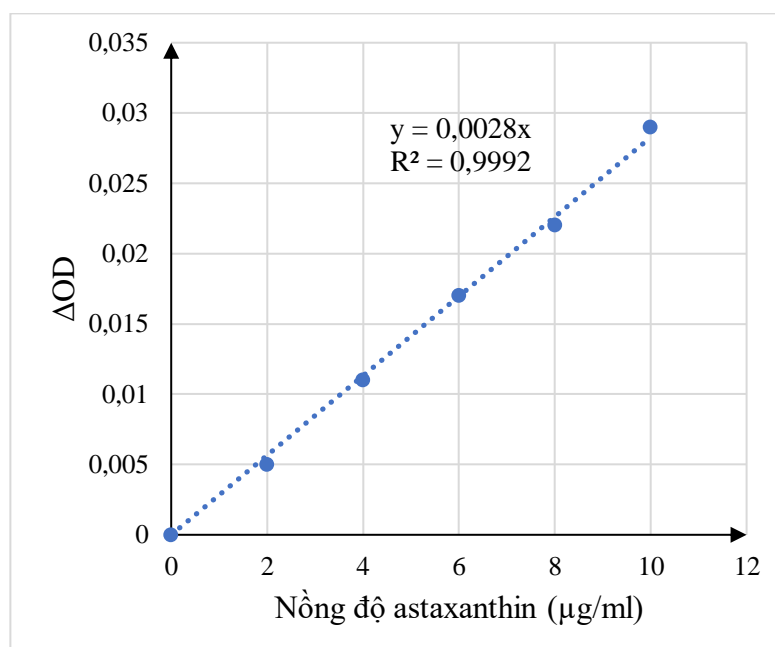
3.3.3.1. Kết quả khảo sát năng lực khử

Mẫu BHA được tiến hành khảo sát ở dãy nồng độ 0 – 50 $\mu\text{g/ml}$



Hình 3. 21: Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa ΔOD và nồng độ BHA ($\mu\text{g/ml}$) ở bước sóng 700 nm

Mẫu Astaxanthin được tiến hành khảo sát ở dãy nồng độ 0 - 10 $\mu\text{g/ml}$.



Hình 3. 22: Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa ΔOD và nồng độ astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$) ở bước sóng 700 nm

Nồng độ mẫu để giá trị $\Delta OD = 0,02$ được thể hiện ở bảng sau.

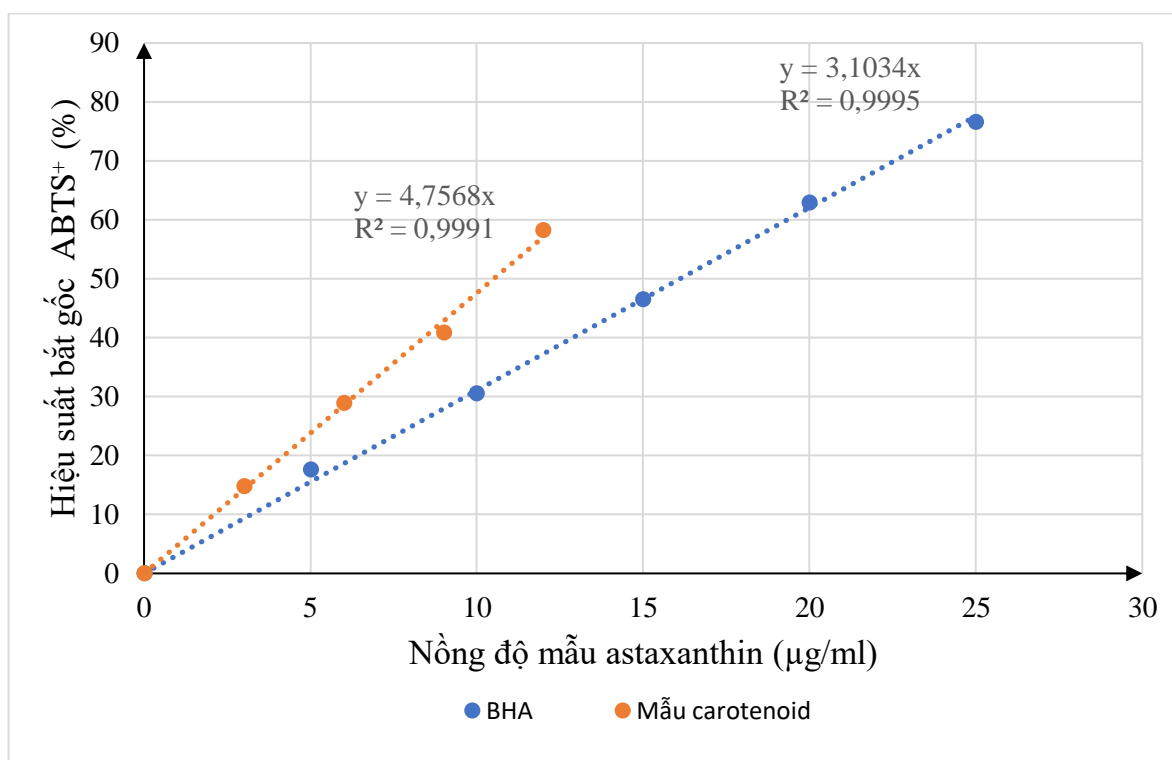
Bảng 3. 13: Nồng độ mẫu Astaxanthin thu được và mẫu BHA để $\Delta OD_{700\text{ nm}} = 0,02$

| Mẫu | Nồng độ mẫu ($\mu\text{g/ml}$) |
|-------------|----------------------------------|
| BHA | 8,333 |
| Astaxanthin | 7,143 |

Từ kết quả bảng 3.13, để đạt được giá trị ΔOD là 0,02 thì mẫu BHA cần 8,333 $\mu\text{g/ml}$, trong khi mẫu astaxanthin thu được chỉ cần 7,143 $\mu\text{g/ml}$. Do đó, mẫu astaxanthin thu được có khả năng khử mạnh hơn BHA 1,17 lần.

3.3.3.2. Kết quả khảo sát khả năng bắt gốc ABTS⁺

Mẫu BHA được tiến hành khảo sát ở dãy nồng độ 0 - 25 $\mu\text{g/ml}$, cách nhau 5 đơn vị. Mẫu Astaxanthin được tiến hành khảo sát ở dãy nồng độ 0 - 12 $\mu\text{g/ml}$, cách nhau 3 đơn vị. Hiệu suất bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu BHA và Astaxanthin tách chiết được thể hiện ở Hình 3.27.



Hình 3. 23: Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa hiệu suất bắt gốc tự do ABTS⁺ và nồng độ BHA và Astaxanthin tách chiết (µg/ml) ở bước sóng 734nm

Bảng 3. 14: Giá trị IC₅₀ của mẫu BHA và carotenoid tách chiết

| Mẫu | Giá trị IC ₅₀ |
|-------------|--------------------------|
| BHA | 16,111 |
| Astaxanthin | 10,511 |

Giá trị IC₅₀ của mẫu BHA và astaxanthin tách chiết được từ tảo *H. pluvialis* thể hiện ở Bảng 3.14. Từ giá trị IC₅₀ của mẫu BHA và Astaxanthin cho thấy giá trị IC₅₀ của mẫu Astaxanthin (10,511) thấp hơn giá trị IC₅₀ của mẫu BHA và thấp hơn 1,53 lần. Do đó, có thể kết luận rằng mẫu astaxanthin tách chiết có khả năng bắt gốc ABTS⁺ mạnh gấp 1,53 lần so với mẫu BHA.

3.3.4. Đánh giá sự lên màu của cá dĩa đỏ

Cá cũng như các loài động vật khác không thể tự tổng hợp carotenoid (Goodwin, 1984). Màu sắc của chúng chủ yếu dựa vào carotenoid từ thức ăn (Torrissen và cs., 1990). Là một carotenoid quan trọng, Astaxanthin được sử dụng rộng rãi như là một sắc tố đỏ hoặc hồng được bổ sung vào thức ăn cho cá nhằm tăng màu đỏ trên da hay cơ thịt cá. Các loài thủy sản nuôi áp dụng bổ sung sắc tố trong thức ăn như: Các loài cá biển:

họ cá hồi biển (Salmonid), cá hồi vân, cá vược đỏ; Cá nước ngọt: họ cá chép, cá rô phi, cá vàng; Giáp xác: tôm biển và tôm nước ngọt. Tương tự, Lovatelli và cs., (2009) cũng báo cáo rằng Astaxanthin là sắc tố đã được sử dụng từ lâu để sản xuất thức ăn cho các ngành công nghiệp nuôi cá hồi.

Kết quả trình bày qua Bảng 3.15 cho thấy, sau khi cho cá ăn thức ăn có chứa Astaxanthin thì màu sắc thể hiện trên thân cá có khuynh hướng đậm dần và độ đậm của sắc tố đỏ khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nguồn astaxanthin.

Bảng 3. 15: Giá trị L^* , a^* , b^* đánh giá màu sắc của cá sau thí nghiệm

| Nghiệm thức | L^* | a^* | b^* |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ĐC | $20,18 \pm 0,01^a$ | $1,41 \pm 0,01^c$ | $16,43 \pm 0,11^a$ |
| NT1 | $20,29 \pm 0,08^a$ | $5,64 \pm 0,04^b$ | $16,52 \pm 0,02^a$ |
| NT2 | $20,19 \pm 0,07^a$ | $7,69 \pm 0,05^a$ | $16,42 \pm 0,09^a$ |

Chỉ số a^* biểu thị cho màu sắc của cá thay đổi từ màu xanh lá cây đến đỏ, kết quả ở Bảng 3.15. cho thấy chỉ số a^* thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Trong đó, chỉ số a^* thể hiện cao nhất trong NT2 (7,69), kế đến là NT1 (5,64) và thấp nhất là nghiệm thức đối chứng (1,41).

Điều này có thể do Astaxanthin sản phẩm chiết xuất từ sinh khối tảo *Haematococcus pluvialis* có nguồn gốc tự nhiên nên tác dụng lên màu cho cá diễn ra chậm hơn theo một cơ chế tác động nhiều giai đoạn, còn sản phẩm astaxanthin trên thị trường được tổng hợp bằng con đường hóa học nên có tác động nhanh hơn. Mặc dù chỉ số a^* ở nghiệm thức sử dụng astaxanthin chiết xuất từ tảo thấp hơn so với sản phẩm astaxanthin trên thị trường, tuy nhiên lại khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Như vậy, astaxanthin được chiết xuất từ tảo có tác dụng cải thiện màu sắc trên cá đĩa đỏ. Từ kết quả phân tích trên cũng cho thấy astaxanthin có nguồn gốc tự nhiên có một ảnh hưởng nhất định và hiệu quả đến màu sắc của cá đĩa đỏ.

Khi xét đồng thời chỉ số L^* và b^* giữa các nghiệm thức thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Độ đậm nhạt và xanh da trời - vàng trên thân cá không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức, điều này có thể do Astaxanthin chỉ có ảnh hưởng chủ yếu đến sắc tố đỏ (Torrissen, 1989), vì vậy các sắc tố khác không bị tác động nhiều bởi

khẩu phần thức ăn có chứa Astaxanthin. Kết quả nghiên cứu của Smith và cs., (1992) ghi nhận, tiến hành thí nghiệm bổ sung Astaxanthin vào khẩu phần thức ăn của cá hồi bạc với các liều lượng lần lượt là 0, 15, 30, 45, 60 mg/kg thức ăn trong 28 tuần. Kết quả là có sự khác biệt về màu sắc trên cơ thể cá. Giá trị a^* tăng lên theo sự gia tăng của hàm lượng Astaxanthin trong thức ăn. Điều này có nghĩa là màu đỏ ở cá được biểu hiện rõ hơn tùy theo nồng độ của Astaxanthin, nhưng giá trị b^* lại không có sự khác biệt lớn giữa các nghiệm thức. So với các kết quả nghiên cứu trên, kết quả của nghiên cứu bổ sung hợp chất Astaxanthin vào thức ăn của cá dĩa cũng tương tự.

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, Astaxanthin được chiết xuất từ sinh khối tảo *Haematococcus pluvialis* có tác dụng cải thiện màu sắc trên cá dĩa đỏ *Symphysodon* sp., ở liều 75 mg/kg thức ăn sau khi cho cá ăn trong ba tháng sẽ giúp cho cá có màu sắc đẹp đáp ứng được yêu cầu của thị trường cá cảnh.



Hình 3. 24: Màu sắc của cá dĩa khi cho ăn thức ăn có astaxanthin ở các nghiệm thức (ĐC, NT1, NT2)

3.4. Nghiên cứu thu nhận astaxanthin trên nấm men *Rhodospiridium toruloides*

3.4.1. Xác định một số thành phần trong rỉ đường trước và sau khi xử lý cần cho quá trình nuôi cấy nấm men *Rhodospiridium toruloides* để thu nhận astaxanthin

Rỉ đường có hàm lượng Ca^{2+} cao (0,3 - 1,5%) gây ra ức chế đến sự phát triển của nấm men trong quá trình nuôi cấy. Ngoài ra, hàm lượng Ca^{2+} sau xử lý cũng là cơ sở để lựa chọn nồng độ H_2SO_4 thích hợp để loại Ca^{2+} nhằm đảm bảo sự phát triển của nấm men. Kết quả định lượng canxi trước và sau xử lý được trình bày ở bảng 3.16.

Bảng 3. 16: Kết quả định lượng canxi trong rỉ đường trước và sau xử lý

| Thành phần | Hàm lượng (%) | |
|------------|----------------------|--------------------|
| | Rỉ đường trước xử lý | Rỉ đường sau xử lý |
| Canxi | $0,962 \pm 0,004$ | $0,314 \pm 0,003$ |

Từ kết quả định lượng hàm lượng canxi trước khi xử lý với H₂SO₄ là 0,962 %, kết quả cho thấy hàm lượng canxi dao động trong rỉ đường (0,3 – 1%) là phù hợp. Kết quả này phù hợp với hàm lượng canxi trong rỉ đường dao động trong các nghiên cứu trước đó của Olbrich (2006). Vì vậy, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng đường tổng và đường khử của rỉ đường trước và sau khi xử lý bằng H₂SO₄ 0,4N, kết quả được trình bày ở bảng 3.17.

Bảng 3. 17: Kết quả định lượng đường tổng và đường khử trong rỉ đường trước và sau xử lý

| Thành phần | Hàm lượng (%) | |
|------------|----------------------|--------------------|
| | Rỉ đường trước xử lý | Rỉ đường sau xử lý |
| Đường tổng | 56,30 ± 0,18 | 55,29 ± 0,23 |
| Đường khử | 16,97 ± 0,07 | 12,54 ± 0,41 |

Kết quả định lượng đường tổng và đường khử của rỉ đường trước và sau xử lý có sự chênh lệch rất ít, chứng tỏ quy trình xử lý rỉ đường là phù hợp để áp dụng.

3.4.2. Kết quả khảo sát các yếu tố thích hợp cho nuôi cấy *Rhodosporidium toruloides* trên môi trường rỉ đường

3.4.2.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng urea.

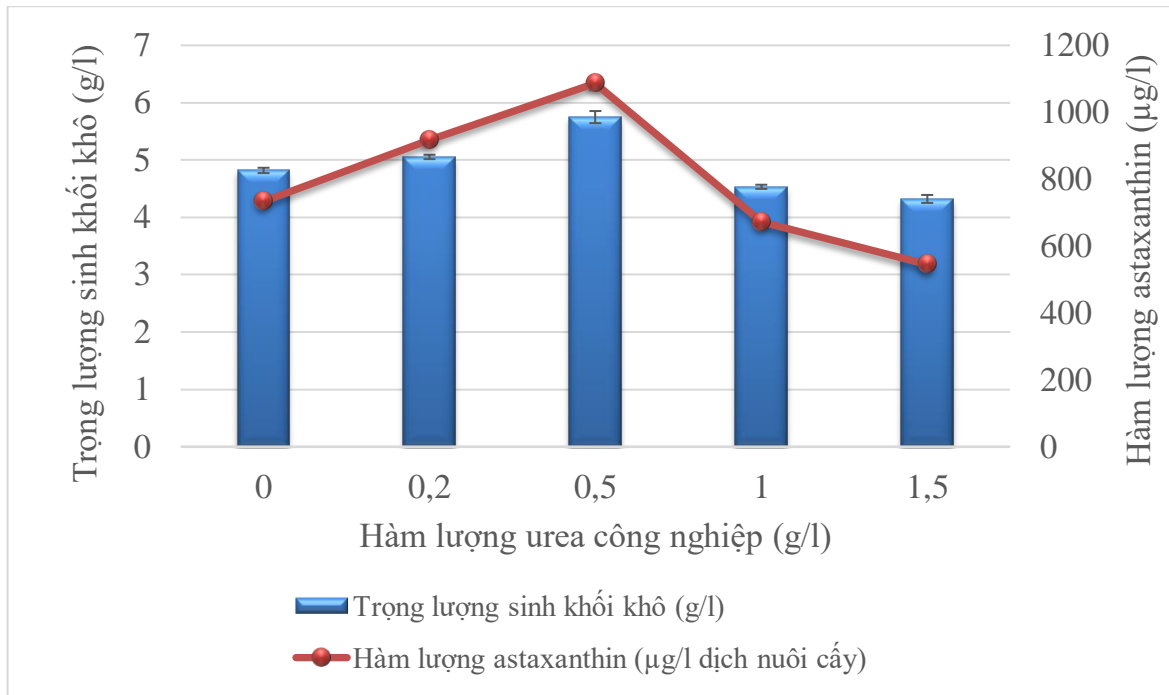
Môi trường nuôi cấy được bổ sung nguồn nitơ với hàm lượng thay đổi: 0 g/l (đối chứng); 0,2 g/l; 0,5 g/l; 1,0 g/l; 1,5 g/l, pH 6, điều kiện nhiệt độ phòng (28 ± 2°C) và ánh sáng tự nhiên. Kết quả thu được thể hiện trong bảng 3.18 và Hình 3.29.

Bảng 3. 18: Ảnh hưởng của hàm lượng urea đến hàm lượng astaxanthin

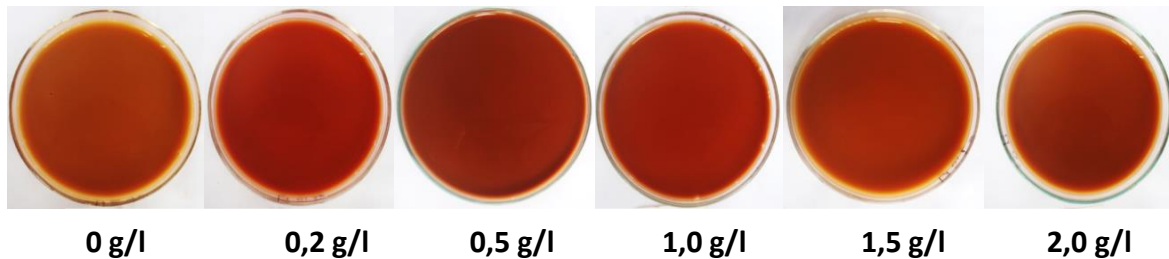
| Hàm lượng urea (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | (µg/g sinh khối khô) | (µg/l dịch nuôi cấy) |
| 0,0 | 152,29 ± 1,205 ^b | 733,92 ± 12,59 ^c |
| 0,2 | 181,30 ± 1,321 ^c | 916,30 ± 10,70 ^d |
| 0,5 | 188,98 ± 1,686 ^c | 1086,33 ± 20,05 ^e |
| 1,0 | 145,24 ± 4,219 ^b | 671,72 ± 7,845 ^b |
| 1,5 | 124,38 ± 4,644 ^a | 544,96 ± 13,19 ^a |

Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3

a,b... là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê (p<0,05)



Hình 3. 25: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy ở những hàm lượng urea khác nhau



Hình 3. 26: Sinh khối tươi thu được khi khảo sát ảnh hưởng urea

Trọng lượng sinh khối khô tăng ở hàm lượng urea từ 0 g/l đến 0,5 g/l, đạt cao nhất tại hàm lượng urea 0,5 g/l và giảm dần ở hàm lượng urea là 1 g/l và 1,5 g/l. Hàm lượng astaxanthin tính trên thể tích dịch nuôi cấy đạt cao nhất ở hàm lượng urea 0,5 g/l (1.086,33 µg/l dịch nuôi cấy), gấp khoảng 1,48 lần so với lô đối chứng khi môi trường chỉ có dịch rỉ đường không bổ sung urea (733,92 µg/l dịch nuôi cấy). Điều đó, cho thấy rằng việc bổ sung thêm urea vào dịch rỉ đường nuôi cấy góp phần làm tăng hàm lượng astaxanthin.

Banzatto, Freitas và Mutton (2013) đã nghiên cứu sự thu nhận carotenoid của chủng *Rhodotorula rubra* trên các môi trường khác nhau, trong đó có rỉ đường, đồng thời bổ sung vào môi trường nuôi cấy urea 2 g/l và Nitrofos KL 0,5 g/l (một sản phẩm đạm thương mại). Kết quả thu được môi trường cho hàm lượng carotenoid cao nhất là

rỉ đường với hàm lượng thu được là 2,74 mg/l, khi bổ sung urea và Nitrofos KL cho hàm lượng carotenoid tương ứng là 2,55 mg/l và 2,32 mg/l. Tác giả kết luận rằng việc bổ sung urea làm tăng trọng lượng sinh khối khô thu được (trọng lượng sinh khối khô thu được trên môi trường bổ sung urea và Nitrofos KL tương ứng là 15,09 g/l và 14,87 g/l) nhưng làm giảm hàm lượng carotenoid tích lũy trong tế bào và sự giảm này là không đáng kể. So sánh với kết quả chúng tôi đạt được: hàm lượng urea 0,5 g/l cho hàm lượng astaxanthin cao nhất, có sự tương đồng với kết quả của tác giả, chúng tôi chọn bổ sung hàm lượng urea công nghiệp 0,5 g/l cho nghiên cứu tiếp theo.

3.4.2.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng $MgSO_4.7H_2O$.

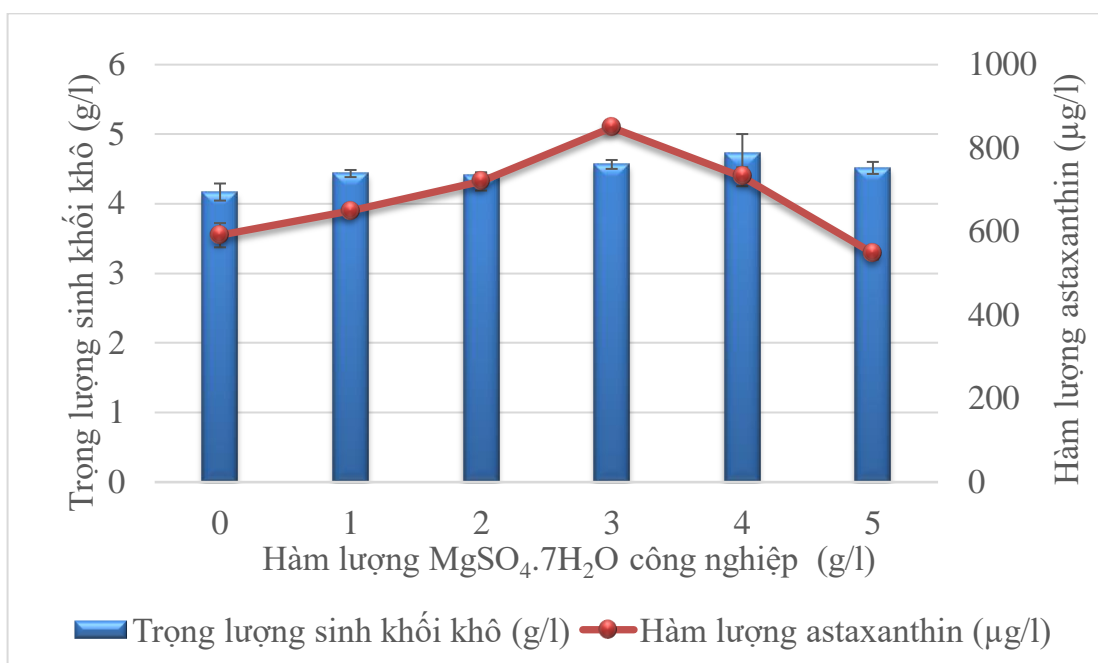
Nguồn khoáng chúng tôi khảo sát là $MgSO_4.7H_2O$ với mục đích bổ sung nguyên tố magie (Mg) có hàm lượng $MgSO_4.7H_2O$ thay đổi từ 0 (đối chứng) - 5 g/l (cách nhau 1 đơn vị), pH 6,0, điều kiện nhiệt độ phòng ($28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$) và ánh sáng tự nhiên. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.19 và Hình 3.31.

Bảng 3. 19: Ảnh hưởng của hàm lượng $MgSO_4.7H_2O$ công nghiệp đến hàm lượng astaxanthin.

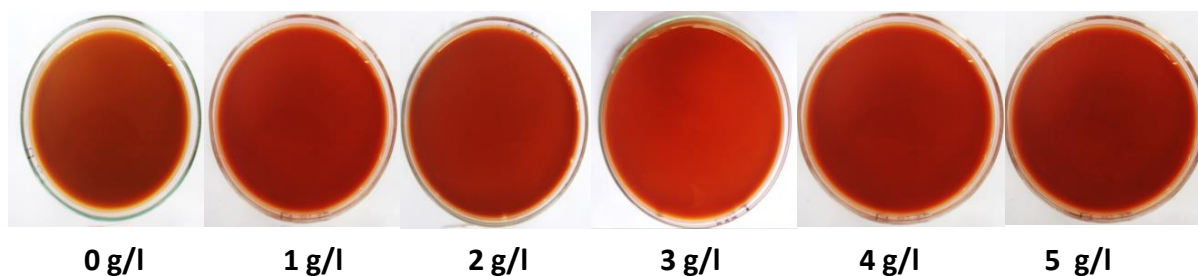
| Hàm lượng $MgSO_4.7H_2O$ công nghiệp (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| | ($\mu\text{g/g}$ sinh khối khô) | ($\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy) |
| 0 | $144,71 \pm 5,353^b$ | $591,46 \pm 29,05^{ab}$ |
| 1 | $146,44 \pm 4,046b$ | $649,08 \pm 10,86^b$ |
| 2 | $162,89 \pm 3,546^c$ | $719,77 \pm 21,32^c$ |
| 3 | $186,03 \pm 1,695^d$ | $849,27 \pm 4,721^d$ |
| 4 | $154,89 \pm 3,783^{bc}$ | $731,57 \pm 22,78^c$ |
| 5 | $121,49 \pm 2,973^a$ | $548,60 \pm 15,77^a$ |

Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn $n=3$

a,b... là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p<0,05$)



Hình 3. 27: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy ở những hàm lượng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ khác nhau.



Hình 3. 28: Sinh khối astaxanthin khi khảo sát ảnh hưởng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Từ kết quả khảo sát ở trên: Khi tăng hàm lượng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ từ 0 g/l đến 3 g/l có hàm lượng astaxanthin tăng dần và ở hàm lượng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 g/l cho hàm lượng astaxanthin cao nhất (186,03 $\mu\text{g/g}$ sinh khối khô và 849,27 $\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy), so với lô đối chứng không bổ sung $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ trong môi trường rỉ đường cao hơn gấp 1,44 lần (591,46 $\mu\text{g/l}$). Nhưng khi tăng hàm lượng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ cao hơn 3 g/l là 4 g/l và 5 g/l thì làm hàm lượng astaxanthin giảm dần. Tóm lại, chúng tôi chọn bổ sung $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ đến một hàm lượng thích hợp là 3 g/l thu được hàm lượng astaxanthin cao nhất.

3.4.2.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4 .

Tiếp tục khảo sát một nguồn khoáng nữa bổ sung vào môi trường nuôi cấy, đó là KH_2PO_4 với mục đích là bổ sung 2 nguyên tố K và P với hàm lượng KH_2PO_4 thay đổi

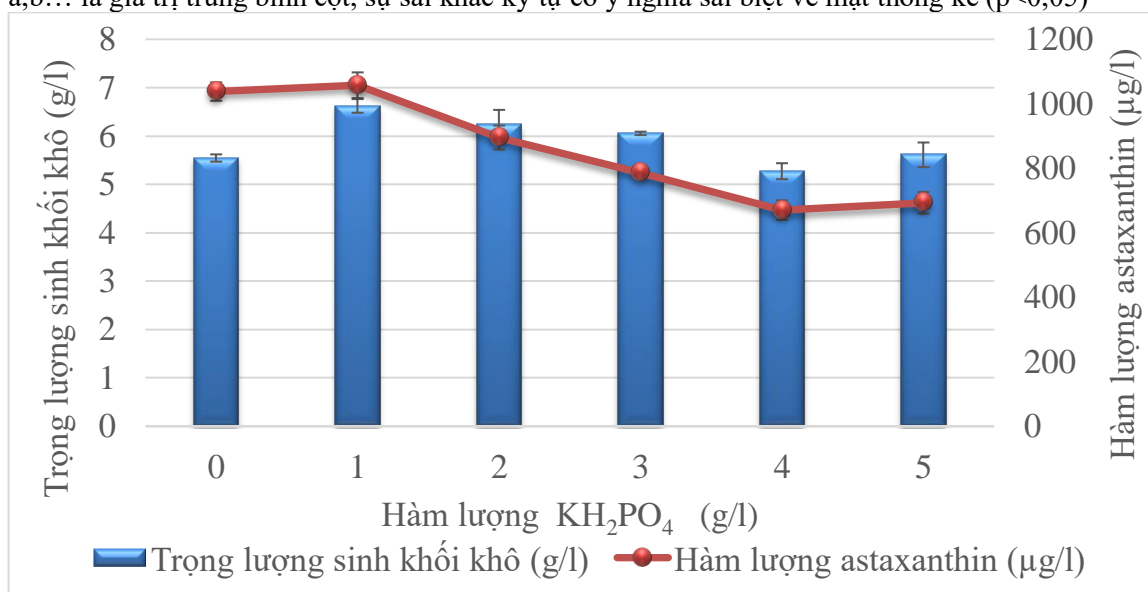
từ 0 g/l (đối chứng) đến 5 g/l (cách nhau 1 đơn vị), pH 6,0, điều kiện nhiệt độ phòng ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) và ánh sáng tự nhiên. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.20, hình 3.33.

Bảng 3. 20: Ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4 đến hàm lượng astaxanthin

| Hàm lượng KH_2PO_4 (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| | ($\mu\text{g/g}$ sinh khối khô) | ($\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy) |
| 0 | $187,08 \pm 2,66^{\text{d}}$ | $1037,94 \pm 28,52^{\text{d}}$ |
| 1 | $159,75 \pm 3,33^{\text{c}}$ | $1057,53 \pm 39,89^{\text{d}}$ |
| 2 | $143,49 \pm 0,88^{\text{b}}$ | $895,39 \pm 37,38^{\text{c}}$ |
| 3 | $130,00 \pm 2,21^{\text{a}}$ | $786,98 \pm 10,21^{\text{b}}$ |
| 4 | $127,02 \pm 2,12^{\text{a}}$ | $670,24 \pm 30,51^{\text{a}}$ |
| 5 | $123,43 \pm 0,46^{\text{a}}$ | $692,93 \pm 33,80^{\text{a}}$ |

Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn $n=3$

a,b,... là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p<0,05$)



Hình 3. 29: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy ở hàm lượng KH_2PO_4 khác nhau.

Từ kết quả khảo sát hàm lượng KH_2PO_4 bổ sung vào môi trường rỉ đường, chúng tôi nhận thấy rằng trọng lượng sinh khối khô có sự tăng dần ở hàm lượng KH_2PO_4 từ 0 g/l đến 2 g/l, đạt cao nhất tại hàm lượng KH_2PO_4 1 g/l (6,623 g/l) sau đó giảm dần ở các hàm lượng 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l. Hàm lượng astaxanthin tính trên sinh khối khô và tính trên thể tích dịch nuôi cấy cũng có sự tăng giảm giống nhau: cao nhất là 1 g/l (1.057,53 $\mu\text{g/l}$) còn lại hàm lượng astaxanthin giảm mạnh so với ống đối chứng, chúng tôi chọn hàm lượng KH_2PO_4 bổ sung vào môi trường rỉ đường là 1 g/l.

3.4.2.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng tỷ lệ giống đến hàm lượng astaxanthin

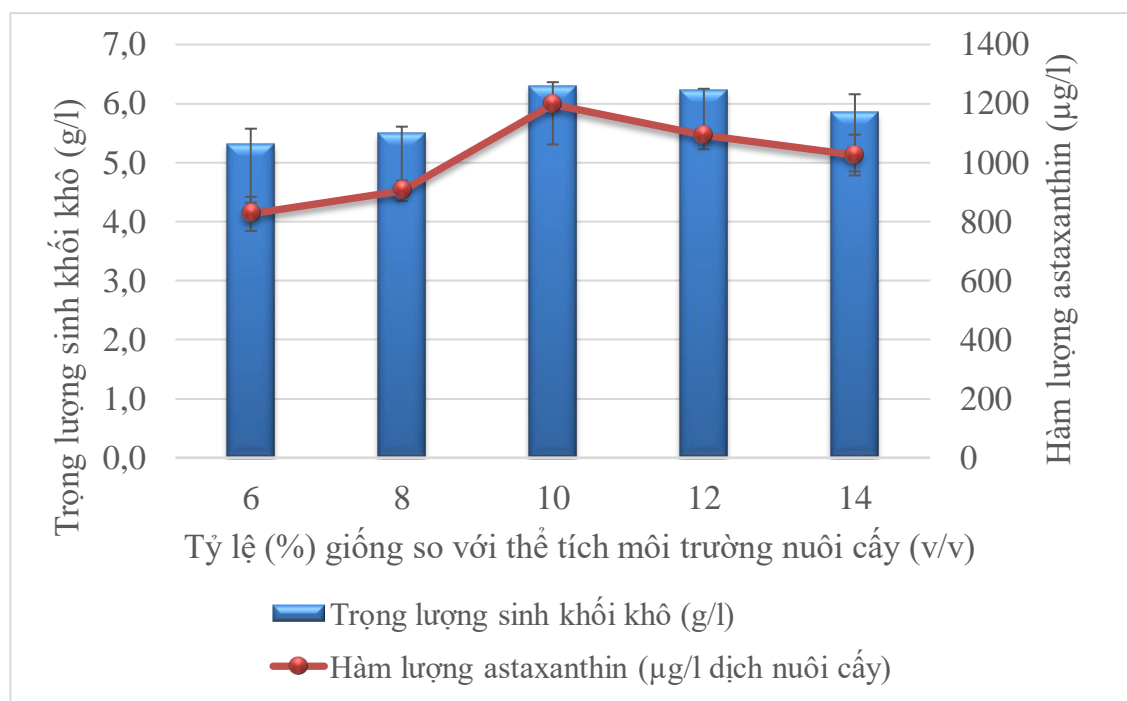
Chúng tôi tiến hành khảo sát tỷ lệ giống so với thể tích môi trường nuôi cấy thay đổi từ 6 (%) đến 14 (%) (cách nhau 2 đơn vị), pH 6,0, điều kiện nhiệt độ phòng ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) và ánh sáng tự nhiên. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.21, Hình 3.34.

Bảng 3. 21: Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến hàm lượng astaxanthin.

| Tỷ lệ giống (%) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | ($\mu\text{g/g}$ sinh khối khô) | ($\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy) |
| 6 | $5,320 \pm 0,2549^a$ | $155,02 \pm 3,85^a$ | $826,35 \pm 57,77^a$ |
| 8 | $5,507 \pm 0,102^a$ | $164,09 \pm 3,55^b$ | $904,32 \pm 34,48^{ab}$ |
| 10 | $6,308 \pm 0,055^b$ | $189,78 \pm 0,87^d$ | $1197,17 \pm 14,18^d$ |
| 12 | $6,226 \pm 0,025^b$ | $175,30 \pm 2,41^c$ | $1092,79 \pm 12,04^{cd}$ |
| 14 | $5,850 \pm 0,308^{ab}$ | $175,04 \pm 2,72^c$ | $1025,52 \pm 68,97^{bc}$ |

Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn $n=3$

a,b... là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p<0,05$)



Hình 3. 30: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy ở những tỷ lệ giống khác nhau.

Từ kết quả khảo sát tỷ lệ giống cho vào môi trường nuôi cấy thì trọng lượng sinh khối khô tăng dần từ 6% (5,320 g/l trọng lượng sinh khối khô) đến 14% (5,850 g/l trọng lượng sinh khối khô) nhưng cao nhất với tỷ lệ giống 10% (6,308 g/l trọng lượng sinh khối khô). Hàm lượng astaxanthin tính trên sinh khối khô và tính trên thể tích dịch nuôi

cây cũng có sự tăng giảm giống nhau: cao nhất là tỷ lệ giống 10% (1.197,17 $\mu\text{g/l}$) còn lại 6% - 8% hàm lượng astaxanthin tăng đến tỷ lệ giống 10% và sau 10% thì hàm lượng astaxanthin giảm, chôn tỷ lệ giống 10% là phù hợp đối với bài nghiên cứu này.

3.4.2.5. Kết quả khảo sát hàm lượng đường tổng đến hàm lượng astaxanthin

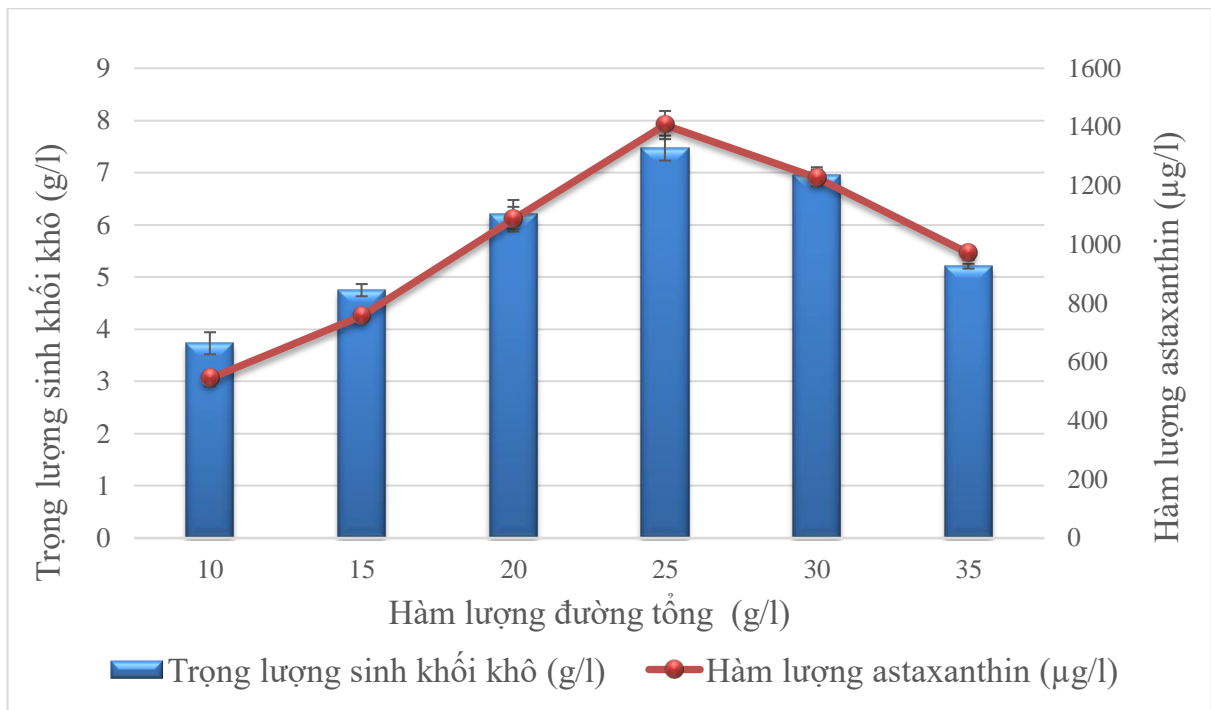
Tiến hành khảo sát các giá trị hàm lượng đường tổng trong rỉ đường khác nhau ảnh hưởng đến hàm lượng astaxanthin thu được. Môi trường nuôi cấy lactic với hàm lượng đường tổng được điều chỉnh 10 - 35 (g/l) (cách nhau 5 đơn vị), pH 6,0 ở điều kiện nhiệt độ phòng ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) và ánh sáng tự nhiên. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.22, hình 3.35.

Bảng 3. 22: Ảnh hưởng hàm lượng đường tổng đến hàm lượng astaxanthin.

| Hàm lượng Đường tổng (g/l) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | | ($\mu\text{g/g}$ sinh khối khô) | ($\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy) |
| 10 | $3,7310 \pm 0,2115^a$ | $145,873 \pm 1,842^a$ | $543,797 \pm 27,04^a$ |
| 15 | $4,7487 \pm 0,1172^b$ | $159,238 \pm 1,083^b$ | $756,240 \pm 20,69^b$ |
| 20 | $6,1967 \pm 0,2802^b$ | $175,397 \pm 3,138^c$ | $1085,92 \pm 42,11^b$ |
| 25 | $7,4697 \pm 0,2388^c$ | $188,285 \pm 0,5586^d$ | $1406,62 \pm 47,97^d$ |
| 30 | $6,9630 \pm 0,1412^d$ | $176,254 \pm 2,942^c$ | $1227,06 \pm 28,08^c$ |
| 35 | $5,2080 \pm 0,0463^d$ | $153,223 \pm 3,532^{ab}$ | $798,18 \pm 23,22^b$ |

Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn $n=3$

a,b... là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p<0,05$)

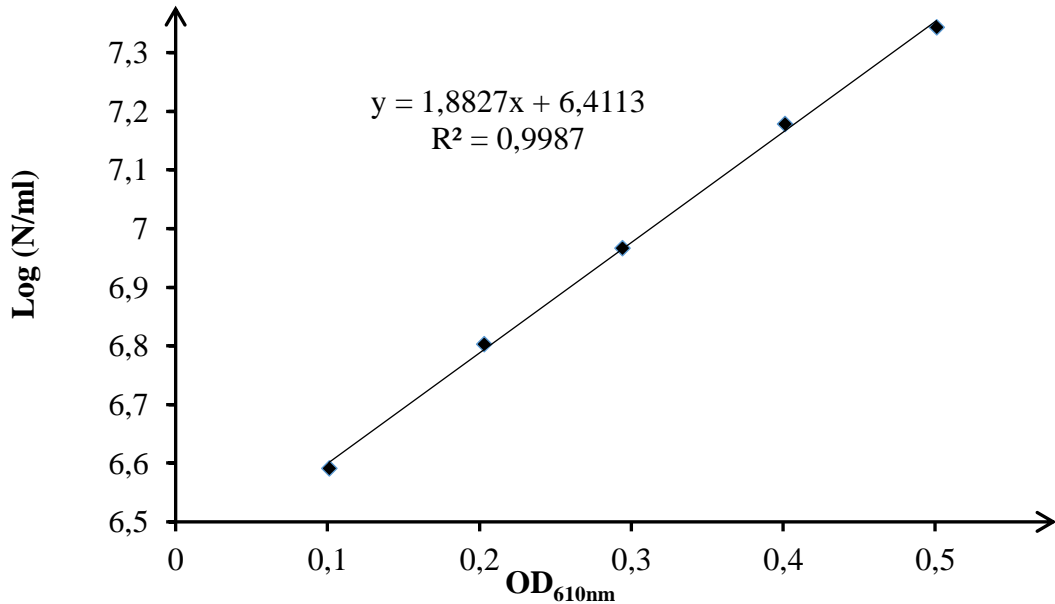


Hình 3. 31: Biểu đồ Hàm lượng astaxanthin thu được từ môi trường nuôi cấy ở hàm lượng đường tổng khác nhau.

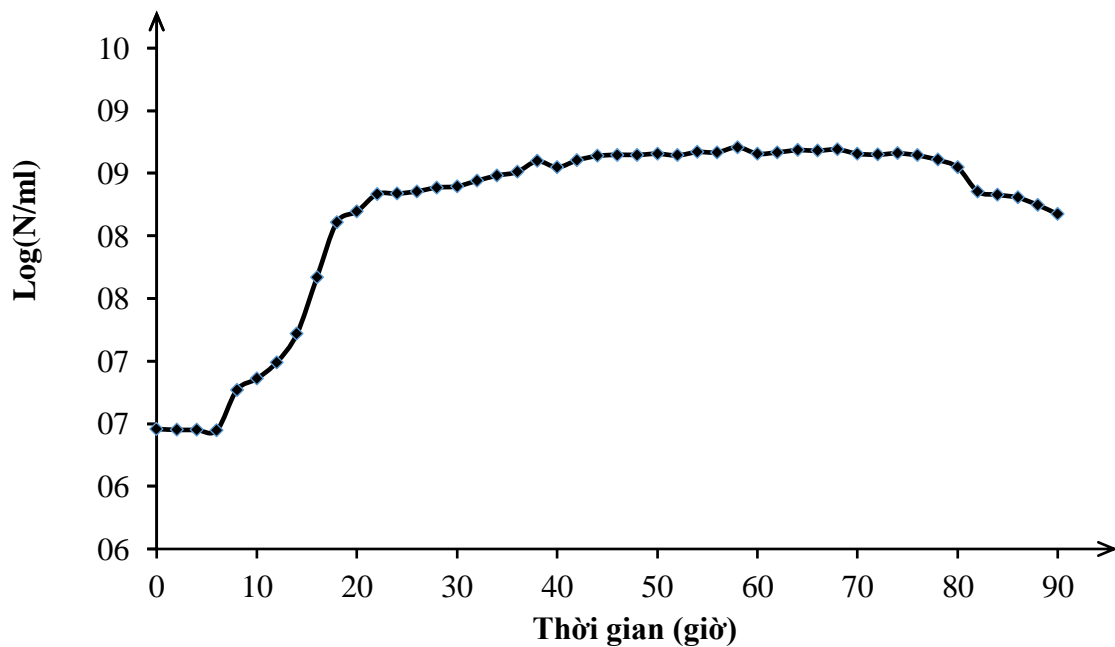
Hàm lượng astaxanthin cũng tăng dần từ hàm lượng đường tổng 10 g/l đến 25 g/l và giảm dần với hàm lượng đường tổng 30 g/l và 35 g/l, đạt hàm lượng astaxanthin cao nhất tại nồng độ 25 g/l là 1.406,62 µg/l dịch nuôi cấy. Một nghiên cứu của nhóm tác giả Jirasripongpun, Pewlong, Natsathmonthra và Sutriyaporn (2007) nghiên cứu sản xuất carotenoid từ nấm men *phaffia rhodozyma* đột biến trên môi trường rỉ đường, hàm lượng đường tổng 2,76%, nuôi cấy lác 10 ngày cho hàm lượng carotenoid tính trên gram sinh khối khô là 450 µg/g. So với kết quả chúng tôi nghiên cứu là dùng hàm lượng đường tổng 2,5% (w/v), có sự tương đồng với tác giả. Ở hàm lượng đường tổng rỉ đường là 25 g/l cho hàm lượng astaxanthin tính trên thể tích dịch nuôi cấy là cao nhất, vì vậy nghiên cứu quyết định chọn hàm lượng đường tổng trong rỉ đường là 25 g/l.

3.4.3. **Kết quả xây dựng đường cong tăng trưởng của chủng *Rhodosporidium sp.*, trên môi trường rỉ đường đã khảo sát các yếu tố thích hợp**

Dựa vào các giá trị OD_{610nm} từ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 và số lượng tế bào nấm men đếm được từ buồng đếm hồng cầu tương ứng với các giá trị OD_{610nm} để tính mật độ tế bào trong 1 ml môi trường log (N/ml). Từ kết quả đó, dựng được đường tương quan tuyến tính giữa mật độ tế bào và OD_{610nm} (hình 3.36). Đồ thị này được dùng để tính mật độ tế bào phục vụ cho việc dựng đường cong tăng trưởng của chủng *Rhodosporidium toruloides* ở môi trường rỉ đường đã nghiên cứu.



Hình 3. 32: Đồ thị đường tương quan tuyến tính giữa OD_{610nm} và mật độ tế bào log (N/ml)



Hình 3. 33: Đồ thị đường cong tăng trưởng khi tăng sinh bậc 1 của chủng *Rhodosporidium* sp., trên môi trường rỉ đường

Đồ thị đường cong tăng trưởng thể hiện rằng khi tăng sinh bậc 1 của chủng *Rhodosporidium toruloides* trên môi trường rỉ đường cho thấy các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của chủng nấm men này trên môi trường rỉ đường là như sau: pha tiềm tàng trong khoảng 6 giờ đầu, pha tăng trưởng hàm mũ vào khoảng giờ thứ 8 đến giờ thứ 30, pha ổn định từ giờ thứ 32 đến giờ thứ 80, pha suy tàn từ giờ thứ 82 trở về sau.

3.4.4. Kết quả tối ưu hóa thành phần môi trường

Sử dụng phần mềm Design Expert, các nghiệm thức thực nghiệm cần thực hiện để tối ưu hóa môi trường theo phương pháp Box - Behnken và kết quả sau khi thực hiện các thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.23.

Bảng 3. 23: Thiết kế và kết quả thí nghiệm Box - Behnken

| NT | Block | Hàm lượng đường tổng (g/l) | Urea (g/l) | pH | Hàm lượng carotenoid chứa astaxanthin ($\mu\text{g/g}$) | |
|----|---------|----------------------------|------------|-----|---|---------|
| | | | | | Thực nghiệm | Mô hình |
| 1 | Block 1 | 25 | 1 | 6 | 182,09 | 182,54 |
| 2 | Block 1 | 30 | 1 | 5,5 | 169,96 | 169,78 |
| 3 | Block 1 | 25 | 0,5 | 6,5 | 144,74 | 144,26 |
| 4 | Block 1 | 25 | 1 | 6 | 182,23 | 182,54 |
| 5 | Block 1 | 25 | 1,5 | 6,5 | 149,235 | 148,81 |
| 6 | Block 1 | 20 | 0,5 | 6 | 138,673 | 138,97 |
| 7 | Block 1 | 25 | 1,5 | 5,5 | 152,425 | 152,90 |
| 8 | Block 1 | 25 | 1 | 6 | 183,291 | 182,54 |
| 9 | Block 1 | 25 | 0,5 | 5,5 | 142,782 | 143,20 |
| 10 | Block 1 | 20 | 1 | 5,5 | 154,165 | 153,45 |
| 11 | Block 1 | 30 | 1 | 6,5 | 160,021 | 160,74 |
| 12 | Block 1 | 20 | 1,5 | 6 | 143,811 | 144,05 |
| 13 | Block 1 | 30 | 0,5 | 6 | 145,974 | 145,73 |
| 14 | Block 1 | 20 | 1 | 6,5 | 159,278 | 159,46 |
| 15 | Block 1 | 30 | 1,5 | 6 | 155,203 | 154,91 |

Từ kết quả ở bảng 3.23, chúng tôi thấy rằng khi nuôi chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides* ở nghiệm thức 1, 4 và 8 cho hàm lượng carotenoid chứa astaxanthin cao nhất lần lượt là 182,090, 182,230 và 183,291 $\mu\text{g/g}$; ở nghiệm thức 6 cho hàm lượng carotenoid thấp nhất là 138,673 $\mu\text{g/g}$.

Thực hiện phân tích ANOVA bằng phần mềm Design Expert ta có kết quả theo bảng 3.4 và 3.5.

Bảng 3. 24: Kết quả phân tích ANOVA của các yếu tố hồi quy theo Box - Behnken

| Biến độc lập | Tổng bình phương | Bậc tự do | Trung bình bình phương | F-value | p-value |
|---|------------------|-----------|------------------------|---------|----------|
| Mô hình | 3207,61 | 9 | 356,40 | 581,48 | < 0,0001 |
| X ₁ : Hàm lượng đường tổng (g/l) | 155,16 | 1 | 155,16 | 253,15 | < 0,0001 |
| X ₂ : Urea | 101,57 | 1 | 101,57 | 165,71 | < 0,0001 |
| X ₃ : pH | 4,59 | 1 | 4,59 | 7,49 | 0,04132 |
| X ₁ X ₂ | 4,18 | 1 | 4,18 | 6,83 | 0,0475 |
| X ₁ X ₃ | 56,65 | 1 | 56,65 | 92,42 | 0,0002 |
| X ₂ X ₃ | 6,63 | 1 | 6,63 | 10,81 | 0,0218 |
| X ₁ ² | 490,90 | 1 | 490,90 | 800,92 | < 0,0001 |
| X ₂ ² | 2324,57 | 1 | 2324,57 | 3792,62 | < 0,0001 |
| X ₃ ² | 380,41 | 1 | 380,41 | 620,65 | < 0,0001 |

Bảng 3. 25: Kết quả phân tích ANOVA của mô hình hồi quy theo Box - Behnken

| | Sai số chuẩn | R ² dự đoán | R ² | R ² hiệu chỉnh | Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu | p-value |
|---------|--------------|------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------------|----------|
| Mô hình | 0,78 | 0,9973 | 0,9990 | 0,9884 | 68,154 | < 0,0001 |

Dựa vào kết quả phân tích số liệu thực nghiệm ở bảng 3.3 bằng phần mềm Design Expert, phương trình hồi quy tuyến tính có dạng:

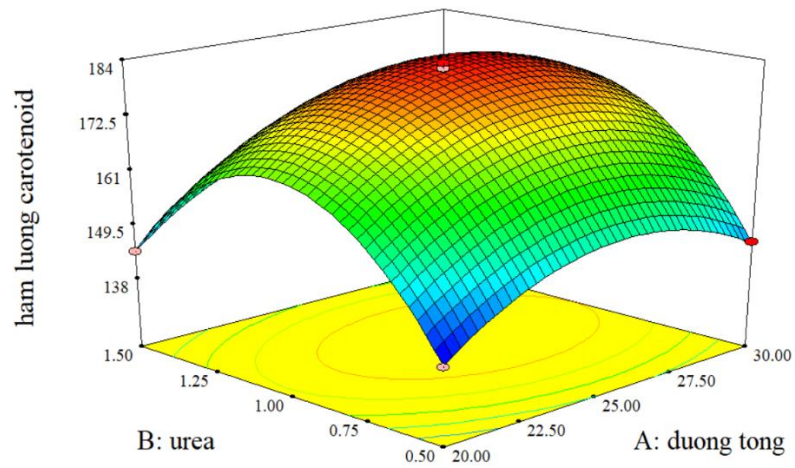
$$y = -1934,23975 + 32,56450X_1 + 228,51675X_2 + 528,47775X_3 + 0,40910X_1X_2 - 1,50530X_1X_3 - 5,14800X_2X_3 - 0,46122X_1^2 - 100,36500X_2^2 - 40,60100X_3^2$$

Trong đó: X₁: Hàm lượng đường tổng (g/l)

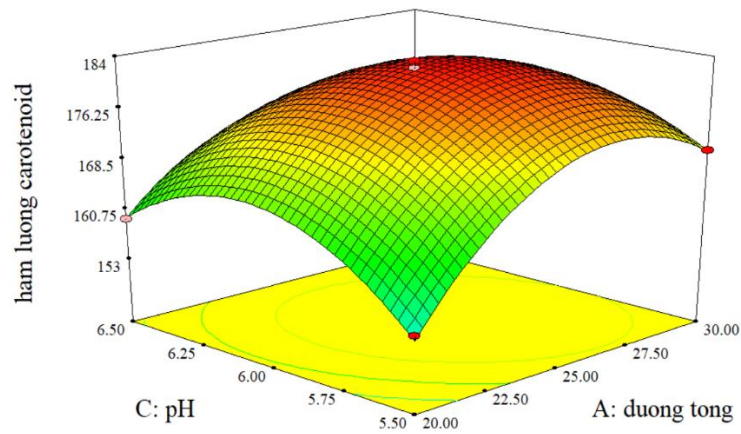
X₂: Urea (g/l)

X₃: pH

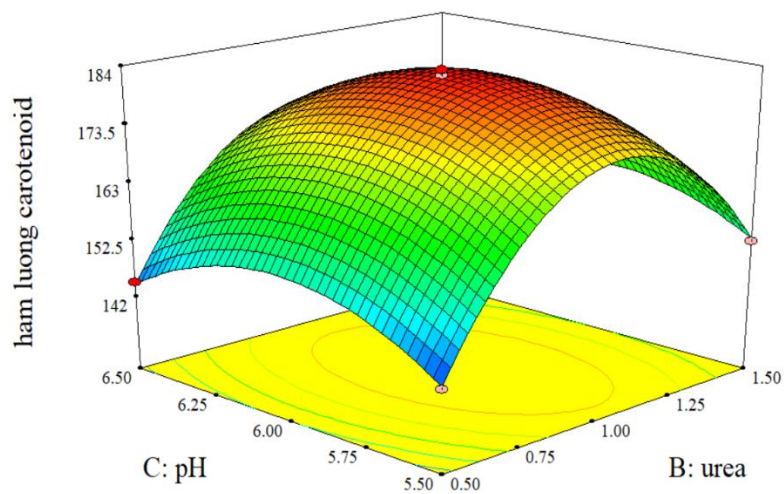
y: Hàm lượng carotenoid chứa astaxanthin (µg/g)



Hình 3. 34: Mặt đáp ứng hàm lượng carotenoid chứa astaxanthin theo hàm lượng đường tổng và urea



Hình 3. 35: Mặt đáp ứng hàm lượng carotenoid theo hàm lượng đường tổng và pH



Hình 3. 36: Mặt đáp ứng hàm lượng carotenoid theo hàm lượng đường tổng và pH

Dựa vào kết quả phân tích ANOVA được thể hiện ở bảng 3.4 và 3.5, mô hình thiết kế theo Box - Behnken, các biến độc lập và dạng bậc hai của chúng có giá trị p-value < 0,05, cho thấy các số liệu trên có ý nghĩa về mặt thống kê. Giá trị F-value của mô hình là 581,48, do đó mô hình này có ý nghĩa và chỉ có 0,01% cơ hội mô hình tương thích với mô hình phần dư do sự nhiễu trong thí nghiệm. Giá trị R^2 dự đoán là 0,9973 phù hợp với R^2 hiệu chỉnh là 0,9884 (độ lệch là $0,0089 < 0,2$). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là $68,154 > 4$ chứng tỏ tín hiệu đã đầy đủ. Đồng thời phép kiểm tra Lack of fit so sánh giữa sai số phần dư với sai số thuần từ các điểm được thiết kế lặp lại có giá trị là 1,7 chứng tỏ Lack of fit có ý nghĩa về mặt thống kê. Có 39,09% cơ hội mô hình không tương thích với mô hình phần dư trong thí nghiệm. Các kết quả trên chứng tỏ mô hình xây dựng được, có ý nghĩa thống kê.

Thành phần môi trường tối ưu được dự đoán để thu nhận carotenoid cao nhất ở chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides* hoang dại được thể hiện ở bảng 3.6. Nghiên cứu tiến hành nuôi chủng nấm men này trên môi trường dự đoán và thu được kết quả ở bảng sau.

Bảng 3. 26: Kết quả thực nghiệm và dự đoán hàm lượng carotenoid trong môi trường tối ưu

| | Hàm lượng đường tổng (g/l) | Urea (g/l) | MgSO ₄ .7H ₂ O (g/l) | KH ₂ PO ₄ (g/l) | pH | Hàm lượng carotenoid (µg/g) |
|-------------|----------------------------|------------|--|---------------------------------------|------|-----------------------------|
| Dự đoán | 26,04 | 1,04 | 3,0 | 2,0 | 5,96 | 183,162 |
| Thực nghiệm | 26,04 | 1,04 | 3,0 | 2,0 | 5,96 | 186,48 |

Dựa vào kết quả được thể hiện hàm lượng astaxanthin ở môi trường tối ưu trong thực nghiệm là 186,48 µg/g, cao hơn so với hàm lượng astaxanthin dự đoán 3,318 µg/g.

Kết quả chúng tôi thu nhận được sau khi tối ưu hóa thành phần môi trường là khi nuôi chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides* trong môi trường rỉ đường với hàm lượng đường tổng là 26,04 g/l, hàm lượng urea 1,04 g/l, MgSO₄.7H₂O 3 g/l, KH₂PO₄ 2g/l, pH 5,96 và tỷ lệ giống 10%, thời gian 82 giờ nuôi cấy (v/v) thu được hàm lượng carotenoid cao nhất là 186,48 µg/g.

3.4.5. Kết quả Nâng cấp hệ thống lên men 10 lít của *Rhodospiridium toruloides* trên môi trường rỉ đường tối ưu

Kết quả của tác giả Frengova và Beshkova (2009), khi nghiên cứu sự sản xuất carotenoid trên 2 chủng nấm men là *Phaffia rhodozyma* và *Rhodotorula* sp., Sắc tố trong hầu hết các nấm men bắt đầu tích lũy vào cuối giai đoạn pha lũy thừa và tiếp tục trong

pha ổn định và có sự biến thiên hàm lượng carotenoid khác nhau phụ thuộc vào các chủng nấm men và bị ảnh hưởng bởi môi trường nuôi cấy khác nhau. Vì thế, chúng tôi dựa vào đường cong tăng trưởng khi tăng sinh bậc 1 của chủng *Rhodospodium toruloides* ở môi trường rỉ đường đã nghiên cứu các yếu tố thích hợp để thu nhận hàm lượng sinh khối khô và astaxanthin.

Kết quả ở Hệ thống lên men 10 Lít như sau: khi nuôi cấy chủng nấm men *Rhodospodium toruloides* trên môi trường rỉ đường trong hệ thống 10 lít trọng lượng sinh khối khô thu được là 6,3682 (g/l), hàm lượng astaxanthin tính trên thể tích dịch nuôi cấy tương ứng là 1.932,21(μ g/l).

Bảng 3. 27: Hàm lượng sinh khối khô và astaxanthin thu nhận được của chủng nấm men *Rhodospodium toruloides* trên môi trường rỉ đường

| Trọng lượng sinh khối khô thu được (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|--|----------------------------|----------------------------|
| | (μ g/g sinh khối khô) | (μ g/l dịch nuôi cấy) |
| 6,3682 \pm 0,1144 | 230,89 \pm 6,74 | 1.932,21 \pm 56,38 |



Hình 3. 37 Sinh khối khô nấm men *Rhodospodium toruloides*

3.5. Kết quả tách chiết astaxanthin từ nấm men *Rhodospodium toruloides*

3.5.1. Kết quả tách chiết astaxanthin bằng HCl

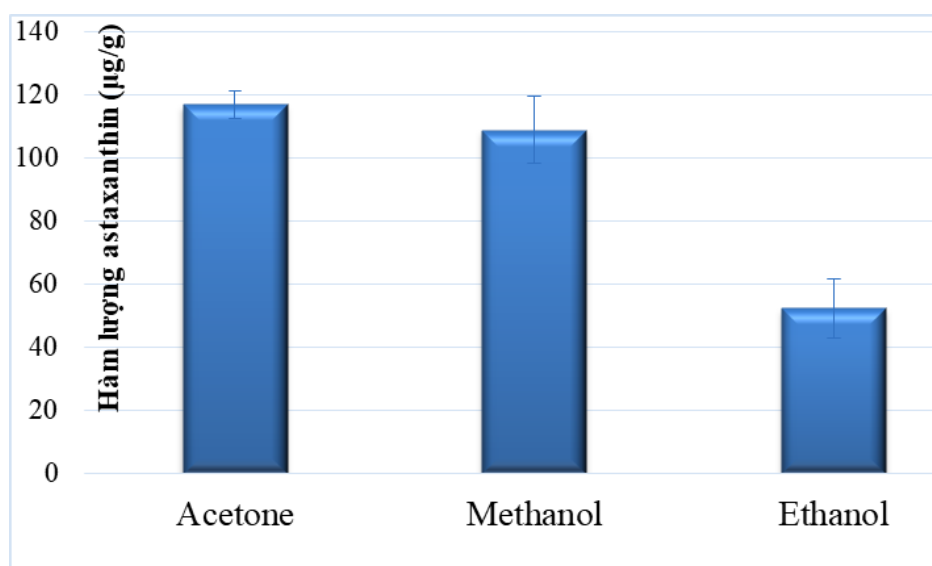
Theo nghiên cứu của Hui Ni và cộng sự (2008) cũng đã tách astaxanthin bằng HCl 4 mol/l từ *Phaffia rhodozyma* cho hiệu quả tách chiết cao [Hui Ni (2008)]. Trong quá trình khảo sát chúng tôi sử dụng HCl 0,4 N cho hàm lượng astaxanthin cao nhất, khi so với tác giả Hui Ni và cộng sự (2008) chúng tôi thấy có sự tương đồng là sử dụng HCl

tại nồng độ cao để tách chiết và đem lại hiệu quả thu nhận astaxanthin cao nhất. Vì vậy chúng tôi chọn nồng độ HCl 0,4 N cho thí nghiệm tiếp theo.

Chúng tôi tiếp tục tiến hành khảo sát thời gian ủ sinh khối nấm men khô với HCl. Khi ủ với HCl 0,4N cần phải có thời gian để HCl thủy phân vách tế bào nấm men. Kết quả khảo sát cho thấy thời gian 150 phút (86,69 $\mu\text{g/g}$) thì hàm lượng astaxanthin cao nhất.

Chúng tôi tiếp tục khảo sát 3 loại dung môi để chiết rút là acetone, ethanol và methanol.

Cụ thể như sau: Hút 5 ml HCl 4,5 N cho vào 0,2 g sinh khối nấm men khô ủ trong bể ổn nhiệt tại nhiệt độ là 80 $^{\circ}\text{C}$ trong 20 phút. Sau đó thu dịch nổi phía trên, tiếp tục cho 3 loại dung môi cần khảo sát (acetone, ethanol và methanol) vào với thể tích 10 ml ngâm đến khi mất màu (5 giờ), cứ 1 giờ thay dung môi cần khảo sát 1 lần. Sau đó gom tất cả dịch lại và tiến hành tách chiết và thu nhận astaxanthin.



Hình 3. 38: Hàm lượng astaxanthin chiết tách từ sinh khối nấm men khô bằng HCl với dung môi chiết rút khác nhau

Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng astaxanthin thu được thì acetone cho hàm lượng astaxanthin cao nhất (117,064 $\mu\text{g/g}$) cao hơn 2,23 lần so với ethanol (52,3807 $\mu\text{g/g}$), tiếp đến là methanol (108,968 $\mu\text{g/g}$) và thấp nhất là ethanol (52,3807 $\mu\text{g/g}$).

Theo nghiên cứu Hui Ni và cộng sự (2008) cũng đã tách astaxanthin từ *Phaffia rhodozyma* thì trong số các dung môi được kiểm tra, acetone và ethanol rõ ràng là cho hiệu quả hơn so với những dung môi khác để trích xuất astaxanthin từ *Phaffia*

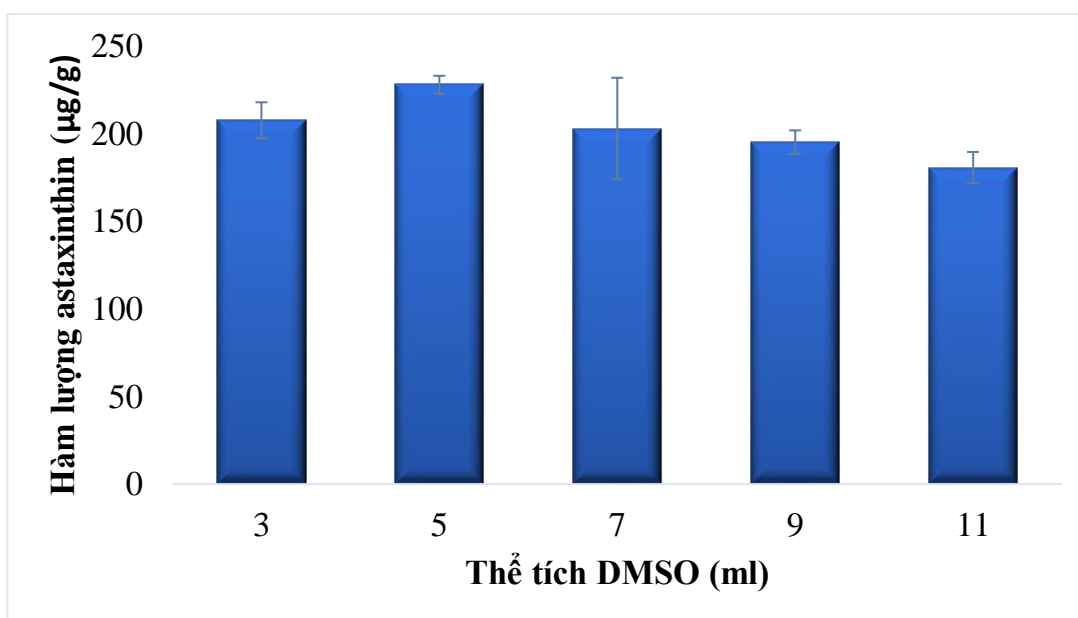
rhodozyma. Kết quả chúng tôi thấy rằng acetone cho hàm lượng astaxanthin cao nhất phù hợp với kết quả của tác giả [Hui Ni 2008]. Như vậy chọn HCl 0,4N, ủ 150 phút và chọn dung môi acetone để chiết rút astaxanthin.

3.5.2. Kết quả tách chiết bằng DMSO

3.5.2.1. Khảo sát thể tích DMSO

Từ kết quả cho thấy hàm lượng astaxanthin chiết từ sinh khối nấm men khô khi ngâm với DMSO với thể tích 5 ml (228,10 $\mu\text{g/l}$) cho hàm lượng astaxanthin nhiều hơn so với 3 ml (207,78 $\mu\text{g/l}$) là 1,09 lần, còn thể tích DMSO khảo sát còn lại (7 ml, 9 ml, 11 ml) thì không có sự chênh lệch nhiều so với thể tích 5 ml.

Vì vậy, chúng tôi chọn tỷ lệ thể tích DMSO 5 ml với 0,2 g tế bào sinh khối nấm men khô tỷ lệ dung môi là 25:1 (ml:g) đem lại hiệu quả tách và thu nhận astaxanthin cao. Kết quả thu được sẽ làm thí nghiệm tiếp theo.

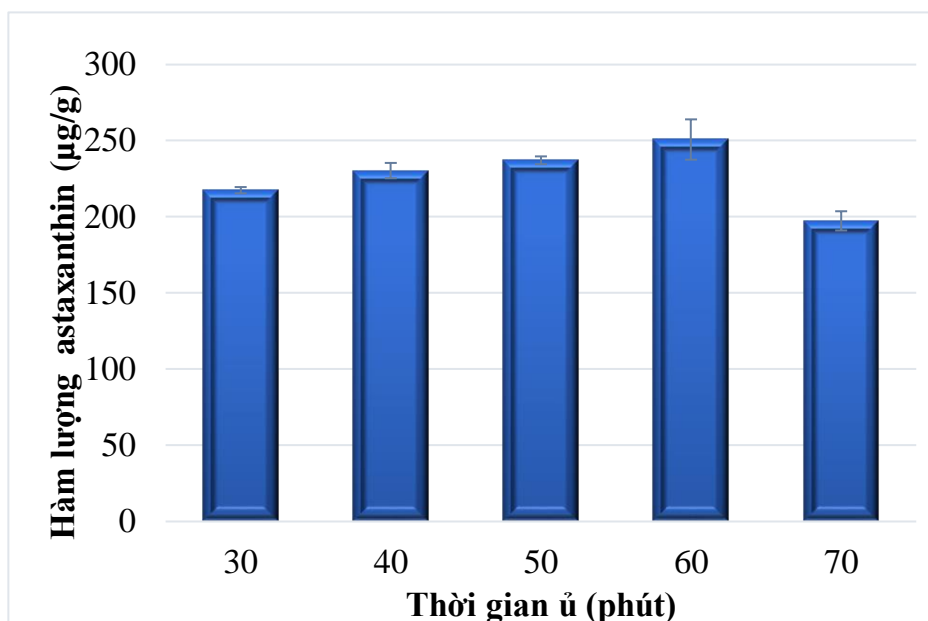


Hình 3. 39: Hàm lượng astaxanthin chiết từ sinh khối nấm men khô bằng DMSO với thể tích khác nhau

3.5.2.2. Kết quả khảo sát thời gian ủ DMSO

Từ kết quả cho thấy hàm lượng astaxanthin chiết từ sinh khối nấm men khô có sự tăng liên tục ở 30 phút (217,508 $\mu\text{g/l}$) đến 60 phút (250,793 $\mu\text{g/l}$), sau đó giảm mạnh ở 70 phút (197,381 $\mu\text{g/l}$). Trong đó, ngâm sinh khối nấm men khô với DMSO ở thời gian 60 phút (250,793 $\mu\text{g/l}$) cao gấp 1,153 lần so với 30 phút, 1,08 lần so với 40 phút, 1,06 lần so với 50 phút, 1,271 lần so với 70 phút.

Vì vậy chúng tôi chọn ngâm sinh khối nấm men khô với DMSO trong 60 phút đem lại hiệu quả tách và thu nhận astaxanthin cao.



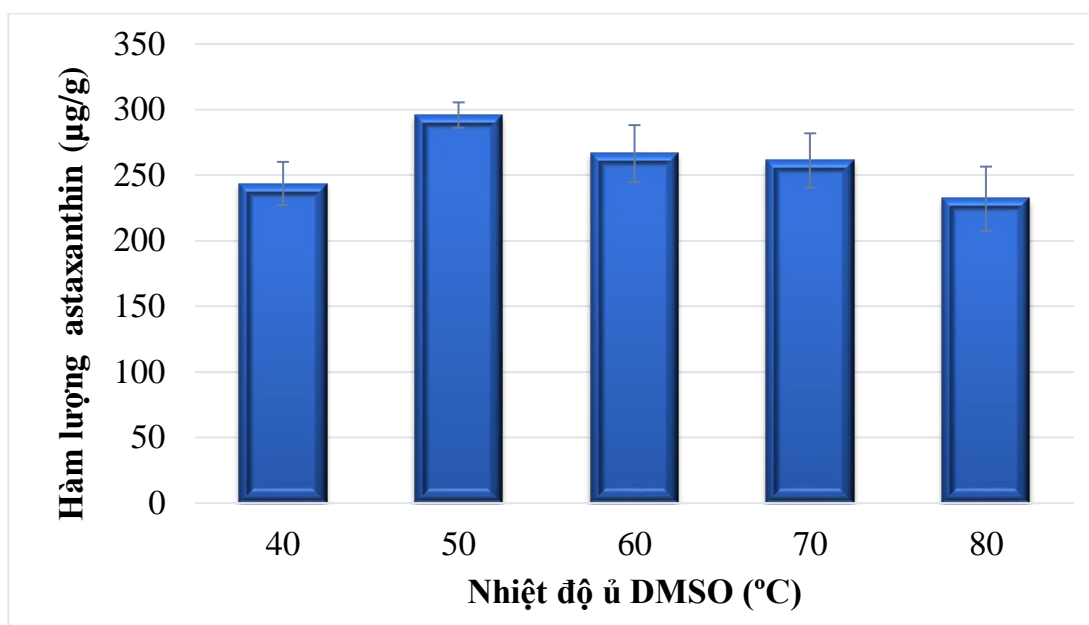
Hình 3. 40: Hàm lượng astaxanthin chiết từ sinh khối nấm men khô bằng DMSO với thời gian khác nhau

3.5.2.3. Kết quả khảo sát nhiệt độ ủ DMSO

Kết quả thu nhận được ở nhiệt độ ủ là 50°C cho hàm lượng astaxanthin cao nhất, các nhiệt độ còn lại (60°C đến 80°C) cho hàm lượng astaxanthin giảm dần.

Cụ thể: tại 40°C có hàm lượng astaxanthin là 243,651 µg/l, sau đó tăng mạnh hàm lượng astaxanthin tại nhiệt độ 50°C là 295,794 µg/l (tăng 1,21 lần). Sau đó tại nhiệt độ 60°C, 70°C, 80°C lần lượt 266,350 µg/l, 261,191 µg/l, 232,064 µg/l liên tục giảm.

Vì vậy chúng tôi ngâm sinh khối nấm men khô với DMSO trong 60 phút tại nhiệt độ 50°C đem lại hiệu quả tách và thu nhận astaxanthin cao.



Hình 3. 41: Hàm lượng astaxanthin tách từ sinh khối nấm men khô bằng DMSO ở nhiệt độ ủ khác nhau.

3.5.2.4. *Khảo sát dung môi hòa tan*

Khi đã khảo sát thể tích DMSO với nấm men, nhiệt độ ủ, thời gian ủ, chúng tôi tiếp tục khảo sát 3 loại dung môi để chiết rút là acetone, ethanol và methanol.

Cụ thể như sau: Hút 5 ml DMSO cho vào 0,2 (g) nấm men khô ủ trong bể ổn nhiệt tại nhiệt độ là 50°C trong 60 phút. Sau đó thu dịch nổi phía trên, tiếp tục cho 3 loại dung môi cần khảo sát (acetone, ethanol và methanol) vào với thể tích 10 ml ngâm đến khi mất màu (5 giờ), cứ 1 giờ thay dung môi cần khảo sát 1 lần. Sau đó gom tất cả dịch lại và tiến hành tách chiết và thu nhận astaxanthin.

Hàm lượng astaxanthin cao nhất (274,762 µg/g), cao hơn 1,24 lần so với methanol (222,461 µg/g) chất cho astaxanthin thấp nhất, cao hơn 1,1 lần so với ethanol (250,397 µg/g).

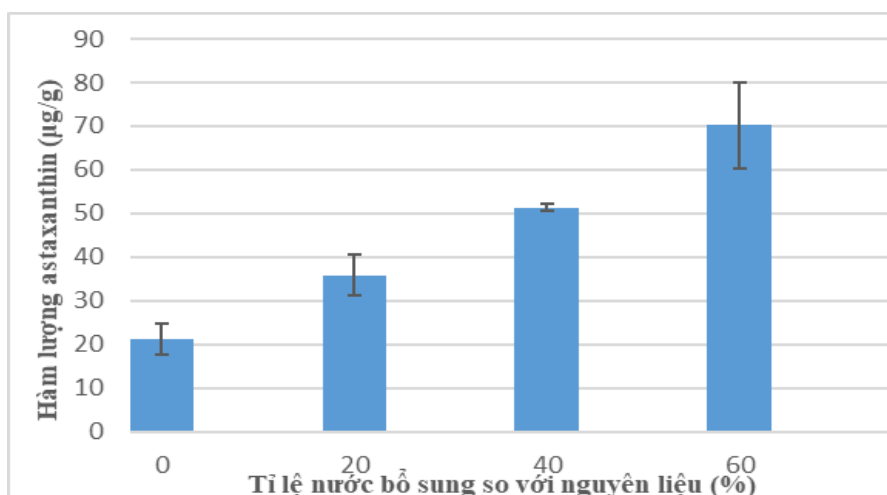
Kết luận: chúng tôi đã khảo sát điều kiện thích hợp nhất để thu nhận astaxanthin từ *Rhodospiridium toruloides* bằng DMSO như sau: tỷ lệ thể tích DMSO và nấm men khô (25:1), ủ 50°C trong bể ổn nhiệt với thời gian 60 phút. Sau đó thu dịch phía trên, phần phía dưới sinh khối nấm men khô tiếp tục ngâm với acetone đến khi mất màu (khoảng 5 giờ).

3.5.3. *Tách chiết astaxanthin bằng enzyme cellulase*

3.5.3.1. *Khảo sát thời gian ủ với cellulase*

Khảo sát ở thời gian ủ nấm men với cellulase ở các thời gian khác nhau từ 1 giờ,

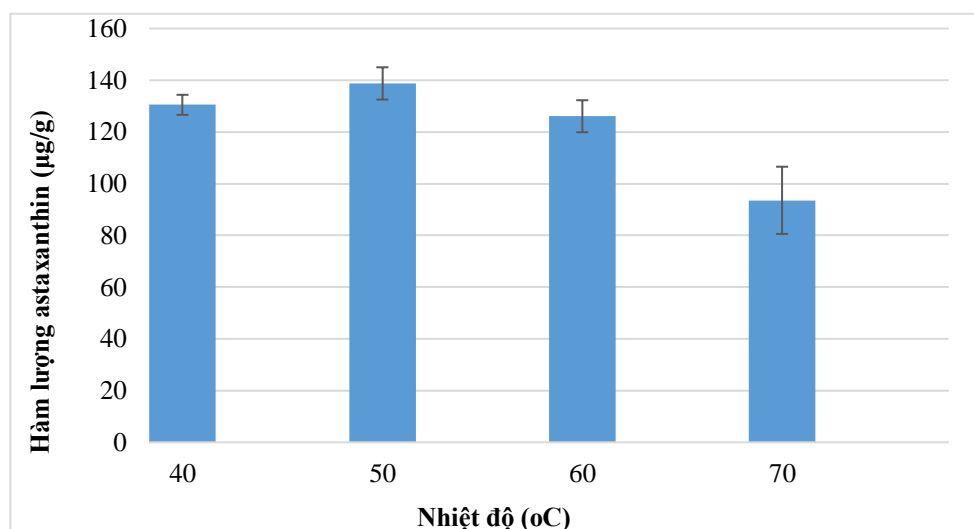
2 giờ, 3 giờ, 4 giờ và cố định các yếu tố pH 6.0, nhiệt độ 50°C, 3% thể tích enzyme và 60% thể tích nước.



Hình 3. 42: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men bằng cellulase với tỷ lệ nước khác nhau

Kết quả thể hiện hàm lượng astaxanthin được tách chiết tăng từ 1 giờ đến 2 giờ và bắt đầu giảm từ 3 giờ và không đáng kể. Hàm lượng astaxanthin đạt cao nhất lúc 2 giờ, cụ thể là 133,61 µg/g. Điều này chứng tỏ rằng thời gian cũng ảnh hưởng đến quá trình phân cắt của enzyme. Thời gian càng dài thì hàm lượng sản phẩm tạo thành càng nhiều. Tuy nhiên, đến một mức độ nhất định, lượng sản phẩm tạo ra sẽ giảm hoặc giảm không đáng kể, do khi quá trình phân cắt diễn ra có sử dụng nhiệt độ và khi ổn nhiệt ở thời gian dài sẽ làm ảnh hưởng đến cấu trúc không gian của enzyme, làm enzyme bị mất hoạt tính và hàm lượng sản phẩm tạo thành sẽ không tiếp tục tăng. Vì vậy, chúng tôi chọn thời gian ủ cho hoạt động của cellulase để phá màng tế bào nấm men trong 2 giờ đem lại hiệu quả tách chiết, thu nhận hàm lượng astaxanthin cao và tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm sau.

3.5.3.2. *Khảo sát nhiệt độ thích hợp đối với hoạt động của cellulase để phá màng tế bào nấm men*



Hình 3. 43: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men bằng cellulase ở nhiệt độ ủ khác nhau

Tiến hành khảo sát ở các nhiệt độ khác nhau từ 40°C, 50°C, 60°C, 70°C và có thời gian ủ là 2 giờ và cố định các yếu tố còn lại pH 6.0, nhiệt độ 50°C, 3% thể tích enzyme và 60% thể tích nước.

Kết quả thể hiện hàm lượng astaxanthin tăng từ 40°C đến 50°C và sau đó giảm dần. Hàm lượng astaxanthin đạt cao nhất ở 50°C là 138,77 µg/g. Theo tính chất của enzyme, vận tốc phản ứng sẽ tăng khi nhiệt độ tăng, tuy nhiên đến nhiệt độ 60°C thì vận tốc phản ứng sẽ giảm do bản chất của enzyme là protein, ở nhiệt độ cao sẽ làm thay đổi cấu trúc không gian của enzyme làm enzyme bị mất hoạt tính, do đó hoạt tính xúc tác giảm. Nhiệt độ thích hợp của phản ứng enzyme thường nằm trong khoảng 40°C - 50°C và có thể biến đổi phụ thuộc vào độ sạch enzyme, thời gian phản ứng. Do đó, nhiệt độ ủ cho hoạt động của cellulase để phá màng tế bào nấm men được chọn là 50°C đem lại hiệu quả tách chiết, thu nhận hàm lượng astaxanthin cao nhất và tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm sau.

3.5.3.3. *Khảo sát pH thích hợp cho hoạt động của cellulase*

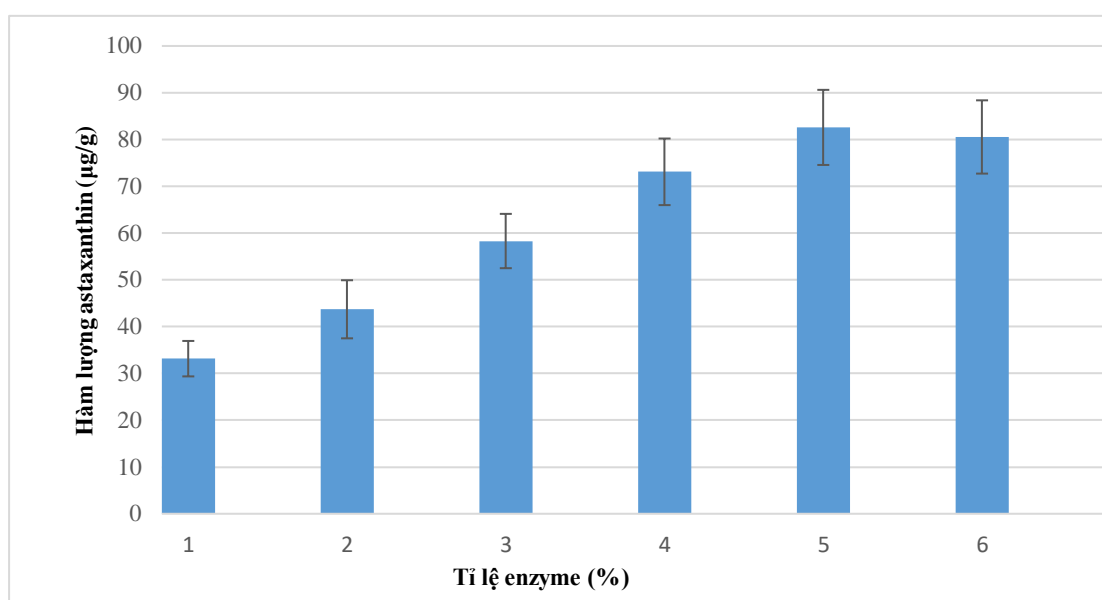
Chúng tôi tiến hành khảo sát ở các giá trị pH khác nhau lần lượt là 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5 với thời gian ủ là 2 giờ và nhiệt độ 50°C và cố định các yếu tố còn lại 3% thể tích enzyme và 60% thể tích nước.

Kết quả cho thấy, hàm lượng carotenoid tạo ra tăng theo sự thay đổi giá trị pH và khi ở pH 5.5 thì hàm lượng carotenoid đạt cao nhất, cụ thể là 68,480 µg/g. Mỗi enzyme

có một giá trị pH tối ưu, sự thay đổi pH sẽ làm thay đổi hình dạng của trung tâm hoạt động liên kết với cơ chất. Giá trị pH thay đổi sẽ làm thay đổi trạng thái ion hóa của các acid amin, dẫn đến làm thay đổi các liên kết ion xác định nên cấu trúc không gian của enzyme nên tại các giá trị pH khác nhau có hiệu quả xúc tác khác nhau. Đối với cellulase, pH 5.5 là thích hợp nhất cho hoạt động của enzyme vì cấu trúc không gian hoạt động ổn định nhất. Vì vậy, giá trị pH 5.5 được chọn thích hợp cho hoạt động của cellulase để phá màng tế bào nấm men đem lại hiệu quả tách chiết, thu nhận hàm lượng astaxanthin cao nhất và tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm sau.

3.5.3.4. Khảo sát nồng độ cellulase thích hợp được bổ sung để phá màng tế bào nấm men

Thí nghiệm tiến hành khảo sát tỷ lệ sử dụng của cellulase với nồng độ (E/S) thay đổi từ 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% (v/w) tương ứng với hoạt độ lần lượt là 0,15 UI/ml; 0,29 UI/ml; 0,44 UI/ml; 0,59 UI/ml; 0,79 UI/ml; 0,88 UI/ml, cố định các điều kiện còn lại.



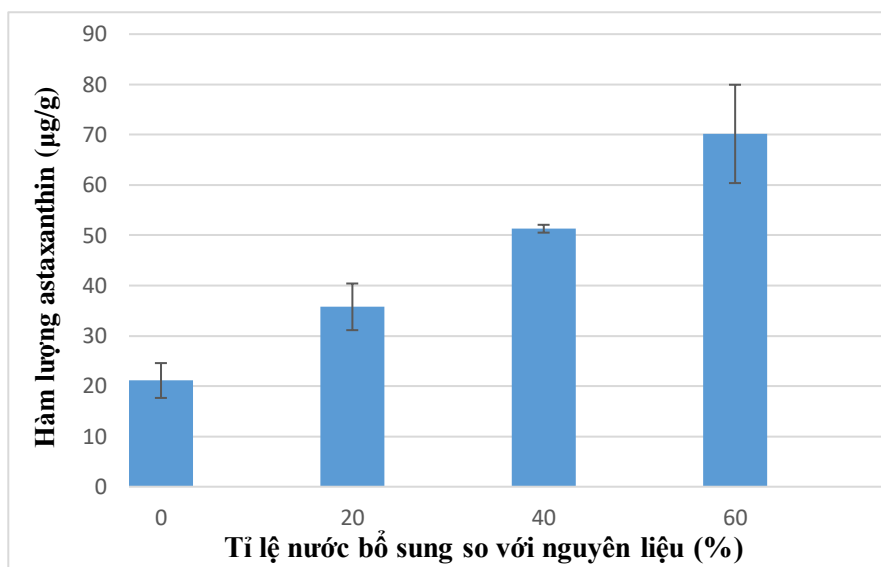
Hình 3. 44: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men với nồng độ cellulase (UI/ml) khác nhau

thể là 82,593 µg/g và sau đó có xu hướng gần như cân bằng. Điều này có thể giải thích rằng khi tỷ lệ enzyme tăng thì vận tốc phản ứng cũng tăng, dẫn đến hàm lượng carotenoid tạo ra nhiều. Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ enzyme đến một mức nào đó thì vận tốc của phản ứng thay đổi rất ít vì nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất, do đó hàm lượng sản phẩm tạo ra không thay đổi hoặc giảm không đáng kể. Do đó, tỷ lệ enzyme 5% ứng

với nồng độ 0,79 UI/ml được chọn cho hoạt động của cellulase để phá màng tế bào nấm men đem lại hiệu quả tách chiết, thu nhận hàm lượng astaxathin cao và tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm sau.

3.5.3.5. Khảo sát tỷ lệ nước bổ sung thích hợp cho hoạt động của cellulase

Tiến hành khảo sát tỷ lệ nước bổ sung vào sinh khối nấm men lần lượt là 0, 20%, 40%, 60% (v/w) với thời gian ủ 2 giờ, nhiệt độ thích hợp 50°C, ở pH 6 và nồng độ enzyme 0,79 UI/ml.



Hình 3. 45: Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tách chiết từ sinh khối nấm men bằng cellulase với tỷ lệ nước khác nhau.

Kết quả cho thấy hàm lượng astaxanthin tăng tỷ lệ thuận với tỷ lệ nước bổ sung, hàm lượng astaxanthin cao nhất là 70,157 µg/g khi tỷ lệ nước bổ sung là 60% (v/w). Vì nước là một thành phần quan trọng đối với hoạt động thủy phân của các enzyme trong nhóm hydrolase. Do đó, tỷ lệ nước bổ sung vào nguyên liệu phải phù hợp cho hoạt động xúc tác của enzyme nhằm tạo điều kiện thích hợp cho phản ứng thủy phân xảy ra dễ dàng. Điều này có thể giải thích rằng khi tỷ lệ nước bổ sung tăng thì hàm lượng carotenoid tạo ra cũng tăng, tuy nhiên khi tỷ lệ nước bổ sung quá nhiều có thể dẫn đến hàm lượng sản phẩm tạo ra sẽ rất ít là do sự cản trở khả năng tiếp xúc của enzyme so với nguyên liệu bởi một lượng nước lớn. Do đó, tỷ lệ 60% nước bổ sung so với nguyên liệu cho hoạt động của cellulase thích hợp để phá màng tế bào nấm men đem lại hiệu quả tách chiết, thu nhận hàm lượng astaxanthin cao.

Kết luận: Sau khi khảo sát điều kiện thích hợp nhất để thu nhận hàm lượng astaxanthin từ nấm men *Rhodospiridium toruloides* bằng cellulase với hoạt độ 0,79

UI/ml thời gian ủ 2 giờ, nhiệt độ ủ là 50°C, pH 5.5, và tỷ lệ nước bổ sung so với nguyên liệu là 60% v/w. Astaxanthin được chiết trong ete dầu hỏa rồi đem đo mật độ quang ở bước sóng 474nm. Hàm lượng astaxanthin thu được trung bình $82,319 \pm 4,4823 \mu\text{g/g}$.

Nhận xét chung về tách chiết:

Hàm lượng astaxanthin thu nhận bởi các phương pháp tách chiết là khác nhau. Trong đó bằng DMSO cho lượng astaxanthin cao nhất (287,159 $\mu\text{g/g}$), tiếp đến là tách chiết bằng HCl cho lượng astaxanthin thấp hơn (133,428 $\mu\text{g/g}$). Tách chiết bằng enzyme cellulase thấp nhất (82,319 $\mu\text{g/g}$).

Tách chiết bằng DMSO cho hàm lượng astaxanthin cao nhất vì DMSO có khả năng liên kết kỵ nước với lớp phospholipid của màng tế bào, sự gắn kết này làm giãn nở màng, thậm chí có thể dẫn đến trương phồng tế bào, hơn nữa DMSO còn phá vỡ tương tác lipid và protein làm ảnh hưởng chức năng của màng tế bào. Một số dung môi hòa tan trong nước như acetone, ethanol và methanol có thể thâm nhập vào lớp nước bên ngoài một cách dễ dàng và có thể trích xuất astaxanthin ra khỏi nấm men hồng hiệu quả, trong đó acetone là dung môi chiết rút astaxanthin hiệu quả phù hợp với nghiên cứu của Hui và cộng sự [Hui Ni (2008)].

Theo nghiên cứu Pyoung-kyu Park và cộng sự (2007) đã thực hiện tách chiết carotenoid từ nấm men *Rhodotorula glutinis* bằng phương pháp hóa học, sử dụng DMSO là tác nhân phá màng tế bào nấm men, kết quả đạt được hàm lượng carotenoid được tách chiết cao là 226,10 $\mu\text{g/g}$. Kết quả này cao gấp 2,7 lần so với kết quả đạt được trong nghiên cứu này là 82,319 $\mu\text{g/g}$.

Điều này cho thấy rằng phương pháp hóa học mang lại hiệu quả tách chiết cao hơn so với phương pháp sinh học. Cơ sở của việc phá màng bằng DMSO là nó có khả năng liên kết kỵ nước với lớp đôi phospholipid của màng tế bào, sự gắn kết này làm giãn nở màng, thậm chí có thể dẫn đến trương phồng tế bào, dẫn đến sự vỡ tế bào. Hơn nữa DMSO còn phá vỡ tương tác lipid và protein làm ảnh hưởng chức năng của màng tế bào. Ngoài ra, nghiên cứu của Michelon và cộng sự (2012) đã thực hiện tách chiết carotenoid từ nấm men *Phaffia rhodozyma* bằng enzyme β -1,3-glucanase, là enzyme đặc hiệu cho việc thủy phân β -glucan trên thành tế bào. Kết quả thu được hàm lượng carotenoid là 143,90 $\mu\text{g/g}$ ở các điều kiện tách chiết thích hợp (pH 4.5, 55°C, 0,6 UI/ml, thời gian ủ trong 30 phút). Đối chiếu với kết quả mà thu nhận được thì hàm lượng astaxanthin 82,319 $\mu\text{g/g}$ thấp hơn so với nhóm nghiên cứu của Michelon và cộng sự.

Điều này có thể giải thích rằng, việc sử dụng enzyme không đặc hiệu cellulase mang lại hiệu quả tách chiết thấp hơn so với sử dụng enzyme đặc hiệu dùng để phá tế bào nấm men.

3.6. Thử nghiệm hoạt tính sinh học của astaxanthin từ nấm men *Rhodospodium toruloides*.

3.6.1. Hoạt tính kháng oxy hoá của dịch chiết astaxanthin

3.6.1.1. Bắt gốc tự do DPPH

Kết quả bảng 3.28: cho thấy giá trị IC_{50} của dịch chiết astaxanthin thấp hơn so với các mẫu đối chứng là vitamin C và BHA. Trong đó IC_{50} vitamin C cao hơn so với astaxanthin tách bằng DMSO là 2.62 lần. Đối với IC_{50} của BHA so với astaxanthin tách bằng DMSO là 1,93 lần. Điều này, chứng tỏ mẫu khảo sát có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh hơn nhiều so với BHA và vitamin C (IC_{50} càng cao thì hoạt tính kháng oxy hóa càng giảm). Khả năng bắt gốc tự do DPPH (%) của astaxanthin 91,23% cao hơn vitamin C (51,317%) 1.77 lần, cao hơn BHA (68.343 %) 1,33 lần.

So với nhóm nghiên cứu Suganya V. và S.T. Asheeba (2015) hoạt tính kháng khuẩn của astaxanthin thu nhận từ 3 loại cua *Portunus sanguinolentus* (Three Spotted Crab), *Callinectes sapidus* (Blue Crab) và *Paralithodes brevipes* (Spiny King Crab) khả năng bắt gốc tự do DPPH (ba loài cua) dao động từ chiếm 67% đến 79% [14], nghiên cứu này được so sánh với Soundarapandian P. và cộng sự, năm 2014, báo cáo vai trò astaxanthin trong bắt gốc tự do 59% và 48% vỏ cua *C. lucifera* [14]. Vì vậy astaxanthin có hoạt tính bắt gốc tự do cao hơn vitamin C và BHA.

Bảng 3. 28: Giá trị IC_{50} của vitamin C, BHA và mẫu dịch chiết astaxanthin

| Mẫu | Khả năng bắt gốc tự do DPPH (%) | Giá trị IC_{50} |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------|
| Vitamin C | 51.317 | 7.0180 |
| BHA | 68.343 | 5.1690 |
| Astaxanthin bằng DMSO | 91.231 | 2.6814 |

3.6.1.2. Bắt gốc tự do ABTS+

Kết quả bắt gốc tự do ABTS+ thể hiện tại bảng 3.29 thể hiện giá trị IC_{50} cho thấy khả năng bắt gốc tự do ABTS+ tăng theo nồng độ chất khảo sát. Tỷ lệ bắt gốc tự do ABTS+ của mẫu chiết bằng DMSO có giá trị IC_{50} là 14.832 cũng tương đương với mẫu đối chứng vitamin C và BHA (Vitamin C và BHA có IC_{50} lần lượt là 14,330 và 14,429).

Bảng 3. 29: Giá trị IC₅₀ của vitamin C, BHA và mẫu dịch chiết astaxanthin

| Mẫu | Khả năng bắt gốc tự do ABTS ⁺ (%) | Giá trị IC ₅₀ |
|-----------------------|--|--------------------------|
| Vitamin C | 81,135 | 14,330 |
| BHA | 85,648 | 14,429 |
| Astaxanthin bằng DMSO | 88,907 | 14,832 |

3.6.1.3. Năng lực khử

Kết quả năng lực khử thể hiện tại bảng 3.30, tại nồng độ 25 µg/ml, giá trị ΔOD_{700nm} cho thấy, hoạt tính năng lực khử của mẫu astaxanthin chiết bằng DMSO cao hơn so với vitamin C và BHA khoảng (1,15 lần đến 1,3 lần), chứng minh astaxanthin là một chất có khả năng kháng oxy hóa mạnh.

So với nghiên cứu của Suganya V. và S.T. Asheeba (2015) astaxanthin có khả năng cho một điện tử cho sự vô hiệu hóa các gốc tự do. Khả năng về năng lực khử của astaxanthin thu nhận từ 3 loại cua *Portunus sanguinolentus* (Three Spotted Crab), *Callinectes sapidus* (Blue Crab) và *Paralithodes brevipes* (Spiny King Crab) cho thấy tăng giá trị ΔOD_{700nm} là 0,03 trong 10 phút và ΔOD_{700nm} 0,06 trong 30 phút. Kết quả này tương quan với astaxanthin như một chất khử mạnh.

Bảng 3. 30: Giá trị ΔOD_{700nm} của vitamin C, BHA và mẫu chiết astaxanthin

| Mẫu | Giá trị ΔOD _{700 nm} |
|-----------------------|-------------------------------|
| Vitamin C | 0,2427 ± 0,0021 ^f |
| BHA | 0,269 ± 0,0165 ^f |
| Astaxanthin bằng DMSO | 0,3110 ± 0,0181 ^f |

3.6.2. Kết quả thử kháng khuẩn của dịch chiết astaxanthin từ *Rhodospiridium toruloides*

Từ kết quả nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của astaxanthin lên chủng vi khuẩn *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* và *Staphylococcus aureus* ta thấy rằng thu nhận astaxanthin từ *Rhodospiridium* sp., bằng DMSO có khả năng kháng khuẩn và ức chế sự phát triển của vi khuẩn được thể hiện ở hình 3.31 và bảng 3.32. Vì tạo vòng kháng khuẩn tương đối rộng và rõ (đường kính kháng khuẩn từ 11 mm đến 17 mm) tùy theo chủng vi khuẩn khi tăng dần nồng độ astaxanthin: 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml và 100 µg/ml. Điều này, chứng tỏ hoạt tính của astaxanthin thu nhận bằng DMSO kìm hãm sự phát triển vi khuẩn. Đối chứng âm DMSO không tạo vòng

kháng khuẩn (đường kính kháng khuẩn bằng 0 mm), đối chứng dương tạo vòng kháng khuẩn rộng và rõ (đường kính kháng khuẩn từ 25 mm đến 37 mm) tùy theo chủng vi khuẩn khảo sát.

Kết quả của nhóm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn tương đồng so với nhóm nghiên cứu Uma và cộng sự (2013) phân lập astaxanthin từ marine yeast và nghiên cứu về hoạt tính dược lý, đưa ra kết luận là hoạt tính kháng khuẩn của astaxanthin được nghiên cứu bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, *Salmonella typhi* tạo đường kính 20 mm cho vùng ức chế, *Pseudomonas aeroginosa* 24 mm, *Bacillus subtilis* 18 mm, *Staphylococcus aureus* 16 mm. Chiết xuất cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tuyệt vời so với chloramphenicol chuẩn (đối chứng).

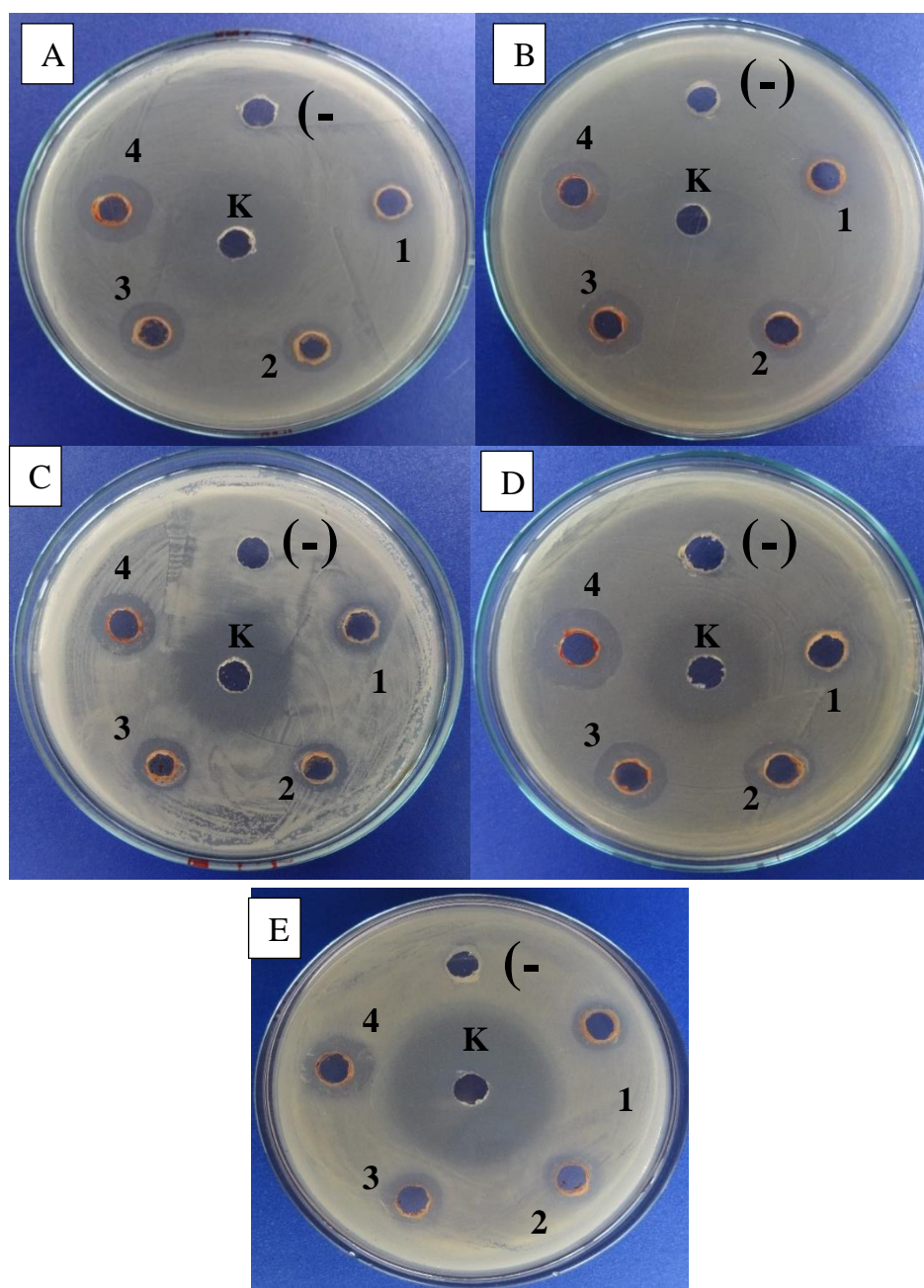
Theo nghiên cứu Suganya V. và S.T. Asheeba (2015) cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của astaxanthin thu nhận từ 3 loại cua *Portunus sanguinolentus* (Three Spotted Crab), *Callinectes sapidus* (Blue Crab) và *Paralithodes brevipes* (Spiny King Crab) và astaxanthin chuẩn kháng lại vi khuẩn (*E.coli*) từ sữa và thịt thối. Các sắc tố astaxanthin đã được tìm thấy có hiệu quả kháng khuẩn tại nồng độ 50 µg, có đường kính kháng khuẩn là $10,05 \pm 0,53$ mm đến $12,11 \pm 0,95$ mm [14].

Kết luận: Astaxanthin có hiệu quả chống vi khuẩn gram dương và gram âm khi so sánh với chloramphenicol tiêu chuẩn.

Giải thích: Khả năng kháng khuẩn của astaxanthin là do thay đổi mật độ điện tích trên màng, cấu trúc của lipopolysaccharides và thành phần lipid của màng tế bào chất trong vi khuẩn gram âm và gram dương [14].

Bảng 3. 31: Đường kính kháng khuẩn astaxanthin được thu nhận từ *Rhodospiridium toruloides* bằng DMSO

| Chủng vi khuẩn | Nồng độ astaxanthin (µg/ml) | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----|------|------|------|------|
| | (KS) | (-) | 25 | 50 | 75 | 100 |
| <i>Bacillus subtilis</i> (+) | 33 | 0 | 11.0 | 13.0 | 15.0 | 17.0 |
| <i>E. Coli</i> (-) | 25 | 0 | 10,0 | 12.0 | 15.0 | 17.3 |
| <i>Pseudomonas aeroginosa</i> (-) | 37 | 0 | 11.0 | 13.0 | 14.0 | 17.0 |
| <i>Salmonella typhi</i> (-) | 30 | 0 | 11.0 | 12.7 | 15.0 | 17.0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (+) | 35 | 0 | 11.0 | 12.0 | 14.0 | 16.3 |



Hình 3.46: Khả năng kháng khuẩn của astaxanthin thu nhận

từ *Rhodosporidium toruloides* bằng DMSO

Chú thích:

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| (A): <i>Bacillus subtilis</i> (+). | (B): <i>E. coli</i> (-). | (C): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-) |
| (D): <i>Salmonella typhi</i> (-) | (E): <i>Staphylococcus aureus</i> (+) | |
| (-): Đối chứng âm là DMSO | (KS): Kháng sinh chloramphenicol | |
| (1): Dịch chiết astaxanthin 25 µg/ml | (2): Dịch chiết astaxanthin 50 µg/ml | |
| (3): Dịch chiết astaxanthin 75 µg/ml | (4): Dịch chiết astaxanthin 100 µg/ml | |

3.6.3. Thử nghiệm hoạt tính tăng cường màu sắc ở cá đĩa đỏ *Symphysodon sp.*, của astaxanthin từ *Rhodosporidium toruloides*

Kết quả ảnh hưởng astaxanthin lên màu sắc của cá đĩa được đánh giá thông qua điểm số thể hiện màu sắc. Sau ba tháng thí nghiệm, kết quả cho thấy Astaxanthin được

chiết xuất từ sinh khối nấm men *Rhodospiridium toruloides* có tác dụng cải thiện màu sắc trên cá đĩa đỏ *Symphysodon* sp., ở liều 90 mg/kg.

Kết quả về điểm số màu sắc trung bình của bảng 3.32 và phân tích thống kê ANOVA một yếu tố thì cá đĩa có màu sắc đậm nhất ở nghiệm thức 2 (**astaxanthin trên thị trường**) với số điểm trung bình là 28,25; kế đến là nghiệm thức 1 (**astaxanthin chiết xuất từ *Rhodospiridium toruloides***); nghiệm thức đối chứng không sử dụng astaxanthin thể hiện kết quả màu sắc trên da cá đĩa nhạt nhất với 20,48 điểm. Điều này có thể do astaxanthin chiết xuất từ sinh khối nấm men có nguồn gốc tự nhiên cho tác dụng lên màu cho cá đĩa diễn ra chậm hơn và theo một cơ chế tác động nhiều giai đoạn, còn astaxanthin trên thị trường được tổng hợp hóa học nên tác động nhanh hơn.

Bảng 3. 32: Điểm số màu sắc của cá đĩa đỏ ở các nghiệm thức

| Nghiệm thức | Điểm số |
|-------------|---------------------------|
| | Trung bình độ lệch chuẩn |
| ĐC | 20,48 ^c ± 0,10 |
| NT1 | 26,23 ^b ± 0,20 |
| NT2 | 28,25 ^a ± 0,21 |

Ghi chú: Điểm số của mỗi lần lặp là trung bình của 3 người tham gia đánh giá dựa vào bảng điểm của quạt so màu. Những chữ cái trên cùng một cột khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).



Hình 3. 47: Màu sắc của cá đĩa đỏ *Symphysodon* sp., khi cho ăn thức ăn có astaxanthin ở các nghiệm thức

3.7. So sánh kết quả trên tảo *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Rhodospiridium toruloides*

Kết quả so sánh đối chiếu kết quả về astaxanthin thu nhận từ Tảo *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Rhodospiridium toruloides*, cũng như thử nghiệm một số hoạt tính sinh học được thể hiện ở bảng 3.33.

Bảng 3. 33: Đối chiếu kết quả về thu nhận và hoạt tính sinh học của astaxanthin chiết suất từ tảo *Haematococcus pluvialis* và nấm men *Rhodospiridium toruloides*

| Nội dung | Vi tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> | Nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> |
|---|--|--|
| <p>Nuôi cấy thu nhận astaxanthin</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Vòng đời của tảo <i>Haematococcus pluvialis</i>: Tảo chủ yếu ở dạng sinh dưỡng hình elip màu xanh, có hai roi, chuyển động, trong 12 ngày nuôi đầu tiên nuôi cấy. Từ 12 đến 14 ngày nuôi tiếp theo, tảo dạng tế bào hình khối cầu, màu xanh, mất hai roi, không có khả năng chuyển động. Từ 14 đến 20 ngày nuôi tiếp theo, tảo chuyển sang giai đoạn tạo bào nang, nội chất bên trong tế bào có màu nâu do tảo bắt đầu tích lũy astaxanthin. - Môi trường RM tảo đạt mật độ tế bào cực đại, hàm lượng astaxanthin, trọng lượng khô là cao nhất với các giá trị tương ứng $5,13 \times 10^5$ TB/ml, 487 $\mu\text{g/l}$, 2,32 g/l. - Tảo <i>H. pluvialis</i> sinh trưởng và phát triển mạnh nhất ở ánh sáng trắng (mật độ tế bào cực đại là $5,53 \times 10^5$ TB/ml, hàm lượng astaxanthin 469,33 $\mu\text{g/l}$ và trọng lượng khô 2,35 g/l và thấp nhất là ánh sáng đỏ (mật độ tế bào cực đại là $2,6 \times 10^5$ TB/ml, hàm lượng astaxanthin 66,67 $\mu\text{g/l}$ và trọng lượng khô 0,62 g/l). - Điều kiện Stress gây tích lũy astaxanthin trong 4 ngày liên tục: ở cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ thời gian chiếu sáng lên 24 giờ và nhiệt độ khoảng 33⁰C thì hàm lượng astaxanthin và trọng | <ul style="list-style-type: none"> - Vòng đời của nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i>: trên môi trường rỉ đường chia làm 4 pha, pha tiềm tàng trong khoảng 6 giờ đầu, pha tăng trưởng hàm mũ vào khoảng giờ thứ 8 đến giờ thứ 30, pha ổn định từ giờ thứ 32 đến giờ thứ 80, pha suy tàn từ giờ thứ 82 trở về sau. - Thành phần khoáng bổ sung vào môi trường rỉ đường như $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/l, urea 0,5 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, tỷ lệ giống so với môi trường nuôi cấy là 10% (mật độ tế bào từ 8 đến 10×10^6 tế bào/ml), hàm lượng đường tổng trong rỉ đường là 25 g/l. Thời điểm thu nhận astaxanthin từ <i>Rhodospiridium toruloides</i> là 82 giờ. - Tối ưu để thu nhận carotenoid từ chủng nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i>, thành phần môi trường tối ưu hóa rỉ đường thu nhận carotenoid gồm hàm lượng đường tổng là 26,04 g/l, hàm lượng urea 1,04 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, pH 5,96 và tỷ lệ giống 10% (v/v), thời gian nuôi cấy là 80 giờ, thu được hàm lượng carotenoid cao nhất là 186,48 $\mu\text{g/g}$. |

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| | <p>lượng khô thu được là cao nhất.</p> <p>Quy trình nuôi sinh khối tảo <i>H. Pluvialis</i> ở quy mô 20 lít theo quy trình nuôi tảo 2 pha:</p> <p>(1) Pha I (14 ngày): môi trường lỏng RM, mật độ tảo ban đầu 10^5 TB/ml, ánh sáng đèn led trắng với cường độ chiếu sáng $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, thời gian sáng 12 giờ, sục khí liên tục, cung cấp khí CO_2 với hàm lượng 18ppm cho tảo quang hợp; (2) Pha 2 (4 ngày stress): cường độ chiếu sáng $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ. Hàm lượng astaxanthin sau ly trích đạt từ 5.144 – 7.535,8$\mu\text{g}/\text{L}$ chiếm từ 2,34 - 2,61%/SKK.</p> | |
| Tách chiết | <p>- Tách chiết bằng DMSO có hàm lượng astaxanthin là cao hơn mẫu được chiết bằng thủy tinh</p> | <p>- Tách chiết bằng DMSO có hàm lượng astaxanthin là cao nhất (287,159 $\mu\text{g}/\text{g}$), tiếp đến là bằng HCl (133,428 $\mu\text{g}/\text{g}$) và thấp nhất là thu nhận bằng enzyme $82,319 \pm 4,4823 \mu\text{g}/\text{g}$.</p> |
| Thử nghiệm hoạt tính sinh học | <p>- Dịch astaxanthin tách chiết từ tảo <i>Haematococcus pluvialis</i> có hoạt tính kháng oxi hóa qua năng lực khử gốc ABTS^+ mạnh gấp 1,53 lần so với mẫu BHA và mẫu astaxanthin thu được có khả năng khử mạnh hơn BHA 1,17 lần.</p> <p>- Kết quả nghiên cứu tăng màu sắc trên cá đĩa với liều lượng 75 mg/kg thức ăn, cho kết quả tăng cường sắc tố đỏ trên cá đĩa.</p> | <p>- Dịch chiết astaxanthin từ nấm men <i>Rhodospodium toruloides</i> có hoạt tính kháng oxi hóa qua năng lực khử gốc tự do ABTS^+ mạnh gấp 2,62 lần và DPPH là 1,93 lần (dịch chiết astaxanthin có giá trị IC_{50} là 14,83 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tương đương vitamin C và BHA lần lượt là 14,33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ và 14,43 $\mu\text{g}/\text{ml}$), năng lực khử của dịch chiết astaxanthin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cao gấp 1,28 lần so với đối chứng vitamin C gấp 1,16 lần so với BHA.</p> <p>- Astaxanthin có khả năng kháng khuẩn tại nồng độ astaxanthin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lần lượt: Chủng <i>Bacillus subtilis</i>, <i>E.coli</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> và <i>Staphylococcus aureus</i> khoảng 16 đến 18 mm (tùy theo phương pháp tách chiết).</p> <p>- Dịch chiết astaxanthin có khả năng ức chế lên đường cong tăng trưởng của</p> |

| | | |
|--|--|---|
| | | <p>vi khuẩn: <i>Bacillus subtilis</i>, <i>E. coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> ngay từ nồng độ đầu tiên 12,5 µg. Như vậy nồng độ ức chế tối thiểu của astaxanthin lên năm chủng vi khuẩn mà chúng tôi nghiên cứu (MIC) đạt được là 12,5 µg/ml.</p> <p>- Kết quả nghiên cứu tăng màu sắc trên cá dĩa với liều lượng 90 mg/kg thức ăn, cho kết quả tăng cường sắc tố đỏ trên cá dĩa.</p> |
|--|--|---|

CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Tảo *Haematococcus pluvialis*

- Môi trường RM tảo đạt mật độ tế bào cực đại, hàm lượng astaxanthin, trọng lượng khô là cao nhất với các giá trị tương ứng $5,13 \times 10^5$ TB/ml, 487 $\mu\text{g/l}$, 2,32 g/l. Tảo phát triển kém nhất là môi trường F2.

- Tảo *H. pluvialis* sinh trưởng và phát triển mạnh nhất ở ánh sáng trắng (mật độ tế bào cực đại là $5,53 \times 10^5$ TB/ml, hàm lượng astaxanthin 469,33 $\mu\text{g/l}$ và trọng lượng khô 2,35 g/l và thấp nhất là ánh sáng đỏ (mật độ tế bào cực đại là $2,6 \times 10^5$ TB/ml, hàm lượng astaxanthin 66,67 $\mu\text{g/l}$ và trọng lượng khô 0,62 g/l).

- Khi stress tảo ở cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ trong thời gian 4 ngày (pha 2) thì hàm lượng astaxanthin tương ứng 4.618,67 $\mu\text{g/l}$ và trọng lượng khô thu được là cao nhất là 4,44 g/l (nhiệt độ là 35⁰C); còn khi gây stress thêm bằng thời gian chiếu sáng lên 24 giờ thì hàm lượng astaxanthin là 3.076,8 $\mu\text{g/l}$ và trọng lượng khô thu được là cao nhất là 3,72 g/l (nhiệt độ cao 33⁰C).

- Đã xây dựng được quy trình nuôi sinh khối tảo *H. Pluvialis* ở quy mô 20 lít theo quy trình nuôi tảo 2 pha: pha I sử dụng môi trường lỏng RM, mật độ tảo ban đầu 10^5 TB/ml, ánh sáng đèn led trắng với cường độ sáng 90 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ, sục khí liên tục, cung cấp khí CO₂ với hàm lượng 18ppm cho tảo quang hợp; pha 2 cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ. Hàm lượng astaxanthin sau ly trích đạt từ 5.144 - 7.535,8 $\mu\text{g/L}$ chiếm từ 2,34 - 2,61%/SKK.

- Dịch chiết astaxanthin thu được từ tảo *H. Pluvialis* có hoạt tính kháng oxy hóa đồng thời có khả năng kháng oxy hóa cao hơn chứng dương là BHA, kết quả có khả năng khử mạnh hơn BHA 1,17 lần và khả năng bắt gốc ABTS⁺ mạnh gấp 1,53 lần so với mẫu BHA. Ngoài ra, dịch chiết astaxanthin từ tảo *H. Pluvialis* với liều lượng 75 mg/kg thức ăn làm tăng cường sắc tố đỏ trên cá dĩa.

Nấm men *Rhodospodium toruloides*

- Thành phần khoáng bổ sung vào môi trường rỉ đường như MgSO₄.7H₂O 3 g/l, urea 0,5 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, tỷ lệ giống so với môi trường nuôi cấy là 10% (mật độ tế bào từ 8 đến 10 x 10⁶ tế bào/ml), hàm lượng đường tổng trong rỉ đường là 25 g/l. Thời điểm thu nhận astaxanthin từ *Rhodospodium toruloides* là 82 giờ.

- Nuôi cấy chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides* trên môi trường rỉ đường trong hệ thống 10 lít trọng lượng sinh khối khô thu được là 6,3682 (g/l), hàm lượng astaxanthin tính trên thể tích dịch nuôi cấy tương ứng là 1.243,13 ($\mu\text{g/l}$).

- Đã tối ưu hóa được thành phần môi trường để thu nhận astaxanthin từ chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides*, thành phần môi trường tối ưu hóa rỉ đường thu nhận astaxanthin gồm hàm lượng đường tổng là 26,04 g/l, hàm lượng urea 1,04 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, pH 5,96 và tỷ lệ giống 10% (v/v), thời gian nuôi cấy là 80 giờ, thu được hàm lượng astaxanthin cao nhất là 186,48 $\mu\text{g/g}$. So sánh kết quả thí nghiệm với kết quả dự đoán khi nuôi trong môi trường tối ưu, hàm lượng carotenoid ở môi trường tối ưu trong thực nghiệm là 186,48 $\mu\text{g/g}$, cao hơn so với hàm lượng carotenoid dự đoán 3,318 $\mu\text{g/g}$.

- Tách chiết astaxanthin bằng dung môi DMSO, HCl 0,4N và enzyme cellulase để thu nhận astaxanthin từ nấm men *Rhodospiridium toruloides* kết quả DMSO là cao nhất (287,159 $\mu\text{g/g}$), tiếp đến là bằng HCl 0,4N (133,428 $\mu\text{g/g}$) và thấp nhất là thu nhận bằng enzyme 82,319 \pm 4,4823 $\mu\text{g/g}$.

- Từ dịch chiết astaxanthin bằng DMSO, đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn (hàm lượng astaxanthin xác định bằng HPLC/MS là 5,09 $\mu\text{g/mg}$). Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa qua năng lực khử bắt gốc tự do ABTS+ và DPPH. Khả năng bắt gốc tự do DPPH, trong đó IC50 vitamin C và BHA cao hơn so với dịch chiết astaxanthin lần lượt là 2,62 lần 1,93 lần. Bắt gốc tự do ABTS+ của dịch chiết astaxanthin có giá trị IC50 là 14,83 $\mu\text{g/ml}$ tương đương vitamin C và BHA lần lượt là 14,33 $\mu\text{g/ml}$ và 14,43 $\mu\text{g/ml}$, khả năng khử của dịch chiết astaxanthin 25 $\mu\text{g/ml}$ cao gấp 1,28 lần so với đối chứng vitamin C gấp 1,16 lần so với BHA. Như vậy astaxanthin là chất có hoạt tính kháng oxy hóa cao và cao hơn so với chất chuẩn là vitamin C và BHA.

- Astaxanthin có khả năng kháng khuẩn cao với đường kính (mm) kháng khuẩn tại nồng độ astaxanthin 100 $\mu\text{g/ml}$ lần lượt: Chủng *Bacillus subtilis*, *E.coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus* khoảng 16 đến 18 mm (tùy theo phương pháp tách chiết). Kháng sinh chloramphenicol làm đối chứng dương có đường kính (mm) kháng khuẩn cao nhất từ 20 mm đến 35 mm tùy theo chủng.

- Dịch chiết astaxanthin thu nhận từ nấm men hồng *Rhodospiridium sp.*, có khả năng ức chế lên đường cong tăng trưởng của vi khuẩn: *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ngay từ nồng độ

đầu tiên 12,5 µg. Như vậy nồng độ ức chế tối thiểu của astaxanthin lên nấm chủng vi khuẩn mà chúng tôi nghiên cứu (MIC) đạt được là 12,5 µg/ml.

- Astaxanthin chiết xuất từ sinh khối nấm men ở liều 90 mg/kg thức ăn sau khi cho cá ăn trong ba tháng có tác dụng cải thiện màu sắc trên cá đĩa đỏ *Symphysodon* sp..

4.2. Kiến nghị

- Nghiên cứu thêm hoạt tính kháng ung thư trên các dòng tế bào của astaxanthin.
- Nghiên cứu tạo nano-astaxanthin để tăng tính tan trong nước của astaxanthin ứng dụng trong dược phẩm và trong nuôi trồng thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Thị Huệ An, *Nghiên cứu chiết xuất astaxanthin từ phế liệu vỏ tôm*, Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản, 2004 - 98(1), 51-54.
2. Yuan J. P. and Chen F., 2001. *Indirect photometric ion chromatographic analysis of anions in Haematococcus pluvialis culture media*. *Biotechnol. Lett.*, 23: 757-760.
3. Uma Nath Ushakumari, Ravi Ramanujan, 2013, Isolation of astaxanthin from marine yeast and study of its pharmacological activity, *International Current Pharmaceutical Journal*, 2(3), 67-69.
4. Riley L.W. and et al., 1983. *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype*. *N Engl J Med*; 308: 681 – 5.
5. Bubrick P., 1991. *Bioresource technology*, 38: 327 – 329.
6. Lorenz R.T. and Cysewski G. R., 2000. *Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin*. *TibTech.*, 18: 160-167.
7. Droop M.R., 1995. *Carotenogenesis in Haematococcus pluvialis*. *Nature*, 175 – 42.
8. Lee Y.K. and Soh C.W., 1991. *Phycol*, 27: 575 – 577.
9. Renstrom B. and et al., 1981. *Optical purity of astaxanthin from Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry* 20 (11): 2561 – 2564.
10. Hagen C. and et al., 1993. *J Photochem photobiol biol*, 20: 153 – 160.
11. Sperry., 1970. *Psychological review*, volume 77, issue 6, November 1970: 585 - 590.
12. Đặng Diễm Hồng, Đinh Đức Hoàng, Nguyễn Thị Thủy, Hoàng Thị Lan Anh, 2010. *Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi trồng vi tảo lục Haematococcus pluvialis giàu astaxanthin*. *Tạp chí sinh học* 32 (2) 43 – 53.
13. 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, 2012. *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) 493 – 499.
14. Đinh Đức Hoàng, Lưu Thị Tâm, Nguyễn Thị Thu Thủy, Đặng Thị Diễm Hồng, 2011, *Nghiên cứu sự thay đổi hình thái tế bào, hàm lượng sắc tố và protein nội bào trong vòng đời vi tảo lục Haematococcus pluvialis nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm*, *Tạp chí Sinh Học*, 33(1), 59 – 66.

15. Lovatelli Alessandro and Chen Jiaxin., 2009. *Use of environmental friendly feed additives and probiotics in Chinese aquaculture*. Yellow Sea Fisheries Research Institute, China.
16. Makio Kobayashi., 1997. *Morphological Changes in the Life Cycle of the Green Alga Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84:94-97.
17. Lorenz R.T. and Cysewski G.R., 2000. *Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin*. TIBTECH APRIL 2000 (Vol. 18) Elsevier Science Ltd.
18. Ciapara I.H., Elix-Valenzuela L.F. and Goycoolea F.M., 2006. *Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Mexico, 46:185-196.
19. Batghare A. H., Singh N. and Moholkar V. S., 2018, *Investigations in ultrasound-induced enhancement of astaxanthin production by wild strain Phaffia rhodozyma MTCC 7536*, Bioresource technology, 254, pp 166-173.
20. Isabell Schmidt, Hendrik Schewe, Soren Gassel, Chao Jin, John Bucking Ham, Markus Humbelin, Gerhard Sandman, Jens Schrader, 2011, *Biotechnological production of astaxanthin with Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*, Appl Microbiol Biotechnol, 89, 555-571.
21. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L. and Goycoolea F.M., 2006, *Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46, 185–196.
22. Banzatto D., Freita L.A., Mutto M.J.R., 2013, *Carotenoid production by Rhodotorula rubra cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup*, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 33, 14-18.
23. Yimyoo T., Yongmanitchai W. and Limtong S., 2011, *Carotenoid Production by Rhodosporidium paludigenum DMKU3-LPK4 using Glycerol as the Carbon Source*, Kasetsart Journal (Natural Science), 45: 90 -100.
24. Latha B.V., Jeevaratnam K., Murali H.S và Manja K.S., 2005, *Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of Rhodotorula glutinis DFR-PDY from natural source*, Indian Journal of Biotechnology, Vol. 4, pp. 353-357.
25. Nguyễn Xuân Trạch, 2004, *Sử dụng rỉ mật làm thức ăn cho gia súc*, Nhà xuất bản

Nông nghiệp Hà Nội.

26. Tổng Kim Thuần, Trần Thanh Thủy, Phạm Công Hoạt, 2006, *Phân loại đến chủng nấm men NT5 có khả năng tổng hợp carotenoid astaxanthin*. Tạp chí Công nghệ sinh học, 4 (4), 48 – 488.
27. Boekhout T., Fonseca A., Sampaio P., Golubev W.I., 1993, *Classification of heterobasidiomycetous yeasts: characteristics and affiliation of genera to higher taxa of Heterobasidiomycetes*, Canadian Journal Microbiology, 39, 276-290.
28. Buzzini P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., Brook M., Mulinacci N (2007). Carotenoid profiles of yeasts belong to the genera Rhodotula, Rhodosporidium, Sporobolomyces, Sporidiobolus, Canadian Journal Microbiology. 53, 1024 – 1031.
29. Aksu Z., Eren A.T., 2005, *Carotenoid production by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: Use of agricultural wastes as a carbon source*, Process Biochemistry, 40, 2985-2991.
30. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L. and Goycoolea F.M., 2006, *Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46, 185–196.
31. Choi Seok-Keun, Jeong-Hwan Kim, Young-Sam Park, Young-Jin Kim, và Hyo-IhI Chang, 2007, *An efficient method for the extraction of astaxanthin from the red yeast Xanthophyllomyces dendrohouse*, J. Microbiol Biotechnol, 17(5), 847-852.
32. Andrewes A.G., Starr M.P., 1976. *(3R, 3'R)-Astaxanthin from the yeast Phaffia rhodozyma*, Phytochemistry. 15(6):1009–1011.
33. Banzatto D., Freita L.A., Mutto M.J.R., 2013, *Carotenoid production by Rhodotorula rubra cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup*, Ciência e Technologia de Alimentos, Campinas, 33, 14-18.
34. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K. and Watanabe H., 2006, *Astaxanthin, a carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition*, Journal of Natural Products, 69: 443-449.
35. Casal C., Cuaresma M., Vega M.J. and Vilchez C., 2011, *Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea*, Marine Drugs, 9, 29-42.
36. Bhosale P. và Paul S. Bernstein (2005), *Microbial xanthophylls*, Appl Microbiol Biotechnol, 68, 445-455.

37. David-Palma M., Libkind D., Sampaio J.P., 2014, *Global distribution, diversity hot spots and niche transitions of an astaxanthin-producing eukaryotic microbe*, Molecular Ecology. 23, 921 –932.
38. Kobayashi M., 1997, *Morphological changes in the life cycle of the green alga Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84:94-97.
39. Nguyễn Đức Lượng và Võ Thị Dạ Quỳnh, 2013. *Phá vỡ tế bào Spirulina platensis bằng máy nghiền bi để thu nhận các chất có hoạt tính sinh học*. Tạp chí Khoa học Công nghệ. 6(67).
40. Inamdar S., 1994, *Effect of pretreatment of molasses and posttreatment of fermented broth in industrial production of ethanol*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 45: 181-187
41. Davis S.B., Peacock S.D and Walford S.N., 1970. *Ion exclusion chromatography: Molasses pretreatment and high test molasses production*, Proceedings of the South African sugar Technologists Association, 71, 146-15.
42. Eonson J., Lee C.G., Polle J.E.W., 2006, *Secondary carotenoid accumulation in Haematococcus (Chlorophyceae) biosynthesis regulation, and biotechnology*, Journal of Microbiology and Biotechnology.
43. Foppen, F. H., 1971, *Tables for the identification of carotenoid pigments*, Chromogr. Rev, 14, 113.
44. Rodríguez- M., Luis J. and Barredo J. L., 2010, *Xanthophyllomyces dendrorhous for the industrial production of astaxanthin*, Applied Microbiology and Biotechnology, 88: 645–658.
45. Droop, M.R., 1994, *Condition governing Haematococcus formation and loss of algae Haematococcus pluvialis Flotow*, Archives of Microbiol, 20:391 – 397.
46. Frengova G.I. and Beshkova D.M., 2009, *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36(2), 163-180.
47. Yang Yue, Bohkyung Kim, và Ji-Young Lee, 2013, *Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits*, Department of Nutritional Sciences, University of Connecticut, Storrs, Connecticut 06269, USA.
48. Ginka I. frengova và Dora M. Beskova, 2009, *Carotenoid from Rhodotorula và Phaffia: Yeast of biotechnological importance*, J Ind Microbiol Biotechnol, 36, 163-

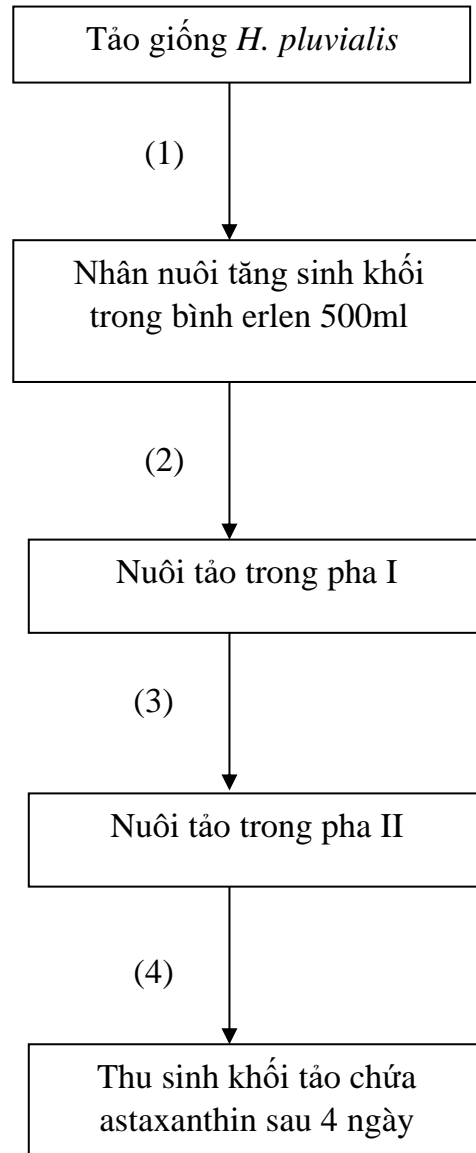
- 180.
49. Hui Ni., Qi-he Chen., Guo-qing HE., Guang-bin WU., Yuan-fan YANG., 2008, *Optimization of acidic extraction of astaxanthin from Phaffia rhodozyma*, Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 9(1), 51-59.
 50. Jean Soon Park, Jong Hee Chyun, Yoo Kyung Kim, Larry L Line, Boon P Chew, 2010, *Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans*, Nutrition and Metabolism, 7, 18.
 51. Kelley C.E., Harmon A.W., 1972. *Method of determining carotenoid contents of alaska pink shrimp and representative valves for several shrimp product*, Fishery Bulletin. 70, 111 -113.
 52. Ramírez J., Obledo N., Arellano M., Herrera E., 2006, *Astaxanthin production by Phaffia rhodozyma in a fedbatch culture using a low cost medium feeding*, E-Gnosis, 4, 1-9.
 53. Isabell Schmidt, Hendrik Schewe, Soren Gassel, Chao Jin, John Bucking Ham, Markus Humbelin, Gerhard Sandman, Jens Schrader, 2011, *Biotechnological production of astaxanthin with Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*, Appl Microbiol Biotechnol, 89, 555-571
 54. Jian L., Daling Z., Jianfeng N., Songdong S., Guangce W., 2011, *An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of Haematococcus pluvialis*, Biotechnology Advances, 29, 568-574.
 55. Jirasripongpun., Pewlong W., Natsathmonthra W. và Suthiyaporn S., 2007, *Carotenoids production by Xanthophyllomyces dendrorhous Mutant Grown on Molasses*, Kasetsart Journal (Natural Science), 41, 667-674.
 56. Mata-Gómez L.C., Montañez J.C., Zavala A.M., Aguilar C.N., 2014, *Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview*, Microbial Cell Factories, 13:1 – 12.
 57. McNulty HP, Byun J, Lockwood RF, Mason RP., 2008, *Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions*, Am J Cardiol, 101, 20D-29D.
 58. Kvasnikov E.I., Nagornaia S.S., Shchelokova I.F., 1975. *Distribution of Rhodosporidium diobovatum yeasts in soil and on plants*, Microbiology, 44(4), 753-756.

59. Nanjundaswamy Ananda, Praveen V. Vadlani, 2011, *Carotenoid value addition of cereal products by monoculture and mixed-culture fermentation of Phaffia rhodozyma and Sporobolomyces roseus*, Cereal chemistry, 88(5), 467-472.
60. Judit Kucsera, Ilona Pfeiffer, Kanji Takeo, 2000, *Biology of the red yeast Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma)*, MycoScience, 41: 195-199.
61. Latha B.V., Jeevaratnam K., Murali H.S và Manja K.S., 2005, *Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of Rhodotorula glutinis DFR-PDY from natural source*, Indian Journal of Biotechnology, Vol. 4, pp. 353-357.
62. Ranga Rao Ambati, Siew Moi Phang, Sarada Ravi và Ravishankar Gokare Aswathanarayana, 2014, *Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological activities and its commercial application- A review*, Mar. Drugs, 12, 128-152.
63. Oyaizu, M., 1986, *Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine*, Japanese Journal of Nutrition, 46(6), pp. 307-315.
64. Pietro Buzzini, Marzia Innocenti, Benedetta Turchetti, Diego Libkind, Maria van Broock, và Nadia Mulinacci, 2007, *Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera Rhodotorula, Rhodosporidium, Sporobolomyces, and Sporidiobolus*, Can. J. Microbiol, 53, 1024-1031.
65. Negro J.J., Garrido-Fernández J., 2000, *Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (Ciconia ciconia) feeding on introduced crayfish (Procambarus clarkii)*, Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 126, 347–352.
66. Schmidt I., Schewe H., Gassel S., Jin C., Buckingham J., Hümbelin M., Sandmann G., Schrader J., 2011, *Biotechnological production of astaxanthin with Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*, Applied Microbiology and Biotechnology, 89: 555–571.
67. Robert G., Fassett and Coombes J.S., 2012, *Astaxanthin in cardiovascular Health and Diseases*, Molecules, 17:2030-2048.
68. Regnier, P., Bastias, J., Rodriguez-Ruiz, V., Caballero-Casero, N., Caballo, C., Sicilia, D., Fuentes, A., Maire, M., Crepin, M., Letouneur, D., Gueguen, V., Rubio, S and Pavon-Djavid, G., 2015, *Astaxanthin from Haematococcus pluvialis Prevents Oxydative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity*, Marine Drugs, 13(5),

- pp. 2857-2874.
69. Renata Aline dos Santos da Fonseca, Ruan da Silva Rafael, Susana Juliana Kalil, Carlos Andre Veiga Burket, và Janaina Fernandes de Medeiros Burket, 2011, *Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by Phaffia rhodozyma*, African Journal of Biotechnology, Vol. 10(7), pp. 1165-1171.
 70. Seon-Jin Lee, Se-Kyung Bai, Kwang-Soon Lee, Seung Namkoong, Hee-Jun Na, Kwon-Soo Ha, Jeong-A Han, Sung-Vin Yim, Kwang chang, Young-Guen Kwon, Sung Ki Lee, Young-Myeong Ki., 2003, *Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing I κ B Kinase dependent NF- κ B Activation*, Molecules and Cells, 16(1): 97-105
 71. Zhiwei Z., Sufang Z., Hongwei L., Hongwei S., Xinping L., Fan Y., Yongjin J. Z., Guojie J., Mingliang Y., Hanfa Z., Zongbao K. Z., 2013, *A multi-omic map of the lipid-producing yeast Rhodosporidium toruloides*, Nature communications, 4: 1930
 72. Khanh Trang Le Vu, Hong Trieu Vo Thi and Dai Nghiep Ngo., 2015, *Investigation of astaxanthin production from yeast Rhodosporidium sp.*, Britist Microbiology reasearch journal, 9(5),1-7.
 73. Uma Nath Ushakumari, Ravi Ramanujan, 2013, *Isolation of astaxanthin from marine yeast and study of its pharmacological activity*, International Curent Pharmaceutical Journal, 2(3), 67-69.
 74. Casal C., Cuaresma M., Vega M.J. and Vilchez C., 2011, *Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea*, Marine Drugs, 9, 29-42.
 75. Eaton, L., Clezy, K; Snellgrove, D.; Sloman, K., 2016, *The behavioural effects of supplementing diets with synthetic and naturally sourced astaxanthin in an ornamental fish (Puntius titteya)*, Applied Animal Behaviour Science 182, pp. 94–100.
 76. Wen Z., Zhang S., Odoh C. K., Jin M. and Zhao Z. K., 2020, *Rhodosporidium toruloides-A potential red yeast chassis for lipids and beyond*, FEMS yeast research, 20, (5), pp 38.
 77. Stahl W. and Sies H., 2003, *Antioxidant activity of carotenoids*, Molecular aspects of medicine, 24, (6), pp 345-351.
 78. Saenge C., Cheirsilp B., Suksaroge T. T. and Bourtoom T., 2011, *Potential use of*

- oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids*, Process Biochemistry, 46, (1), pp 210-218.
79. Parreira T. M., Freitas C., Reis A., Roseiro J. and da Silva T. L., 2015, *Carbon concentration and oxygen availability affect lipid and carotenoid production by carob pulp syrup-grown Rhodosporidium toruloides NCYC 921*, Engineering in Life Sciences, 15, (8), pp 815-823.
80. Park Y.-K., Nicaud J.-M. and Ledesma-Amaro R., 2018, *The engineering potential of Rhodosporidium toruloides as a workhorse for biotechnological applications*, Trends in biotechnology, 36, (3), pp 304-317.
81. Frengova G. I. and Beshkova D. M., 2009, *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance*, Journal of industrial microbiology & biotechnology, 36, (2), pp 163.
82. Dias C., Reis A., Santos J. and da Silva T. L., 2020, *Concomitant wastewater treatment with lipid and carotenoid production by the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides grown on brewery effluent enriched with sugarcane molasses and urea*, Process Biochemistry, pp.
83. Kobayshi M., 1997. *Morphological changes in the life cycle of the green alga Haematococcus pluvialis*. Journalo Fermentatioann Bioengineering. 84:94-97.
84. Hata N., Ogbonna J.C., Hasegawa Y., Taroda H. and Tanaka H., 2001, *Production of astaxanthin by Haematococcus pluvialis in a sequential heterotrophic photoautotrophic culture*, J. Appl. Phycol., 13: 395-402.
85. Junfeng Wang & Danxiang Han & Milton R. Sommerfeld & Congming Lu & Qiang Hu., 2013. *Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of Haematococcus pluvialis in an outdoor photobioreactor*. Journal of Applide Phycogyl 25:253–260.
86. Olaizola M., 2000. *Commercial production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis using 25,000-liter outdoor photobioreactors*, J. Appl. Phycol., 12: 499-506.
87. Ranjbar R., Inoue R., Shiraishi H., Katsuda T. and Katoh S., 2008. *High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of Haematococcus pluvialis in a bubble column photobioreactor*, Biochemical Engineering Journal, 39: 575-580.
88. Kelley C.E., Harmon A.W., 1972. *Method of determining carotenoid contents of*

alaska pink shrimp and representative valves for several shrimp products, Fishery Bulletin. 70, 111 -113.

PHỤ LỤC**Phụ lục 1. Quy trình nuôi tảo *H. pluvialis* 2 pha****(1) Cấy chuyển mẫu tảo giống từ ống nghiệm vào các bình erlen 500 ml**

Sinh khối tảo giữ giống trong ống nghiệm được cấy chuyển sang cấp độ bình erlen 500 ml và nuôi trên môi trường lỏng RM, cường độ chiếu sáng $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ, sục khí liên tục, cung cấp khí CO_2 cho tảo quang hợp, MĐTB ban đầu 10^5 TB/ml. Tảo được tiếp tục nuôi trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ duy trì 25°C .

(2) Cấy chuyển tảo từ các bình erlen 500 ml sang các bình nhựa 10 lít nuôi tảo trong pha I

Sau 5 - 7 ngày nuôi cấy ở cấp độ bình erlen 500 ml, sinh khối tảo được cấy chuyển bằng cách pha loãng mẫu theo tỉ lệ 50: 50 trên môi trường lỏng RM, cường độ chiếu

sáng 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ, sục khí liên tục, cung cấp khí CO_2 cho tảo quang hợp và chuyển từ các bình erlen 500 ml sang các bình erlen 1000 ml sao cho MĐTB ban đầu đạt khoảng 10^5 TB/ml. Tảo được tiếp tục nuôi trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ duy trì 25°C .

(3) Cấy chuyển tảo từ pha I sang pha II

Sau khoảng 14 ngày nuôi cấy ở pha I tảo đạt mật độ tế bào cực đại thì chuyển tảo vào nuôi trong pha II với điều kiện môi trường RM, ánh sáng trắng, cường độ chiếu sáng 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ hoặc thời gian chiếu sáng 24 giờ, cung cấp khí CO_2 , sục khí liên tục.

(4) Thu sinh khối tảo khi TB tảo đã chín hoàn toàn

Sử dụng kính hiển vi để theo dõi sự thay đổi kích thước, hình thái và màu sắc trong tế bào tảo *H. pluvialis* khi tế bào phát triển thành bào nang trưởng thành thì dùng màng lọc có kích thước khoảng 150 μm để tiến hành lọc thu sinh khối tảo tươi (sau 4 ngày nuôi trong pha II).

Phụ lục 2. Mật độ trung bình của tảo *H. pluvialis* trong 4 môi trường thí nghiệm (x10⁴)

| Ngày | RM | C | B | F2 | Ngày | RM | C | B | F2 |
|-------------|-----------|----------|----------|-----------|-------------|-----------|----------|----------|-----------|
| 0 | 6 | 6,33 | 6 | 6 | 10 | 45 | 34,67 | 35 | 0 |
| 2 | 13,67 | 8,33 | 10,33 | 10 | 12 | 49 | 36 | 38 | 0 |
| 4 | 26,33 | 17 | 19 | 7,33 | 14 | 51,33 | 39,33 | 43 | 0 |
| 6 | 31,33 | 21 | 24,33 | 6 | 16 | 46 | 33,67 | 36 | 0 |
| 8 | 38,33 | 28 | 32,33 | 6 | 18 | 37,67 | 26 | 27,33 | 0 |

Phụ lục 3. Hàm lượng sắc tố trung bình trong 4 môi trường thí nghiệm của tảo *H. pluvialis*

| Ngày | Tên mẫu | Chlo a (µg/l) | Astaxanthin (µg/l) | Ngày | Tên mẫu | Chlo a (µg/l) | Astaxanthin (µg/l) |
|----------|-----------|---------------|--------------------|-----------|-----------|---------------|--------------------|
| 0 | RM | 105,8 | 41,2 | 10 | RM | 582,26 | 303 |
| | C | 110,15 | 40,8 | | C | 457,5 | 252 |
| | B | 111,07 | 44,93 | | B | 501,91 | 292 |
| | F2 | 110,73 | 44 | | F2 | 0 | 0 |
| 2 | RM | 177,88 | 65 | 12 | RM | 782,25 | 345 |
| | C | 144,18 | 48 | | C | 609,62 | 289 |
| | B | 160,02 | 60 | | B | 667,13 | 321 |
| | F2 | 22,38 | 35,73 | | F2 | 0 | 0 |
| 4 | RM | 187,01 | 127,67 | 14 | RM | 794,03 | 404 |
| | C | 153,53 | 102 | | C | 713,05 | 307 |
| | B | 176,64 | 114 | | B | 740,53 | 333 |
| | F2 | 10,55 | 27,73 | | F2 | 0 | 0 |
| 6 | RM | 313,46 | 153 | 16 | RM | 727,86 | 454 |
| | C | 275,61 | 133 | | C | 702,03 | 320 |
| | B | 295,61 | 140 | | B | 695,94 | 400 |
| | F2 | 8,12 | 19,2 | | F2 | 0 | 0 |
| 8 | RM | 473,77 | 261 | 18 | RM | 650,4 | 487 |
| | C | 275,61 | 180 | | C | 654,97 | 375 |
| | B | 295,61 | 228 | | B | 555,68 | 453 |
| | F2 | 8,12 | 5,87 | | F2 | 0 | 0 |

Phụ lục 4. Trọng lượng khô của tảo *H. pluvialis* trong 4 môi trường thí nghiệm

| Ngày | Tên mẫu | TLK (mg/ml) | Ngày | Tên mẫu | TLK (mg/ml) | Ngày | Tên mẫu | TLK (mg/ml) |
|------|---------|-------------|------|---------|-------------|------|---------|-------------|
| 0 | M1 | 0,63 | 2 | M1 | 1,14 | 4 | M1 | 1,22 |
| | M2 | 0,55 | | M2 | 0,74 | | M2 | 0,64 |
| | M3 | 0,53 | | M3 | 0,18 | | M3 | 0,66 |
| | C1 | 0,63 | | C1 | 0,56 | | C1 | 0,69 |
| | C2 | 0,54 | | C2 | 0,65 | | C2 | 0,63 |
| | C3 | 0,41 | | C3 | 0,55 | | C3 | 0,88 |
| | B1 | 0,68 | | B1 | 0,59 | | B1 | 0,71 |
| | B2 | 0,39 | | B2 | 0,68 | | B2 | 0,72 |
| | B3 | 0,55 | | B3 | 0,68 | | B3 | 0,88 |
| | F1 | 0,55 | | F1 | 0,08 | | F1 | 0,07 |
| | F2 | 0,57 | | F2 | 0,08 | | F2 | 0,07 |
| | F3 | 0,56 | | F3 | 0,08 | | F3 | 0,06 |
| | 6 | M1 | | 1,87 | 8 | | M1 | 1,64 |
| M2 | | 0,78 | M2 | 1,54 | | M2 | 1,79 | |
| M3 | | 0,91 | M3 | 1,41 | | M3 | 1,54 | |
| C1 | | 0,65 | C1 | 0,99 | | C1 | 1,45 | |
| C2 | | 0,25 | C2 | 0,90 | | C2 | 1,24 | |
| C3 | | 1,37 | C3 | 1,83 | | C3 | 1,45 | |
| B1 | | 1,61 | B1 | 1,95 | | B1 | 1,49 | |
| B2 | | 0,82 | B2 | 0,53 | | B2 | 1,76 | |
| B3 | | 0,61 | B3 | 1,20 | | B3 | 1,50 | |
| F1 | | 0,04 | F1 | 0,03 | | F1 | | |
| F2 | | 0,04 | F2 | 0,02 | | F2 | | |
| F3 | | 0,21 | F3 | 0,03 | | F3 | | |

| | | | | | | | | |
|----|----|------|----|----|------|----|----|------|
| 12 | M1 | 1,87 | 14 | M1 | 2,00 | 16 | M1 | 2,30 |
| | M2 | 1,86 | | M2 | 2,14 | | M2 | 2,19 |
| | M3 | 1,85 | | M3 | 2,15 | | M3 | 2,14 |
| | C1 | 1,57 | | C1 | 2,06 | | C1 | 1,93 |
| | C2 | 1,34 | | C2 | 2,54 | | C2 | 1,79 |
| | C3 | 2,00 | | C3 | 0,64 | | C3 | 1,78 |
| | B1 | 2,06 | | B1 | 1,85 | | B1 | 2,13 |
| | B2 | 2,57 | | B2 | 1,93 | | B2 | 1,99 |
| | B3 | 0,64 | | B3 | 2,15 | | B3 | 2,15 |
| | F1 | | | F1 | | | F1 | |
| | F2 | | | | | | | |
| | F3 | | | | | | | |
| 18 | M1 | 2,30 | | | | | | |
| | M2 | 2,19 | | | | | | |
| | M3 | 2,46 | | | | | | |
| | C1 | 1,85 | | | | | | |
| | C2 | 1,99 | | | | | | |
| | C3 | 1,89 | | | | | | |
| | B1 | 2,25 | | | | | | |
| | B2 | 2,14 | | | | | | |
| | B3 | 2,15 | | | | | | |
| | F1 | | | | | | | |
| | F2 | | | | | | | |
| | F3 | | | | | | | |

Phụ lục 5. Hàm lượng sắc tố của tảo *H. pluvialis* dưới 4 loại ánh sáng khác nhau

| Ngày | Tên mẫu | Chlo a (µg/l) | Astaxanthin (µg/l) | Ngày | Tên mẫu | Chlo a (µg/l) | Astaxanthin (µg/l) |
|------|---------|---------------|--------------------|------|---------|---------------|--------------------|
| 0 | TR1 | 71,88 | 42,40 | 2 | TR1 | 126,29 | 56,00 |
| | TR2 | 98,12 | 38,40 | | TR2 | 117,23 | 62,00 |
| | TR3 | 102,01 | 40,00 | | TR3 | 128,17 | 68,00 |
| | D1 | 104,03 | 36,00 | | D1 | 115,85 | 39,00 |
| | D2 | 82,93 | 43,20 | | D2 | 81,67 | 40,00 |
| | D3 | 87,34 | 40,00 | | D3 | 112,19 | 45,00 |
| | X1 | 87,36 | 41,60 | | X1 | 104,94 | 42,00 |
| | X2 | 95,05 | 38,40 | | X2 | 98,92 | 41,00 |
| | X3 | 99,57 | 37,60 | | X3 | 121,36 | 39,00 |
| | T1 | 84,58 | 38,40 | | T1 | 82,46 | 36,00 |
| | T2 | 88,72 | 40,00 | | T2 | 85,69 | 36,00 |
| | T3 | 97,07 | 41,60 | | T3 | 118,46 | 56,00 |
| | 4 | TR1 | 255,98 | | 93,33 | 6 | TR1 |
| TR2 | | 272,79 | 90,67 | TR2 | 401,29 | | 126,67 |
| TR3 | | 254,84 | 96,00 | TR3 | 381,86 | | 176,00 |
| D1 | | 202,50 | 90,67 | D1 | 139,53 | | 148,00 |
| D2 | | 143,00 | 80,00 | D2 | 157,83 | | 162,67 |
| D3 | | 134,01 | 93,33 | D3 | 129,94 | | 152,00 |
| X1 | | 249,04 | 90,67 | X1 | 273,88 | | 105,33 |
| X2 | | 246,14 | 70,67 | X2 | 290,12 | | 152,00 |
| X3 | | 246,76 | 93,33 | X3 | 308,63 | | 113,33 |
| T1 | | 202,50 | 132,00 | T1 | 213,94 | | 140,00 |
| T2 | | 173,94 | 136,00 | T2 | 202,50 | | 138,67 |
| T3 | | 218,89 | 141,33 | T3 | 199,10 | | 138,67 |

| | | | | | | | |
|----|-----|--------|--------|----|-----|--------|--------|
| 8 | TR1 | 329,99 | 250,00 | 10 | TR1 | 795,58 | 280,00 |
| | TR2 | 708,11 | 220,00 | | TR2 | 402,82 | 268,00 |
| | TR3 | 395,45 | 212,00 | | TR3 | 382,80 | 300,00 |
| | D1 | 189,44 | 188,00 | | D1 | 194,02 | 140,00 |
| | D2 | 166,68 | 210,00 | | D2 | 304,64 | 136,00 |
| | D3 | 209,74 | 202,00 | | D3 | 428,03 | 92,00 |
| | X1 | 340,87 | 178,00 | | X1 | 399,92 | 200,00 |
| | X2 | 286,35 | 184,00 | | X2 | 554,46 | 232,00 |
| | X3 | 411,99 | 180,00 | | X3 | 487,76 | 276,00 |
| | T1 | 235,84 | 234,00 | | T1 | 431,07 | 268,00 |
| | T2 | 225,24 | 132,00 | | T2 | 414,56 | 260,00 |
| | T3 | 246,85 | 354,00 | | T3 | 382,80 | 272,00 |
| 12 | TR1 | 640,99 | 320,00 | 14 | TR1 | 701,75 | 360,00 |
| | TR2 | 529,67 | 348,00 | | TR2 | 729,44 | 344,00 |
| | TR3 | 863,17 | 300,00 | | TR3 | 900,82 | 400,00 |
| | D1 | 194,02 | 120,00 | | D1 | 194,02 | 100,00 |
| | D2 | 304,64 | 116,00 | | D2 | 153,84 | 112,00 |
| | D3 | 314,65 | 112,00 | | D3 | 175,45 | 84,00 |
| | X1 | 621,58 | 316,00 | | X1 | 781,55 | 300,00 |
| | X2 | 513,58 | 276,00 | | X2 | 758,02 | 312,00 |
| | X3 | 637,62 | 280,00 | | X3 | 702,55 | 360,00 |
| | T1 | 291,87 | 268,00 | | T1 | 291,87 | 216,00 |
| | T2 | 414,56 | 224,00 | | T2 | 140,64 | 212,00 |
| | T3 | 382,80 | 200,00 | | T3 | 301,41 | 208,00 |
| 16 | TR1 | 791,93 | 360,00 | 18 | TR1 | 710,73 | 484,00 |
| | TR2 | 639,40 | 480,00 | | TR2 | 639,40 | 524,00 |
| | TR3 | 749,93 | 360,00 | | TR3 | 712,46 | 400,00 |

| | | | | | | | |
|--|----|--------|--------|--|----|--------|--------|
| | D1 | 101,22 | 120,00 | | D1 | 101,22 | 60,00 |
| | D2 | 153,84 | 84,00 | | D2 | 153,84 | 64,00 |
| | D3 | 175,45 | 76,00 | | D3 | 74,98 | 76,00 |
| | X1 | 637,81 | 280,00 | | X1 | 598,57 | 400,00 |
| | X2 | 653,20 | 360,00 | | X2 | 618,82 | 436,00 |
| | X3 | 702,55 | 400,00 | | X3 | 644,55 | 400,00 |
| | T1 | 291,87 | 192,00 | | T1 | 175,87 | 232,00 |
| | T2 | 140,64 | 224,00 | | T2 | 140,64 | 192,00 |
| | T3 | 197,01 | 200,00 | | T3 | 197,01 | 156,00 |

Phụ lục 6. Hàm lượng sắc tố của tảo *H. pluvialis* trung bình dưới 4 loại ánh sáng khác nhau

| Ngày | Tên mẫu | Chlo a ($\mu\text{g/l}$) | Astaxanthin ($\mu\text{g/l}$) | Ngày | Tên mẫu | Chlo a ($\mu\text{g/l}$) | Astaxanthin ($\mu\text{g/l}$) |
|----------|-----------|----------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|----------------------------|---------------------------------|
| 0 | TR | 90,67 | 40,27 | 10 | TR | 527,07 | 282,67 |
| | D | 91,43 | 39,73 | | D | 308,89 | 122,67 |
| | X | 94,00 | 39,2 | | X | 480,71 | 236 |
| | T | 90,00 | 40 | | T | 409,48 | 266,67 |
| 2 | TR | 123,89 | 62 | 12 | TR | 677,94 | 322,67 |
| | D | 103,23 | 41,33 | | D | 271,10 | 116 |
| | X | 108,40 | 40,67 | | X | 590,93 | 290,67 |
| | T | 95,53 | 42,67 | | T | 363,08 | 230,67 |
| 4 | TR | 261,20 | 93,33 | 14 | TR | 777,34 | 368 |
| | D | 159,84 | 88 | | D | 174,44 | 98,67 |
| | X | 247,31 | 84,89 | | X | 690,93 | 324 |
| | T | 198,44 | 136,44 | | T | 244,64 | 212 |
| 6 | TR | 382,41 | 157,78 | 16 | TR | 727,09 | 400 |
| | D | 142,43 | 154,22 | | D | 143,50 | 93,33 |
| | X | 290,88 | 123,56 | | X | 664,52 | 346,67 |
| | T | 205,18 | 139,11 | | T | 209,84 | 205,33 |
| 8 | TR | 477,85 | 227,33 | 18 | TR | 687,53 | 469,33 |
| | D | 188,62 | 200 | | D | 110,01 | 66,67 |
| | X | 346,40 | 180,67 | | X | 620,65 | 412 |
| | T | 235,96 | 240 | | T | 171,17 | 193,33 |

Phụ lục 7. Mật độ trung bình của tảo dưới 4 loại ánh sáng khác nhau ($\times 10^4$)

| Ngày | TR | D | X | T | Ngày | TR | D | X | T |
|-------------|-----------|----------|----------|----------|-------------|-----------|----------|----------|----------|
| 0 | 8,00 | 8,70 | 8,30 | 8,00 | 10 | 42,33 | 21,00 | 37,00 | 33,00 |
| 2 | 13,33 | 11,00 | 11,67 | 11,00 | 12 | 52,00 | 17,00 | 41,67 | 29,00 |
| 4 | 20,00 | 13,67 | 16,33 | 14,67 | 14 | 55,33 | 14,33 | 46,00 | 20,67 |
| 6 | 32,33 | 21,33 | 23,00 | 22,33 | 16 | 46,67 | 11,33 | 42,67 | 17,67 |
| 8 | 37,00 | 26,00 | 29,67 | 29,67 | 18 | 38,67 | 9,33 | 33,67 | 12,67 |

Phụ lục 8. Trọng lượng khô trung bình của tảo *H. pluvialis* dưới 4 loại ánh sáng khác nhau

| Ngày | Tên mẫu | TLK (g/l) | Ngày | Tên mẫu | TLK (g/l) |
|-------------|----------------|------------------|-------------|----------------|------------------|
| 0 | TR | 0,304 | 10 | TR | 1,700 |
| | D | 0,344 | | D | 1,200 |
| | X | 0,339 | | X | 1,620 |
| | T | 0,401 | | T | 1,560 |
| 2 | TR | 0,667 | 12 | TR | 1,950 |
| | D | 0,610 | | D | 1,090 |
| | X | 0,619 | | X | 1,750 |
| | T | 0,544 | | T | 1,480 |
| 4 | TR | 0,738 | 14 | TR | 2,200 |
| | D | 0,705 | | D | 0,870 |
| | X | 0,700 | | X | 1,860 |
| | T | 0,704 | | T | 1,230 |
| 6 | TR | 1,187 | 16 | TR | 2,280 |
| | D | 0,820 | | D | 0,750 |
| | X | 0,910 | | X | 1,890 |
| | T | 0,870 | | T | 0,900 |
| 8 | TR | 1,540 | 18 | TR | 2,350 |
| | D | 1,430 | | D | 0,620 |
| | X | 1,470 | | X | 1,910 |
| | T | 1,450 | | T | 0,820 |

Phụ lục 9. Hàm lượng astaxanthin và trọng lượng khô trung bình của tảo *H. pluvialis* dưới các cường độ chiếu sáng khác nhau

| Ngày | Tên mẫu | Astaxanthin ($\mu\text{g/l}$) | TLK (g/l) |
|------|----------------------------------|---------------------------------|-----------|
| 0 | A | 22,4 | 0,42 |
| 2 | A | 33,6 | 0,56 |
| 4 | A | 63,2 | 0,96 |
| 6 | A | 105,6 | 1,13 |
| 8 | A | 158,4 | 1,28 |
| 10 | A | 174,4 | 1,57 |
| 12 | A | 278,4 | 1,71 |
| 14 | A | 324,8 | 1,86 |
| 1 | ĐC | 558,93 | 2 |
| | 120 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ | 724,27 | 2,53 |
| | 180 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ | 752,53 | 2,37 |
| 2 | ĐC | 628,27 | 2,26 |
| | 120 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ | 942,4 | 2,93 |
| | 180 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ | 360 | 0,52 |
| 3 | ĐC | 968,53 | 2,38 |
| | 120 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ | 1891,2 | 3,68 |
| | 180 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ | 96 | 0 |
| 4 | ĐC | 1073,6 | 2,55 |

| | | | |
|--|---|---------|------|
| | 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ | 4618,67 | 4,44 |
| | 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ | 0 | 0 |

Phụ lục 10. Hàm lượng sắc tố và trọng lượng khô trung bình của tảo *H. pluvialis* dưới các thời gian chiếu sáng khác nhau

| Ngày | Tên mẫu | Chlo a ($\mu\text{g/l}$) | Astaxanthin ($\mu\text{g/l}$) | TLK (g/l) |
|------|---------|----------------------------|---------------------------------|-----------|
| 0 | B | 75,60 | 33,60 | 0,22 |
| 2 | B | 101,03 | 43,20 | 0,45 |
| 4 | B | 193,64 | 68,00 | 1,07 |
| 6 | B | 362,54 | 129,60 | 1,09 |
| 8 | B | 440,01 | 142,40 | 1,26 |
| 10 | B | 436,81 | 166,40 | 1,5 |
| 12 | B | 532,74 | 256,00 | 1,7 |
| 14 | B | 399,00 | 384,00 | 1,84 |
| 1 | ĐC | 431,54 | 453,33 | 1,92 |
| | 16 giờ | 421,79 | 464 | 2,02 |
| | 24 giờ | 460,94 | 568,53 | 2,59 |
| 2 | ĐC | 426,43 | 579,73 | 2,15 |
| | 16 giờ | 423,48 | 767,47 | 2,18 |
| | 24 giờ | 494,67 | 1409,6 | 2,68 |
| 3 | ĐC | 696,55 | 819,73 | 2,23 |
| | 16 giờ | 429,03 | 956,27 | 2,26 |
| | 24 giờ | 514,09 | 2086,4 | 2,84 |

| | | | | |
|---|--------|--------|--------|------|
| 4 | ĐC | 514,20 | 1156,8 | 2,24 |
| | 16 giờ | 419,94 | 1454,4 | 2,29 |
| | 24 giờ | 481,77 | 3076,8 | 3,72 |

Phụ lục 11: Kết quả khảo sát các yếu tố thích hợp cho nuôi cấy *Rhodospiridium* sp. trên môi trường rỉ đường.

Kết quả khảo sát hàm lượng đường tổng đến hàm lượng astaxanthin:

Bảng: Kết quả ảnh hưởng hàm lượng đường tổng đến hàm lượng astaxanthin

| Hàm lượng Đường tổng (g/l) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | ($\mu\text{g/g}$ sinh khối khô) | ($\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy) |
| 10 | $3,7310 \pm 0,2115^a$ | $145,873 \pm 1,842^a$ | $543,797 \pm 27,04^a$ |
| 15 | $4,7487 \pm 0,1172^b$ | $159,238 \pm 1,083^b$ | $756,240 \pm 20,69^b$ |
| 20 | $6,1967 \pm 0,2802^b$ | $175,397 \pm 3,138^c$ | $1085,92 \pm 42,11^b$ |
| 25 | $7,4697 \pm 0,2388^c$ | $188,285 \pm 0,5586^d$ | $1406,62 \pm 47,97^d$ |
| 30 | $6,9630 \pm 0,1412^d$ | $176,254 \pm 2,942^c$ | $1227,06 \pm 28,08^c$ |
| 35 | $5,2080 \pm 0,0463^d$ | $153,223 \pm 3,532^{ab}$ | $798,18 \pm 23,22^b$ |

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng đạm (ure công nghiệp):

Bảng: Kết quả ảnh hưởng của hàm lượng ure công nghiệp

| Hàm lượng Urea (g/l) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | ($\mu\text{g/g}$ sinh khối khô) | ($\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy) |
| 0,0 | $4,819 \pm 0,0462^c$ | $152,29 \pm 1,205^b$ | $733,92 \pm 12,59^c$ |
| 0,2 | $5,054 \pm 0,0385^d$ | $181,30 \pm 1,321^c$ | $916,30 \pm 10,70^d$ |
| 0,5 | $5,749 \pm 0,1055^e$ | $188,98 \pm 1,686^c$ | $1086,33 \pm 20,05^e$ |
| 1,0 | $4,5333 \pm 0,0363^b$ | $145,24 \pm 4,219^b$ | $671,72 \pm 7,845^b$ |
| 1,5 | $4,322 \pm 0,0694^a$ | $124,38 \pm 4,644^a$ | $544,96 \pm 13,19^a$ |

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ công nghiệp:

Bảng: Kết quả ảnh hưởng của hàm lượng $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

| Hàm lượng $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|---|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | ($\mu\text{g/g}$ sinh khối khô) | ($\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy) |
| 0 | $4,169 \pm 0,1228^a$ | $144,71 \pm 5,353^b$ | $591,46 \pm 29,05^{ab}$ |
| 1 | $4,435 \pm 0,0511^{ab}$ | $146,44 \pm 4,046^b$ | $649,08 \pm 10,86^b$ |
| 2 | $4,417 \pm 0,0345^{ab}$ | $162,89 \pm 3,546^c$ | $719,77 \pm 21,32^c$ |
| 3 | $4,566 \pm 0,0639^{ab}$ | $186,03 \pm 1,695^d$ | $849,27 \pm 4,721^d$ |
| 4 | $4,736 \pm 0,2665^b$ | $154,89 \pm 3,783^{bc}$ | $731,57 \pm 22,78^c$ |
| 5 | $4,516 \pm 0,0866^{ab}$ | $121,49 \pm 2,973^a$ | $548,60 \pm 15,77^a$ |

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4

Bảng: Kết quả ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4

| Hàm lượng KH ₂ PO ₄ (g/l) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|--|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | | (µg/g sinh khối khô) | (µg/l dịch nuôi cấy) |
| 0 | 5,546 ± 0,0746 ^{ab} | 187,08 ± 2,66 ^d | 1037,94 ± 28,52 ^d |
| 1 | 6,623 ± 0,1427 ^c | 159,75 ± 3,33 ^c | 1057,53 ± 39,89 ^d |
| 2 | 6,2437 ± 0,2974 ^c | 143,49 ± 0,88 ^b | 895,39 ± 37,38 ^c |
| 3 | 6,0547 ± 0,0356 ^{bc} | 130,00 ± 2,21 ^a | 786,98 ± 10,21 ^b |
| 4 | 5,2727 ± 0,1656 ^a | 127,02 ± 2,12 ^a | 670,24 ± 30,51 ^a |
| 5 | 5,6123 ± 0,2545 ^{ab} | 123,43 ± 0,46 ^a | 692,93 ± 33,80 ^a |

Kết quả khảo sát ảnh hưởng ảnh hưởng tỷ lệ giống đến hàm lượng astaxanthin

Bảng: Kết quả ảnh hưởng của hàm lượng tỷ lệ giống đến hàm lượng astaxanthin

| Tỷ lệ giống (%) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Hàm lượng astaxanthin | |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | | (µg/g sinh khối khô) | (µg/l dịch nuôi cấy) |
| 6 | 5,320 ± 0,2549 ^a | 155,02 ± 3,85 ^a | 826,35 ± 57,77 ^a |
| 8 | 5,507 ± 0,102 ^a | 164,09 ± 3,55 ^b | 904,32 ± 34,48 ^{ab} |
| 10 | 6,308 ± 0,055 ^b | 189,78 ± 0,87 ^d | 1197,17 ± 14,18 ^d |
| 12 | 6,226 ± 0,025 ^b | 175,30 ± 2,41 ^c | 1092,79 ± 12,04 ^{cd} |
| 14 | 5,850 ± 0,308 ^{ab} | 175,04 ± 2,72 ^c | 1025,52 ± 68,97 ^{bc} |

Phụ lục 12: Kết quả xây dựng đường cong tăng trưởng của chủng *Rhodospiridium* sp. trên môi trường rỉ đường đã khảo sát.

Xây dựng đường cong tương quan tuyến tính giữa giá trị OD_{610nm} và mật độ tế bào $\log(N/ml)$

Buồng đếm hồng cầu được sử dụng là buồng đếm Malassez của hãng Superior (Germany) với các thông số sau: Diện tích 1 ô nhỏ trong buồng đếm: $S = 0,0025mm^2$, chiều cao 1 ô nhỏ $h = 0,200mm$, một khung đếm có 25 ô lớn, mỗi ô lớn có 20 ô nhỏ

Thể tích 1 ô lớn

$$V = S \cdot h = 0,0025 \cdot 0,200 = 5 \cdot 10^{-4} (mm^3) = 5 \cdot 10^{-7} (ml)$$

V: Thể tích 1 ô nhỏ

S: Diện tích 1 ô nhỏ

h: Chiều cao 1 ô nhỏ

$$\text{Số tế bào/1ml mẫu} = A/20 \cdot 5 \cdot 10^{-7}$$

A: Số tế bào trung bình trong 1 ô lớn

Khung đếm trong buồng đếm hồng cầu có 25 ô lớn, mỗi ô lớn có 20 ô nhỏ

Bảng: Kết quả dựng đường tương quan tuyến tính giữa OD_{610nm} và mật độ tế bào $\log(N/ml)$

| OD | 0,101 | | | 0,203 | | | 0,294 | | | 0,401 | | | 0,501 | | |
|--|---------|----|----|---------|----|----|---------|----|----|----------|-----|-----|----------|-----|-----|
| Số tế bào đếm được trong 5 ô lớn của 1 khung đếm (lặp lại 3 lần) | 3 9 | 33 | 36 | 63 | 66 | 67 | 93 | 95 | 90 | 150 | 146 | 153 | 218 | 217 | 225 |
| | 4 3 | 44 | 40 | 64 | 68 | 65 | 95 | 92 | 92 | 151 | 154 | 154 | 220 | 223 | 216 |
| | 3 6 | 37 | 43 | 61 | 60 | 57 | 92 | 91 | 93 | 149 | 150 | 148 | 223 | 218 | 222 |
| Số tế bào trung bình trong 1 ô lớn (A) | 39.000 | | | 63.444 | | | 92.556 | | | 150.556 | | | 220.222 | | |
| Số tế bào / 1ml mẫu $A/(20 \cdot 5 \cdot 10^{-7})$ | 3900000 | | | 6344444 | | | 9255556 | | | 15055556 | | | 22022222 | | |
| Log(N/ml) | 6,6 | | | 6,8 | | | 7,0 | | | 7,2 | | | 7,3 | | |

Xây dựng đường cong tăng trưởng tăng sinh bậc 1 (200ml) của giống *Rhodospiridium* sp. trên môi trường rỉ đường.

Bảng: Dạng đường cong tăng trưởng của chủng *Rhodospiridium* sp. trên môi trường rỉ đường khi tăng sinh bậc 1 dung tích 200ml

| Giờ | OD | HSPL | Log(N/ml) | Giờ | OD | HSPL | Log(N/ml) |
|-----|-------|------|-----------|-----|-------|------|-----------|
| 0 | 0,025 | 1 | 6,458 | 46 | 0,497 | 20 | 8,648 |
| 2 | 0,021 | 1 | 6,451 | 48 | 0,285 | 50 | 8,647 |
| 4 | 0,021 | 1 | 6,451 | 50 | 0,29 | 50 | 8,656 |
| 6 | 0,019 | 1 | 6,447 | 52 | 0,283 | 50 | 8,643 |
| 8 | 0,19 | 1 | 6,769 | 54 | 0,297 | 50 | 8,669 |
| 10 | 0,238 | 1 | 6,859 | 56 | 0,296 | 50 | 8,668 |
| 12 | 0,308 | 1 | 6,991 | 58 | 0,318 | 50 | 8,709 |
| 14 | 0,428 | 1 | 7,217 | 60 | 0,29 | 50 | 8,656 |
| 16 | 0,136 | 10 | 7,667 | 62 | 0,296 | 50 | 8,668 |
| 18 | 0,371 | 10 | 8,110 | 64 | 0,305 | 50 | 8,684 |
| 20 | 0,416 | 10 | 8,195 | 66 | 0,303 | 50 | 8,681 |
| 22 | 0,33 | 20 | 8,334 | 68 | 0,308 | 50 | 8,690 |
| 24 | 0,332 | 20 | 8,337 | 70 | 0,29 | 50 | 8,656 |
| 26 | 0,342 | 20 | 8,356 | 72 | 0,286 | 50 | 8,649 |
| 28 | 0,358 | 20 | 8,386 | 74 | 0,292 | 50 | 8,660 |
| 30 | 0,363 | 20 | 8,396 | 76 | 0,283 | 50 | 8,643 |
| 32 | 0,387 | 20 | 8,441 | 78 | 0,264 | 50 | 8,607 |
| 34 | 0,409 | 20 | 8,482 | 80 | 0,232 | 50 | 8,547 |
| 36 | 0,424 | 20 | 8,511 | 82 | 0,13 | 50 | 8,355 |
| 38 | 0,47 | 20 | 8,597 | 84 | 0,116 | 50 | 8,329 |
| 40 | 0,444 | 20 | 8,548 | 86 | 0,104 | 50 | 8,306 |
| 42 | 0,474 | 20 | 8,605 | 88 | 0,284 | 20 | 8,247 |
| 44 | 0,492 | 20 | 8,639 | 90 | 0,245 | 20 | 8,174 |

Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin tương ứng với quá trình tăng trưởng chủng *Rhodospiridium* sp.

Bảng: Kết quả khảo sát sự thay đổi hàm lượng astaxanthin

| Thời gian (giờ) | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Độ hấp thu A _{468nm} | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng astaxanthin | |
|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | | µg/g sinh khối khô | µg/l dịch nuôi cấy |
| 10 giờ (cuối pha tiềm tàng) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 giờ (đầu pha ổn định) | 6,517 ± 0,0485 | 0,2223 ± 0,0064 | 10 | 21,1747 ± 1,528 | 137,993 ± 11,7133 |
| 80 giờ | 6,446 ± 0,0069 | 1,9757 ± 0,0058 | 10 | 188,157 ± 1,395 | 1212,87 ± 8,8515 |

| | | | | | |
|-----------------------|--|--|--|--|--|
| (cuối pha ổn định) | | | | | |
|-----------------------|--|--|--|--|--|

Quy mô Pilot 10L**Bảng:** Kết quả khảo sát sự thay đổi hàm lượng astaxanthin

| Lần | Trọng lượng sinh khối khô (g/l) | Độ hấp thu A_{468nm} | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng astaxanthin | |
|------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | $\mu\text{g/g}$ sinh khối khô | $\mu\text{g/l}$ dịch nuôi cấy |
| 1 | 6,377 | 1,929 | 10 | 183,71 | 1171,54 |
| 2 | 6,415 | 2,115 | 10 | 201,43 | 1292,17 |
| 3 | 6,350 | 2,089 | 10 | 198,95 | 1263,33 |
| 4 | 6,224 | 1,995 | 10 | 190 | 1182,56 |
| 5 | 6,475 | 2,118 | 10 | 201,71 | 1306,07 |
| Trung bình | 6.3682±0,093 | | 10 | 195,16±7,972 | 1243,13±62,3864 |

Phụ lục 13: Kết quả khảo sát quy trình tách chiết astaxanthin từ nấm men *Rhodospiridium sp.*

4.1 Tách chiết DMSO/acetate

4.1.1 Khảo sát thể tích DMSO

| Thể tích dung môi (ml) | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g sinh khối khô) |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------|--|
| 3 | 0,873 ± 0,043 ^a | 10 | 207,78 ± 10,313 ^a |
| 5 | 0,958 ± 0,022 ^a | 10 | 228,10 ± 5,124 ^a |
| 7 | 0,854 ± 0,122 ^{ab} | 10 | 203,41 ± 29,008 ^{ab} |
| 9 | 0,820 ± 0,028 ^{ab} | 10 | 195,32 ± 6,734 ^{ab} |
| 11 | 0,760 ± 0,037 ^b | 10 | 180,87 ± 8,848 ^b |

Kết quả khảo sát thời gian ủ DMSO

| Thời gian ủ (phút) | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g sinh khối khô) |
|--------------------|--------------------------------|---------------------------|--|
| 30 | 0,9133 ± 0,0091 | 10 | 217,508 ± 2,07738 |
| 40 | 0,9677 ± 0,0211 | 10 | 230,397 ± 5,03012 |
| 50 | 0,9960 ± 0,0108 | 10 | 237,143 ± 2,57533 |
| 60 | 1,0533 ± 0,0556 | 10 | 250,793 ± 13,2338 |
| 70 | 0,8290 ± 0,0265 | 10 | 197,381 ± 6,31286 |

Kết quả khảo sát nhiệt độ ủ DMSO

| Nhiệt độ ủ (°C) | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g sinh khối khô) |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------|--|
| 40 | 1,0233 ± 0,0690 | 10 | 243,651 ± 16,4377 |
| 50 | 1,5757 ± 0,6177 | 10 | 295,794 ± 9,6697 |
| 60 | 1,1187 ± 0,0914 | 10 | 266,350 ± 21,7600 |
| 70 | 1,1003 ± 0,0814 | 10 | 261,191 ± 20,6566 |
| 80 | 0,9747 ± 0,1026 | 10 | 232,064 ± 24,4215 |

Khảo sát dung môi hòa tan

| Dung môi | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g sinh khối khô) |
|----------|--------------------------------|---------------------------|--|
| Methanol | 0,9343 ± 0,0513 | 10 | 222,461 ± 12,2112 |

| | | | |
|---------|-----------------|----|------------------|
| Acetone | 1,1540 ± 0,0328 | 10 | 274,762 ± 7,8063 |
| Cồn 96° | 1,0517 ± 0,0232 | 10 | 250,397 ± 5,519 |

Tách chiết bằng HCl

| Nồng độ HCl (N) | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g) |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 3 | 0,3353 ± 0,0380 ^a | 10 | 79,8413 ± 9,0522 ^a |
| 3,5 | 0,3843 ± 0,0081 ^b | 10 | 91,508 ± 1,9389 ^b |
| 4 | 0,4090 ± 0,0081 ^{bc} | 10 | 97,381 ± 1,9490 ^{bc} |
| 4,5 | 0,4370 ± 0,0331 ^c | 10 | 104,048 ± 7,8715 ^c |
| 5 | 0,3987 ± 0,0021 ^{bc} | 10 | 94,9207 ± 0,4954 ^{bc} |

| Thể tích HCl (ml) | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g) |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 3 | 0,2103 ± 0,0080 ^{cd} | 10 | 50,0793 ± 1,9099 ^{cd} |
| 5 | 0,2317 ± 0,0212 ^d | 10 | 55,1587 ± 5,0469 ^d |
| 7 | 0,2023 ± 0,0051 ^{bc} | 10 | 48,1747 ± 1,2219 ^{bc} |
| 9 | 0,1767 ± 0,0195 ^a | 10 | 42,0633 ± 4,6552 ^a |
| 11 | 0,1790 ± 0,0044 ^{ab} | 10 | 42,6193 ± 1,0380 ^{ab} |

| Nhiệt độ ủ HCl (°C) | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g) |
|---------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 50 | 0,092 ± 0,0311 ^a | 10 | 21,9047 ± 7,4040 ^a |
| 60 | 0,1207 ± 0,0032 ^a | 10 | 28,7303 ± 0,7656 ^a |
| 70 | 0,1963 ± 0,0085 ^b | 10 | 46,7463 ± 2,0252 ^b |
| 80 | 0,204 ± 0,0131 ^b | 10 | 48,5713 ± 3,1229 ^b |
| 90 | 0,184 ± 0,0185 ^b | 10 | 43,8093 ± 4,4093 ^b |

| Thời gian ủ HCl (phút) | Độ hấp thu A ₄₆₈ nm | Thể tích dịch sắc tố (ml) | Hàm lượng Astaxanthin (µg/g) |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 10 | 0,1287 ± 0,0169 ^a | 10 | 30,635 ± 4,0147 ^a |
| 15 | 0,3197 ± 0,0150 ^b | 10 | 76,1113 ± 3,5817 ^b |
| 20 | 0,366 ± 0,0132 ^c | 10 | 87,1427 ± 3,1500 ^c |
| 25 | 0,3197 ± 0,0315 ^b | 10 | 76,1113 ± 7,4926 ^b |

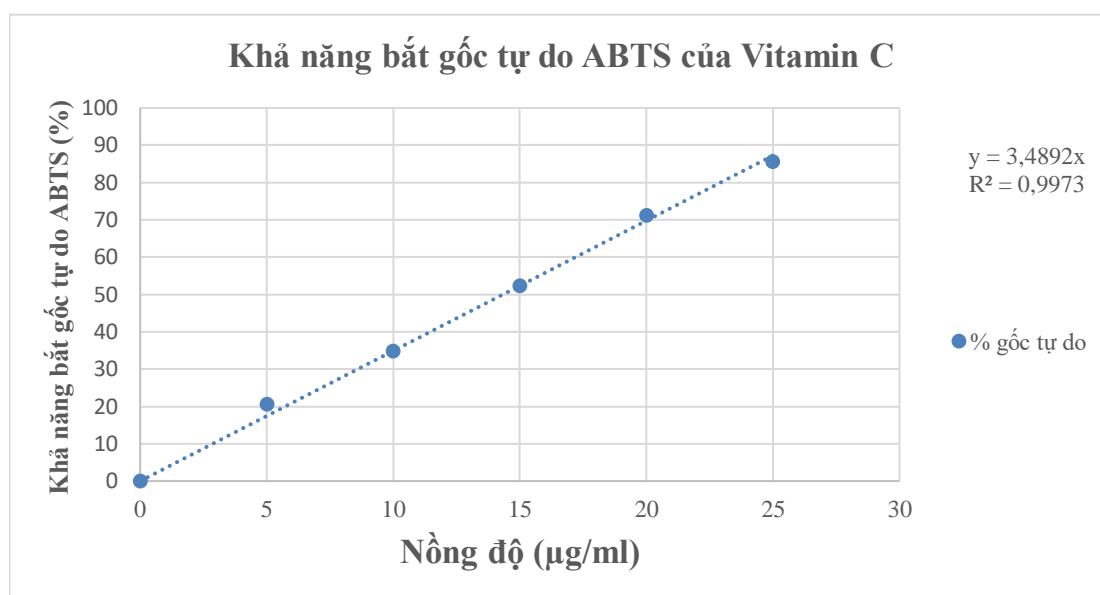
| | | | |
|----|-----------------------|----|-------------------------|
| 30 | $0,3087 \pm 0,0064^b$ | 10 | $68,6985 \pm 20,6335^b$ |
|----|-----------------------|----|-------------------------|

| Dung môi | Độ hấp thu A_{468} nm | Thể tích dịch sắc tổ (ml) | Hàm lượng Astaxanthin ($\mu\text{g/g}$) |
|---------------------|----------------------------|------------------------------|--|
| Acetone | $0,4917 \pm 0,0186^b$ | 10 | $117,0640 \pm 4,4245^b$ |
| Methanol | $0,4577 \pm 0,0448^b$ | 10 | $108,9680 \pm 10,6756^b$ |
| Cồn 96 ⁰ | $0,2200 \pm 0,0397^a$ | 10 | $52,3807 \pm 9,4614^a$ |

Phụ lục 14. Khả năng bắt gốc tự do ABTS của astaxanthin

ABTS_vitamin C

Khả năng bắt gốc tự do ABTS của Vitamin C

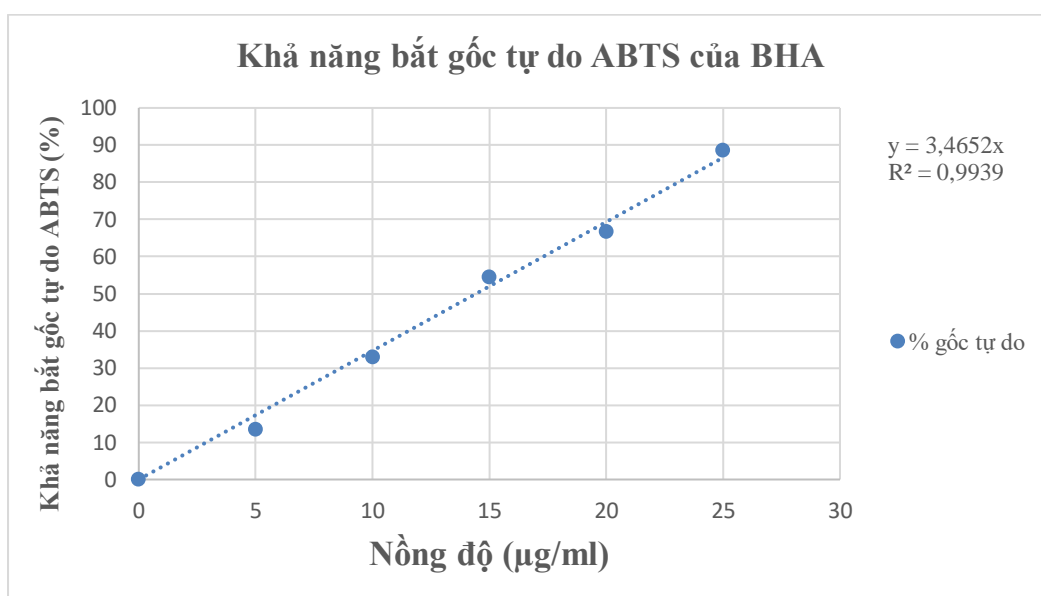


Bảng : Khả năng bắt gốc tự do ABTS của Vitamin C

| Nồng độ (µg/ml) | OD (nm) | % bắt gốc tự do ABTS (%) | IC ₅₀ : $y = 3,4892x$ |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0,5976 ± 0,005 ^f | 0 | 14,3299 |
| 5 | 0,4746 ± 0,0059 ^e | 20,569 | |
| 10 | 0,3896 ± 0,0081 ^d | 34,783 | |
| 15 | 0,2850 ± 0,01 ^c | 52,341 | |
| 20 | 0,1727 ± 0,0118 ^b | 71,070 | |
| 25 | 0,0863 ± 0,0085 ^a | 85,619 | |

Bảng: Khả năng bắt gốc tự do ABTS của BHA

| Nồng độ (µg/ml) | OD (734nm) | % bắt gốc tự do ABTS (%) | IC ₅₀ : $y = 3,4652x$ |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0,5993 ± 0,0021 ^f | 0 | 14,4292 |
| 5 | 0,5180 ± 0,0079 ^e | 13,523 | |
| 10 | 0,4023 ± 0,0041 ^d | 32,888 | |
| 15 | 0,2736 ± 0,0035 ^c | 54,424 | |
| 20 | 0,1990 ± 0,0072 ^b | 66,778 | |



| | | | |
|----|-----------------------|--------|--|
| 25 | $0,0680 \pm 0,0026^a$ | 88,648 | |
|----|-----------------------|--------|--|

ABTS_BTT

Bảng: Khả năng bắt gốc tự do ABTS của BTT

| Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$) | OD (734nm) | % bắt gốc tự do ABTS (%) | $\text{IC}_{50} : y = 2,8769x$ |
|------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 0 | $0,6090 \pm 0,0026^f$ | 0 | 17,3798 |
| 5 | $0,4977 \pm 0,0127^e$ | 18,276 | |
| 10 | $0,4140 \pm 0,002^d$ | 32,020 | |
| 15 | $0,3450 \pm 0,0075^c$ | 43,350 | |
| 20 | $0,2703 \pm 0,0050^b$ | 55,616 | |
| 25 | $0,1750 \pm 0,01^a$ | 71,264 | |

Hệ thống lên men *Rhodosporidium sp.* Quy mô 10 lít tại PTN