

	BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ	
VŨ NGỌC PHƯƠNG DUNG	 VŨ NGỌC PHƯƠNG DUNG ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA PLASMA LẠNH CHO QUÁ TRÌNH TĂNG TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY ASTAXANTHIN CỦA VI TẢO LỤC <i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i>	
HÓA HỮU CƠ	LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA HỮU CƠ	
2025	<i>Thành phố Hồ Chí Minh – 2025</i>	

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Ngọc Phương Dung

**ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA PLASMA LẠNH CHO QUÁ TRÌNH TĂNG
TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY ASTAXANTHIN CỦA VI TẢO LỤC
*HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HÓA HỌC

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8440144

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :
PGS.TS. PHẠM HỮU THIÊN 

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.



Vũ Ngọc Phương Dung

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ quý báu từ Quý Thầy Cô tại Học viện Khoa học và Công nghệ – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, cùng sự đồng hành của các cơ quan, gia đình và bạn bè. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành đến:

Xin chân thành cảm ơn thầy PGS. TS. Phạm Hữu Thiện đã tận tâm chỉ dẫn, giảng dạy cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn, cũng như các thầy cô trong hội đồng chấm luận văn đã cho tôi những đóng góp quý báu để hoàn chỉnh luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban lãnh đạo và các cán bộ đang công tác tại Viện Công nghệ tiên tiến – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ, tạo mọi điều kiện cơ sở vật chất để thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, Quý Thầy, Cô Học viện Khoa học và Công nghệ – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam luôn tận tụy truyền đạt kiến thức và dành sự quan tâm hỗ trợ tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp trong phòng Công nghệ plasma và Vật lý tính toán đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc đến cha mẹ, gia đình và những người bạn thân yêu, những người luôn sát cánh, ủng hộ và động viên tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành chương trình học tập.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	iii
DANH MỤC VIẾT TẮT.....	4
DANH MỤC BẢNG	5
DANH MỤC HÌNH	6
MỞ ĐẦU	7
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	10
1.1. Sơ lược về tảo <i>Haematococcus pluvialis</i>	10
1.2. Đặc điểm sinh trưởng – hình thái.....	10
1.3. Thành phần các chất hữu cơ trong tảo (protein, lipid, carbohydrate)	11
1.4. Các yếu tố ảnh hưởng quá trình tăng trưởng của vi tảo <i>H. pluvialis</i>	14
1.4.1. Nguồn nitrogen	14
1.4.2. Nguồn carbohydrate.....	15
1.4.3. Cường độ chiếu sáng.....	15
1.4.4. Hình thức dinh dưỡng trong nuôi cấy	15
1.4.5. Hệ thống nuôi cấy	16
1.5. Các phương pháp thúc đẩy tăng trưởng phase xanh ở vi tảo <i>H. pluvialis</i>	17
1.6. Tổng quan về công nghệ plasma.....	18
1.6.1. Khái niệm và phân loại	18
1.6.2. Sự hình thành nước hoạt hóa plasma và một số đặc tính lý hóa.....	19
1.6.2.1. Tính chất vật lý.....	20
1.6.2.2. Các oxy phản ứng (ROS).....	20
1.6.2.3. Các gốc nitrogen.....	21
1.7. Cơ chế kích thích tăng trưởng thực vật bằng plasma.....	21
1.7.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	22
1.7.2. Tình hình nghiên cứu ứng dụng plasma trong nuôi cấy vi tảo	23
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	24
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	24
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu	24

2.2. Hóa chất và thiết bị	24
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.3.1. Xây dựng, lắp đặt hệ thống plasma và xác định đặc tính lý hóa của nước hoạt hóa plasma.....	25
2.3.1.1. Xây dựng, lắp đặt hệ thống plasma	25
2.3.1.2. Sự thay đổi đặc tính lý hóa của môi trường sau xử lý plasma.	26
2.3.2. Đánh tác động của plasma lạnh đến tốc độ tăng trưởng của tảo <i>H.pluvialis</i>	27
2.3.2.1. Nuôi thích nghi <i>Haematococcus pluvialis</i>	27
2.3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của plasma lạnh đến quá trình sinh trưởng của tảo <i>Haematococcus pluvialis</i>	28
a) Phương pháp đánh giá mật độ tế bào	28
b) Phương pháp đánh giá hàm lượng sắc tố	29
c) Phương pháp quan sát hình thái tế bào <i>H. pluvialis</i>	29
2.3.2.3. Đánh giá tác động của plasma lạnh đến sự tích lũy một số hợp chất hữu cơ trong <i>H. pluvialis</i>	29
a) Phương pháp xác định trọng lượng khô (Dry cell weight)	29
b) Phương pháp xác định hàm lượng carbohydrate	30
c) Phương pháp xác định hàm lượng protein	30
d) Phương pháp xác định hàm lượng lipid.....	31
2.4. Phương pháp xử lý số liệu.....	32
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	33
3.1. Tính chất hóa lý của môi trường được hoạt hóa plasma	33
3.2. Ảnh hưởng của plasma đến quá trình sinh trưởng của tảo <i>Haematococcus pluvialis</i>	35
3.3. Ảnh hưởng của plasma đến sự tích lũy các hợp chất hữu cơ.....	44
3.3.1. Protein	44
3.3.2. Lipid.....	45
3.3.3. Carbohydrate.....	47
3.4. Hiệu quả tích lũy astaxanthin sau quá trình nuôi cấy kết hợp plasma.	49

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	53
KẾT LUẬN	53
KIẾN NGHỊ	55
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	56
PHỤ LỤC	66

DANH MỤC VIẾT TẮT

<i>Haematococcus pluvialis</i>	<i>H. pluvialis</i>
Deoxyribonucleic acid	DNA
Ribonucleic acid	RNA
Carbon dioxide	CO ₂
Adenosine triphosphate	ATP
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	NADPH
Photobioreactor	PBR
Plant Available Water	PAW
Reactive Oxygen Species	ROS
Ozone	O ₃
Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂ .
Superoxide anion	O ₂ ⁻
Peroxynitrite	ONOO ⁻
Nitrite	NO ₂ ⁻
Nitrate	NO ₃ ⁻
Nitric oxide	NO
Non-thermal plasma	NTP
Hydroperoxyl	·HO ₂ ⁻
Reactive Nitrogen Species	RNS

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Hóa chất	24
Bảng 2.2. Thiết bị và dụng cụ.....	25
Bảng 2.3. Thành phần môi trường dinh dưỡng RM	27

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình thái <i>H. pluvialis</i> (a) giai đoạn macrozooids (b) palmella (c) aplanospore (thanh đo 10 μm)	11
Hình 1.2. Quá trình tổng hợp astaxanthin [95].....	14
Hình 2.1. Hệ thống plasma DBD sử dụng không khí trong nghiên cứu đánh giá tại Viện công nghệ tiên tiến.....	26
Hình 3.1. Sự thay đổi của (a) pH, (b) H_2O_2 , (c) NO_3^- và (d) NO_2^- của môi trường nuôi cấy RM sau khi hoạt hóa plasma	33
Hình 3.2. Mật độ tế bào <i>H. pluvialis</i> trong 15 ngày nuôi cấy trong môi trường RM hoạt hóa plasma	35
Hình 3.3. Thay đổi tích lũy sinh khối khô của <i>H. pluvialis</i> sau 15 ngày nuôi cấy trong môi trường RM được hoạt hóa plasma	36
Hình 3.4. Tảo được nuôi cấy giai đoạn tích lũy sinh khối	37
Hình 3.5. Hình thái tế bào sau 5 ngày nuôi cấy ở các mốc thời gian khác nhau với T5 (5 phút), T10 (10 phút), T15 (15 phút), T20 (20 phút).....	38
Hình 3.6. Sự thay đổi hàm lượng chlorophyll khi xử lý plasma ở các mốc thời gian khác nhau	40
Hình 3.7. Sự thay đổi hàm lượng carotenoid khi xử lý plasma ở các mốc thời gian khác nhau.	42
Hình 3.8. (a) Đường chuẩn protein , (b) Ảnh hưởng của thời gian xử lý plasma đến hàm lượng protein.....	44
Hình 3.9. Ảnh hưởng của plasma đến hàm lượng lipid.....	45
Hình 3.10. (a) Đường chuẩn carbohydrate, (b) Ảnh hưởng của thời gian xử lý plasma đến hàm lượng carbohydrate	47
Hình 3.11. Tảo cảm ứng stress ở ngày 3 và ngày 8 trong bình nuôi cấy trong vi tảo ...	49
Hình 3.12. Tảo cảm ứng stress ở ngày 3 và ngày 8 được quan sát dưới kính hiển vi ...	49
Hình 3.13. (a) Đường chuẩn astaxanthin, (b) Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian xử lý plasma đến hàm lượng astaxanthin	50
Hình 3.14. Cao chiết astaxanthin.....	52

MỞ ĐẦU

Haematococcus pluvialis (*H. pluvialis*) là một loài vi tảo lục thuộc họ *Haematococcaceae* thường được tìm thấy trong môi trường nước ngọt, đơn bào, hình elip đường kính khoảng 10-20 μm , sinh sản vô tính bằng cách nhân đôi, có thể di chuyển bằng hai roi, phân bố chủ yếu ở vùng ôn đới. Khi trải qua các điều kiện sống bất lợi như độ mặn cao, thiếu nitơ, nhiệt độ và ánh sáng cao [1, 2] tảo *H. pluvialis* tổng hợp astaxanthin để chống lại sự thay đổi từ môi trường bên ngoài.

H. pluvialis là một loại tảo vi có giá trị thương mại, có khả năng tích lũy astaxanthin với hàm lượng lớn trong điều kiện stress. Cường độ ánh sáng ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng trưởng và tích lũy sắc tố, với cường độ thấp (20-50 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) duy trì sự tăng trưởng sinh cao, trong khi cường độ cao (70-100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) thúc đẩy sự hình thành nang sớm và tăng hàm lượng astaxanthin [3–5]. Khả năng tích lũy astaxanthin tăng khi gặp stress như ánh sáng cao, thiếu dinh dưỡng, pH, nhiệt độ... Tuy nhiên, astaxanthin chỉ chiếm tối đa 4–5% trọng lượng khô. Vì vậy, cần tối ưu sinh khối ở pha xanh trước khi chuyển sang pha đỏ để tăng hiệu suất tích lũy [6, 7].

Gần đây, nhiều phương pháp đã được nghiên cứu nhằm thúc đẩy sự tăng trưởng của *H. pluvialis* trong giai đoạn sinh trưởng xanh. Một số nghiên cứu đáng chú ý bao gồm việc bổ sung các chất kích thích sinh trưởng có nguồn gốc tự nhiên, chẳng hạn như nước ép cà rốt, dịch chiết thực vật, hoặc các hợp chất sinh học giàu dinh dưỡng [6,8,9]. Những chất này không chỉ cung cấp nguồn carbon hữu cơ mà còn có thể chứa các yếu tố vi lượng và chất chống oxy hóa, góp phần cải thiện hiệu suất sinh khối và tạo tiền đề cho quá trình tích lũy astaxanthin ở giai đoạn sau. Đặc biệt, công nghệ plasma lạnh (NTP) với khả năng tạo ra nhiều loại oxy/nitơ phản ứng (RONS) một cách ổn định và hiệu quả nên được xem là công nghệ đầy hứa hẹn trong ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau [10]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác động kích thích tăng trưởng của plasma lạnh trên nhiều loài thực vật bởi vai trò dinh dưỡng nitrogen cũng như điều hòa trao đổi chất tế bào của ROS [11]. Hiệu quả này cũng đã được đánh giá sơ bộ trên một số vi tảo như: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*,... Plasma lạnh đã được ứng dụng như một phương pháp tiền xử lý tế bào *H. pluvialis* trước giai đoạn nuôi cấy. Tuy nhiên, một hướng tiếp cận mới và tiềm năng là phát triển môi trường nuôi được

hoạt hóa bằng plasma, nhằm duy trì hiệu quả của các loại RONS trong suốt quá trình nuôi cấy. Khía cạnh này hiện vẫn chưa được khảo sát đầy đủ, mở ra cơ hội nghiên cứu mới trong tối ưu hóa sinh trưởng và tích lũy astaxanthin.

Từ những cơ sở trên, đề tài: “Đánh giá tác động của plasma lạnh cho quá trình tăng trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo lục *H. pluvialis*” được thực hiện. Nghiên cứu tập trung vào việc đánh giá sự thay đổi nồng độ RONS và pH của môi trường sau hoạt hóa plasma. Bên cạnh đó, giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng sau khi xử lý plasma được đánh giá thông qua mật độ tế bào, hàm lượng sắc tố quang hợp, sinh khối và các hợp chất hữu cơ. Ngoài ra, hiệu quả tích lũy của *H. pluvialis* sau quá trình nuôi cấy bằng plasma cũng được đánh giá

Mục đích nghiên cứu

Đánh giá tác động của plasma lạnh đến giai đoạn tăng trưởng và tích lũy một số hợp chất hữu cơ ở tảo *H. pluvialis* cũng như hiệu quả tổng hợp astaxanthin sau quá trình nuôi cấy với plasma.

Nội dung nghiên cứu

- Nội dung 1: Xây dựng, lắp đặt hệ thống plasma và xác định đặc tính lý hóa của môi trường hoạt hóa plasma bao gồm nồng độ NO_3^- , NO_2^- , H_2O_2 và sự thay đổi giá trị pH.
- Nội dung 2: Đánh giá tác động kích thích tăng trưởng của môi trường sau hoạt hóa plasma đến tốc độ tăng trưởng của tảo *H. pluvialis*.
- Nội dung 3: Đánh giá tác động của môi trường sau hoạt hóa plasma đến sự tích lũy một số hợp chất hữu cơ của *H. pluvialis* ở cuối phase xanh.
- Nội dung 4: Hiệu quả tích lũy astaxanthin sau quá trình nuôi cấy kết hợp plasma.

Những đóng góp của luận văn

Kết quả của đề tài cung cấp thông tin về:

- Chế tạo hệ thống plasma lạnh phục vụ cho nuôi cấy vi tảo xanh *H. pluvialis*.
- Mối liên hệ của các thành phần sinh ra sau phóng điện plasma đến sự tăng trưởng giai đoạn xanh của vi tảo *H. pluvialis*.

- Cơ sở để ứng dụng công nghệ plasma lạnh trong thúc đẩy tăng sinh khối tảo là nền tảng cho quá trình tích lũy astaxanthin hiệu quả.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Sơ lược về tảo *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis là một loại vi tảo xanh đơn bào nước ngọt thuộc lớp *Chlorophyceae* [12], phân bố rộng rãi tại nhiều môi trường sống trên toàn thế giới. Khả năng thích nghi với điều kiện khắc nghiệt của *H. pluvialis* không chỉ đến từ lớp vỏ dày bảo vệ bên ngoài, mà còn từ những biến đổi nội sinh như sự tích lũy các sắc tố chống oxy hóa và sự ngừng tăng trưởng sinh dưỡng, giúp tế bào chuyển sang trạng thái chống chịu stress hiệu quả.

Phân loại khoa học của tảo *H. pluvialis* được phân loại như sau

Ngành: Chlorophyta

Lớp: Chlorophyceae

Bộ: Volvocales

Họ: Haematococcaceae

Chi: *Haematococcus*

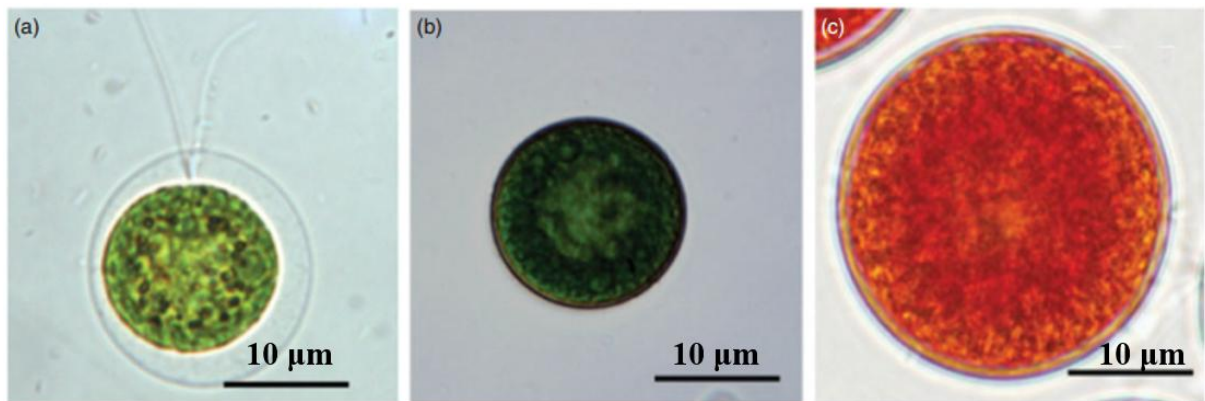
Loài: *Haematococcus pluvialis*

1.2. Đặc điểm sinh trưởng – hình thái

Trong quá trình phát triển, sự thay đổi đặc điểm hình thái và sinh lý của *H. pluvialis* phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện môi trường, được phân loại thành: macrozooids (hoặc zoospores), microzooids, palmella và hematocysts (hoặc aplanospores) [13]. Trong đó macrozooids, microzooids thường được gọi là giai đoạn sinh dưỡng xanh di động, trong khi palmella đánh dấu sự chuyển tiếp khi điều kiện môi trường bất lợi để đạt trạng thái hematocysts với hàm lượng astaxanthin đạt đỉnh có màu đỏ đặc trưng (giai đoạn đỏ).

Macrozooids (tế bào xanh di động) là các tế bào hình cầu, elip hoặc hình quả lê với hai roi và lục lạp hình chén (hình 1a). Loại tế bào này chiếm ưu thế trong điều kiện sinh trưởng thuận lợi với kích thước từ 8 – 20 μm . Macrozooids có thể phân chia thành 2-32 tế bào con thông qua nguyên phân ở giai đoạn tăng trưởng sinh dưỡng sớm. Trong điều kiện môi trường bất lợi, macrozooids mất đi tiêm mao và mở rộng kích thước tế bào thành dạng "palmella" (tế bào xanh bất động) với sự hình thành thành tế bào sơ cấp hoặc các cấu trúc đa lớp vô định hình dưới chất nền ngoại bào (hình 1b).

Tiếp theo là sự hình thành của hematocysts (bào tử màng dày) khi các yếu tố stress của môi trường xung quanh kéo dài. Lúc này tế bào ngừng phân chia, hình thành hai cấu trúc riêng biệt gồm: vỏ 3 lớp dày, cứng và thành tế bào thứ cấp kháng acetolysis giúp chúng chống chọi lại các điều kiện môi trường khắc nghiệt. Giai đoạn này cũng đi kèm với sự tích tụ một lượng lớn carotenoids thứ cấp, đặc biệt là astaxanthin, mang lại màu đỏ cho các tế bào (hình 1c). Khi các điều kiện môi trường thuận lợi hơn, các giao tử microzooids bắt đầu hình thành để khởi động chu trình sống mới. Sinh sản hữu tính hiếm khi được quan sát thấy ở *H. pluvialis*, nhưng nó có thể xảy ra trong những điều kiện cực kỳ bất lợi, quá trình sinh giao tử xảy ra ở aplanospores có thể tạo ra tới 64 giao tử [14]



Hình 1.1. Hình thái *H.pluvialis* (a) giai đoạn macrozooids (b) palmella (c) aplanospore (thanh đo 10 μm)

1.3. Thành phần các chất hữu cơ trong tảo (protein, lipid, carbohydrate)

Trong quá trình tăng trưởng, tảo *H. pluvialis* tích lũy nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau. Trong đó protein, carbohydrate và lipid chiếm tỉ lệ lớn trong sinh khối tế bào. Ngoài ra, tỉ lệ của các hợp chất cũng thay đổi tùy thuộc vào giai đoạn sống.

Protein: Ở giai đoạn sinh dưỡng, hầu hết các chủng *H. pluvialis* đều có mức protein cao giao động từ 29 – 45 % trọng lượng khô, sau đó giảm nhẹ khi chuyển sang giai đoạn đỏ. Quá trình chuyển hóa protein trong tảo diễn ra do các gen trong nhân tảo được phiên mã thành RNA thông tin (mRNA). Các phân tử mRNA sau đó sẽ đi đến ribosome, nơi chúng sẽ được dịch mã thành các chuỗi polypeptide, tiếp đến các chuỗi polypeptide này sẽ gấp lại để tạo thành protein có cấu trúc ba chiều. Một số protein có thể trở thành protein chức năng trực tiếp, trong khi những protein khác có thể được

đưa vào lục lạp (chloroplasts) để tổng hợp astaxanthin-binding proteins, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tảo khỏi stress oxy hóa.

Carbohydrate: Chiếm 15-17%, khoảng $\frac{1}{2}$ so với giai đoạn “đỏ”. Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh hàm lượng carbohydrat tăng cao hơn trong điều kiện stress nhẹ, sau đó giảm do tế bào tiêu thụ dần khi điều kiện stress kéo dài.

Lipid: Tổng lượng lipid giao động trong khoảng 20-25% trong giai đoạn sinh dưỡng, chủ yếu là các acid béo không bão hòa đa ở dạng chuỗi ngắn (16-18C). Ở giai đoạn đỏ, các tế bào có thể tích lũy các giọt lipid trung tính triacylglycerol lên đến 40% trọng lượng tế bào. Bên cạnh đó, một lượng đáng kể các chất chuyển hóa thứ cấp (chủ yếu là astaxanthin) có thể chiếm 4%. Quá trình vi tảo tạo ra lipid dự trữ diễn ra theo hai giai đoạn chính. Giai đoạn một xảy ra trong lạp thể, nơi tế bào biến CO_2 và năng lượng thành các chuỗi carbon dài. Tế bào bắt đầu bằng cách chuyển đổi CO_2 và các sản phẩm ban đầu của quang hợp thành pyruvate, rồi thành acetyl-coenzyme A. Hợp chất này sau đó được kéo dài và chỉnh sửa liên tục bởi phức hợp fatty acid synthase để hình thành các chuỗi axit béo cơ bản. Các axit béo sau đó được hoạt hóa thành dạng acyl-coenzyme A để chuẩn bị cho việc xây dựng mỡ dự trữ. Giai đoạn hai diễn ra khi acyl-coenzyme A di chuyển ra khỏi lạp thể và vào lưới nội chất. Tại đây, ba phân tử acyl-coenzyme A được lắp ráp lần lượt lên một "khung đỡ" là glycerol 3-phosphate. Sản phẩm cuối cùng của quá trình lắp ráp này là triacylglycerol, dạng mỡ dự trữ mà vi tảo tích lũy

Carotenoid: Carotenoid của tế bào sinh dưỡng chủ yếu là lutein (75– 80%), β -carotene (10–20%) và các chất khác, bao gồm diệp lục a, b, carotenoids sơ cấp, violaxanthin, neoxanthin, lactucaxanthin và zeaxanthin [15,16]. Ở giai đoạn đỏ, tổng hàm lượng carotenoid được tăng cường rõ rệt và kiểu carotenoid sơ cấp đặc trưng của giai đoạn sinh dưỡng được thay thế bằng carotenoid thứ cấp, chủ yếu là astaxanthin (80–99% tổng lượng carotenoid). Astaxanthin trong giai đoạn này không tồn tại tự do mà chủ yếu lưu trữ dưới dạng este axit béo của astaxanthin, thường là mono- hoặc diester của palmitic (16:0), oleic (18:1) hoặc linoleic (18:2) axit. Các dạng tồn tại này là cần thiết cho sự lắng đọng của phân tử astaxanthin có độ phân cực cao trong chất

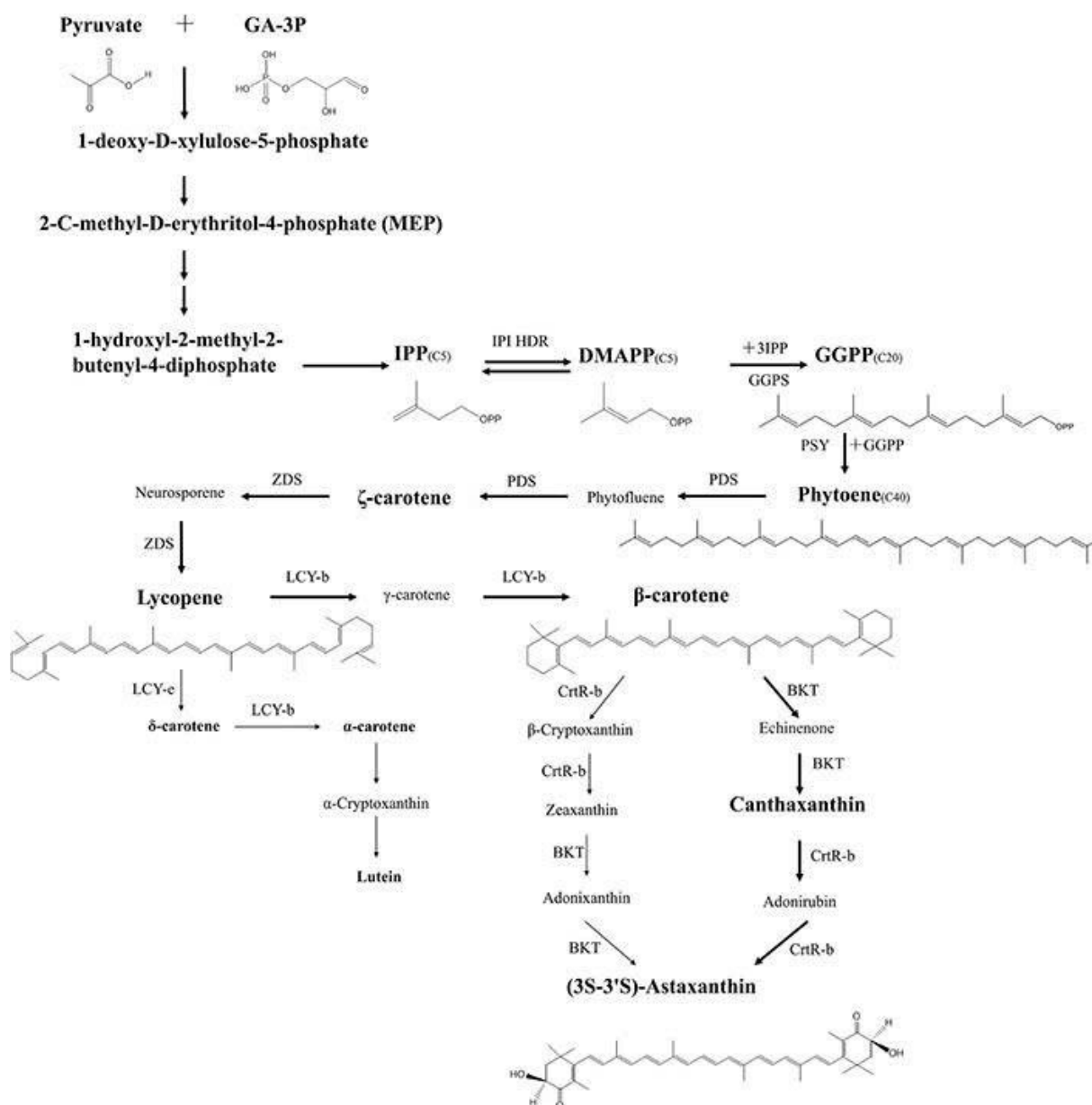
nền không phân cực của các giọt lipid. Khoảng 70% monoeste, 25% diester và chỉ 5% ketocarotenoid tự do có trong các tế bào “đỏ” trưởng thành.

Astaxanthin: astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione) là một hợp chất thuộc nhóm carotenoid có trong các sinh vật như vi tảo, động vật giáp xác, cá và một số loài chim [18,19]. Astaxanthin có cấu trúc gồm 2 vòng β -ionone được liên kết bởi chuỗi polyene chứa các gốc keto và hydroxyl [20]. Cấu trúc này giúp astaxanthin liên kết dễ dàng với các màng sinh học, loại bỏ hiệu quả các gốc tự do từ bên trong và bên ngoài bề mặt tế bào [22] giúp nó trở thành hợp chất là có hoạt tính chống oxy hóa hiệu quả nhất trong số các carotenoid, cao hơn 10 lần so với β -carotene và 100 lần so với α -tocopherol [23]. Ngoài ra khi *Haematococcus pluvialis* tổng hợp astaxanthin khi phải đối mặt với các điều kiện stress như ánh sáng mạnh hoặc thiếu chất dinh dưỡng. Đây là một phản ứng bảo vệ tế bào, chủ yếu diễn ra trong lập thể.

Astaxanthin được hình thành thông qua quá trình tổng hợp carotenoid theo con đường MEP (methylerythritol phosphate), khởi đầu từ hai chất nền chính là pyruvate và glyceraldehyde-3-phosphate (GA-3P). Pyruvate chủ yếu được tạo ra từ quá trình đường phân, là sản phẩm của chu trình chuyển hóa cacbon trong quang hợp. Trong khi đó, GA-3P cũng là sản phẩm của quang hợp, nhưng đồng thời có thể được hình thành thông qua quá trình phân giải lipid. Hai chất nền này tiếp tục được chuyển hóa thành các hợp chất trung gian, sau đó được tổng hợp thành chuỗi carbon dài nhờ các enzyme chuyên biệt để tạo ra β -carotene. Các enzyme này được cấu trúc từ protein, do đó protein đóng vai trò thiết yếu trong toàn bộ quá trình tổng hợp.

Từ β -carotene, tế bào tiếp tục chuyển hóa thành astaxanthin thông qua các phản ứng xúc tác enzyme. Sau khi được hình thành, astaxanthin sẽ được ester hóa với các acid béo và lưu trữ trong các giọt lipid nội bào. Điều này cho thấy rằng cả quá trình chuyển hóa protein và lipid đều có mối liên kết chặt chẽ với giai đoạn cuối cùng của quá trình sản xuất và lưu trữ astaxanthin.

Tổng thể, sự tích lũy đồng thời của carbohydrate, protein và lipid trong pha xanh đóng vai trò như một nền tảng chuyển hóa quan trọng, hỗ trợ trực tiếp cho quá trình tổng hợp astaxanthin trong giai đoạn chuyển sang pha đỏ.



Hình 1.2. Quá trình tổng hợp astaxanthin [95]

1.4. Các yếu tố ảnh hưởng quá trình tăng trưởng của vi tảo *H. pluvialis*

1.4.1. Nguồn nitrogen

Nitrogen là một trong những chất dinh dưỡng thiết yếu ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào và hoạt động enzyme của *H. pluvialis* [24]. Cụ thể chúng là thành phần cấu trúc của đại phân tử như: protein, DNA, RNA từ đó tham gia cấu trúc và điều hòa hoạt động trao đổi chất từ đó ảnh hưởng đến kích thước và tốc độ phân bào [24, 25]. Do đó,

nitrogen được xem là yếu tố giới hạn tăng trưởng chính, ảnh hưởng trực tiếp đến phát triển sinh khối trong tế bào [24].

Vi tảo có khả năng sử dụng nhiều nguồn nitrtogen khác nhau như: nitratee, amoniac và urê [26]. Về mặt lý thuyết, cơ chế hấp thu nitrogen từ amoni là con đường trao đổi chất đơn giản nhất để vi tảo đồng hóa trực tiếp [27]. Tuy nhiên, nitrate vẫn được xem là dạng nitrogen phổ biến nhất, được hấp thu trực tiếp qua màng tế bào thông qua cơ chế vận chuyển chủ động, sau đó được chuyển hóa để tổng hợp các amino acid thiết yếu. Trong một số môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn như BG-11, BBM (Bold's Basal Medium) hoặc môi trường RM-4X, nitrate thường được bổ sung dưới dạng NaNO_3 , cho thấy tầm quan trọng của nguồn dinh dưỡng này đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của vi tảo [28]

1.4.2. Nguồn carbohydrate.

Sinh khối *H. pluvialis* cao có thể thu được thông qua phương thức nuôi hỗn hợp sử dụng muối hoặc acid acetic/acetat vào đầu hoặc cuối pha log [29 – 31]. Hay việc thay đổi cân bằng C/N bằng cách sử dụng carbon dioxide (CO_2), có khả năng kích thích sự hình thành nang và tích lũy astaxanthin [32]. Sinh khối của *H. pluvialis* có thể được tăng lên bằng cách khuếch tán CO_2 vào môi trường để thay thế sự thiếu hụt nitơ bằng nồng độ cụ thể của carbon dạng khí [27]. Tuy nhiên, việc tăng nồng độ CO_2 lên tới 20% có thể ức chế lục lạp và làm giảm sự phát triển của tế bào, dẫn đến tỷ lệ chết tế bào cao [27, 33]

1.4.3. Cường độ chiếu sáng

Ánh sáng là một yếu tố quan trọng để cải thiện năng suất sinh khối cho *H. pluvialis* trong môi trường nuôi cấy hỗn hợp [34]. Năng lượng bức xạ trong ánh sáng được chuyển đổi thành năng lượng hóa học dưới dạng ATP và NADPH thông qua chuỗi vận chuyển điện tử quang hợp. Vi tảo sẽ lưu trữ năng lượng hóa học trong tinh bột bằng cách cố định CO_2 thông qua chu trình Calvin [35], từ đó làm nguyên liệu cho việc phân chia và tăng trưởng của tế bào.

1.4.4. Hình thức dinh dưỡng trong nuôi cấy

Có thể nuôi *H. pluvialis* để thu được sinh khối bằng chế độ tăng trưởng quang tự dưỡng, dị dưỡng hoặc hỗn hợp [36 – 38]. Điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng thường

đòi hỏi ánh sáng, CO₂ và chất dinh dưỡng [39]. Ánh sáng là nguồn năng lượng, trong khi hợp chất vô cơ chủ yếu đóng vai trò là nguồn carbon/nitrogen để tạo ra sinh khối tảo [33]. Trong phương thức nuôi cấy, việc sử dụng các hợp chất hữu cơ trong điều kiện thiếu ánh sáng sẽ giúp tăng năng suất tế bào [40]. Tuy nhiên, kỹ thuật này không thực sự phù hợp để sản xuất astaxanthin ở *H. pluvialis*, vì astaxanthin là một carotenoid phụ thuộc vào ánh sáng [41].

Ở chế độ nuôi hỗn hợp, việc sử dụng các nguồn hữu cơ và vô cơ để tạo carbon và năng lượng như môi trường bổ sung acetat đã thành công trong việc tăng cường sự phát triển của *H. pluvialis* và sản xuất astaxanthin [31,40]. Tuy nhiên, kỹ thuật hỗn hợp có thể làm tăng nguy cơ lây nhiễm chéo các vi sinh vật hoặc tảo khác [38].

1.4.5. Hệ thống nuôi cấy

Để sản xuất *H. pluvialis* có mật độ cao, phương pháp canh tác hai pha sử dụng hệ thống lò phản ứng sinh học (Photobioreactor – PBR), ao sản xuất ngoài trời hoặc kết hợp cả hai đã được ứng dụng [40, 42]. Đầu tiên, các tế bào pha xanh quy mô nhỏ được nuôi cấy trong buồng nuôi cấy quang sinh học để tăng sinh tế bào trong điều kiện tăng trưởng bình thường. Sau đó, các tế bào được chuyển vào các ao nuôi quy mô lớn hơn với điều kiện stress và thiếu hụt dinh dưỡng để kích thích tích lũy astaxanthin [42]. Tuy nhiên, hệ thống nuôi mở thường dẫn đến nguy cơ nhiễm cao cũng như năng suất thấp, do đó hệ thống nuôi cấy kín thường được áp dụng.

Ở quy mô kỹ thuật và thương mại, mô hình nuôi *H. pluvialis* dạng huyền phù chiếm vị trí chủ đạo [43]. Nuôi huyền phù có thể được tiến hành trong hệ thống mở (ao, hồ, bể tự nhiên) hay trong các buồng nuôi quang hợp kín PBR. Bên cạnh đó, nuôi cấy trên màng biofilm cũng đã cho thấy tiềm năng hứa hẹn, tuy nhiên mô hình này chỉ mới được nghiên cứu và đánh giá trên quy mô phòng thí nghiệm.

Hệ thống mở là hệ thống nuôi trồng đơn giản với quy trình quản lý nước thay đổi, tùy theo cường độ hoạt động và có thể bổ sung CO₂ trực tiếp dưới sự kiểm soát chỉ số pH tự động trong các rãnh nước nông. Sinh khối vi tảo có thể được thu hoạch bằng lắng tủa hoặc ly tâm. Ưu điểm của hệ thống mở là có cấu tạo đơn giản, chi phí thấp, dễ vận hành, ít tiêu tốn năng lượng. Nhưng cũng có một số nhược điểm như chiếm diện tích bề mặt lớn, phụ thuộc nhiều vào điều kiện thời tiết, hệ thống thường dùng trong

pha đồ để tận dụng cường độ ánh sáng cao và đặc biệt là khó kiểm soát sự xâm nhiễm của vi sinh vật cũng như các thông số của môi trường nuôi cấy, ảnh hưởng năng suất tảo.

Bên cạnh đó nhiều thiết kế hệ thống nuôi kín PBR đã được mô tả trong tài liệu khoa học [44, 45] và chỉ có một tỷ lệ thấp số bằng sáng chế được thương mại hóa cho đến nay. Chúng chủ yếu liên quan đến sản xuất quang tự động bằng cách sử dụng ánh sáng tự nhiên hoặc nhân tạo, các PBR kín có thể được vận hành hoàn toàn thủ công, hoặc kết hợp các hệ thống giám sát và phản hồi tự động, để giữ cho các điều kiện nuôi cấy bên trong ổn định hơn. Cũng như các loại hệ thống bioreactor khác, PBR có thể được vận hành theo chế độ hàng loạt, bán tự động hoặc liên tục. Các hệ thống PBR được tích hợp các thành phần:

- Buồng nuôi cấy: chứa môi trường nuôi cấy vi tảo, được thiết kế trong suốt cho phép nhận ánh sáng từ bên ngoài.
- Hệ thống phân phối ánh sáng: các loại đèn được thiết kế ở ánh sáng và cường độ mong muốn. trong khi các hệ thống ngoài trời sử dụng ánh sáng tự nhiên hoặc các thiết bị thu ánh sáng mặt trời khác nhau.
- Hệ thống trao đổi khí: cung cấp carbon dioxide và loại bỏ oxy được tạo ra từ quang hợp. có thể ức chế quá trình trao đổi chất hoặc làm hỏng vi tảo nếu tích lũy nhiều.
- Hệ thống thu hoạch: tập trung vi tảo để xử lý hạ nguồn và thu hồi sản phẩm.
- Đối với hệ thống kín, ưu điểm là tránh được sự xâm nhiễm của vi khuẩn, mật độ nuôi cấy cao hơn. Kiểm soát chặt chẽ được các điều kiện hóa lý như: ánh sáng, nồng độ khí CO₂ và oxy. Bên cạnh đó hệ thống còn có thể được thiết kế với thể tích lớn và khả năng xáo trộn tốt. Nhưng ngược lại phải tốn kém nhiều chi phí đầu tư và quan trọng là nếu đường kính của ống lớn thì sự hấp thụ ánh sáng của tảo sẽ bị hạn chế, khó vệ sinh và dễ gây tạt nhiễm.

1.5. Các phương pháp thúc đẩy tăng trưởng phase xanh ở vi tảo *H. pluvialis*

Trong quá trình nuôi cấy *H. pluvialis*, giai đoạn sinh trưởng xanh đóng vai trò nền tảng trong việc hình thành sinh khối và tạo tiền chất cho quá trình tổng hợp astaxanthin ở giai đoạn sau. Mặc dù phần lớn các nghiên cứu hiện nay tập trung vào

việc tối ưu hóa điều kiện kích thích tích lũy astaxanthin, thì việc nâng cao hiệu suất sinh trưởng ở giai đoạn xanh vẫn là một yếu tố then chốt quyết định năng suất cuối cùng. Giai đoạn này không chỉ ảnh hưởng đến tổng lượng tế bào mà còn quyết định khả năng chuyển hóa nội bào khi bước sang giai đoạn stress [9].

Các phương pháp tối ưu hóa sinh trưởng chủ yếu tập trung vào điều chỉnh các yếu tố vật lý và hóa học của môi trường nuôi cấy như thành phần dinh dưỡng, cường độ ánh sáng, nhiệt độ, pH và tốc độ khuấy [46]. Các môi trường như BG-11, BBM hay RM-4X thường được sử dụng phổ biến, với nitrate (NO_3^-) là nguồn nitơ chính, đóng vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp amino acid và duy trì hoạt động trao đổi chất của tế bào. Tuy nhiên, các phương pháp này thường đòi hỏi thời gian dài, chi phí cao và dễ gặp rủi ro nhiễm tạp trong quá trình nuôi cấy kéo dài [26, 46–48].

Xu hướng nghiên cứu gần đây đã chuyển sang khai thác các tín hiệu sinh học và nguồn chất kích thích tự nhiên nhằm rút ngắn thời gian nuôi cấy và nâng cao hiệu quả sinh trưởng. Một trong những chiến lược tiềm năng là bổ sung các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật, điển hình như nước ép cà rốt. Nước ép cà rốt không chỉ cung cấp nguồn carbon hữu cơ dễ hấp thu mà còn chứa các carotenoid, vitamin và chất chống oxy hóa, có khả năng kích thích tăng trưởng tế bào thông qua việc điều hòa các tín hiệu nội bào và giảm stress oxy hóa. Việc sử dụng các nguồn bổ sung này giúp cải thiện sinh khối một cách tự nhiên, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chuyển hóa sang giai đoạn tích lũy astaxanthin [8].

Ngoài ra, một số nghiên cứu còn đề xuất việc sử dụng các công nghệ mới như plasma lạnh hoặc nước hoạt hóa plasma (PAW) để kích thích sinh trưởng thông qua việc cung cấp các dạng nitơ hoạt hóa và điều hòa ROS nội bào. Phương pháp này đã cho thấy hiệu quả sơ bộ trên các loài vi tảo như *Chlorella vulgaris* và *Scenedesmus obliquus*, mở ra tiềm năng ứng dụng cho *H. pluvialis* trong tương lai.

1.6. Tổng quan về công nghệ plasma

1.6.1. Khái niệm và phân loại

Plasma, thường được gọi là "trạng thái thứ tư của vật chất", là một môi trường có mức độ ion hóa cao, bao gồm các hạt mang điện (electron, ion dương, ion âm) và các hạt không mang điện (như nguyên tử và phân tử). Khi khí được cung cấp năng lượng

đủ lớn, quá trình ion hóa xảy ra, khiến các electron tách khỏi nguyên tử và tạo thành một môi trường dẫn điện mạnh (Shalaby et al., 2013).

Plasma được phân loại thành hai nhóm chính: plasma nhiệt (thermal plasma) và plasma không nhiệt, hay còn gọi là plasma lạnh (non-thermal plasma). Trong đó, plasma lạnh đặc biệt được ưa chuộng trong các ứng dụng sinh học nhờ khả năng tương tác với vật liệu sinh học ở nhiệt độ gần với môi trường, giúp giảm thiểu tối đa tổn thương nhiệt.

Hiện nay, plasma lạnh có thể được tạo ra từ nhiều hệ thống khác nhau như: phóng điện cảm ứng tần số vô tuyến (RF, radio frequency) [20], phóng điện rào cản điện môi (DBD, dielectric barrier discharge) [22], phóng điện vi sóng (MW, microwave) [23], phóng điện vầng quang (corona, corona discharge). Trong đó, plasma DBD nhận được nhiều sự chú ý nhờ hiệu quả cao trong các ứng dụng như xử lý vi sinh vật, chất màu, thuốc bảo vệ thực vật, kích thích nảy mầm và tăng trưởng thực vật, cùng với thiết kế và vận hành đơn giản.

1.6.2. Sự hình thành nước hoạt hóa plasma và một số đặc tính lý hóa

Nước hoạt hóa plasma được hình thành khi nước tiếp xúc với khí plasma, tạo ra các thành phần phản ứng mạnh. Những chất này tiếp tục tương tác với phân tử nước và với nhau, dẫn đến sự hình thành các chất oxy hóa thứ cấp có vai trò quan trọng trong nhiều ứng dụng. Các chất oxy hóa này được phân thành hai nhóm: Nhóm có thời gian tồn tại dài như hydro peroxide (H_2O_2), ozone (O_3) và nitrate (NO_3^-), với thời gian bán hủy từ vài phút đến vài ngày và nhóm tồn tại ngắn như gốc hydroxyl ($OH^\bullet$), nitric oxide (NO), peroxyxynitrite ($ONOO^-$) và nitrite (NO_2^-) chỉ tồn tại từ nano giây đến vài giây, thường tham gia vào các phản ứng nhanh để tạo ra các gốc ổn định.

Về phương diện kỹ thuật, quá trình tạo nước hoạt hóa plasma (PAW) có thể được chia thành ba dạng chính:

- Phóng điện trong pha lỏng, khi plasma hình thành trực tiếp bên trong nước.
- Phóng điện trong pha khí trên bề mặt chất lỏng, nơi plasma được tạo ra phía trên nước và các sản phẩm phản ứng sẽ thẩm thấu vào dung dịch.
- Phóng điện trong bong bóng khí phân tán trong nước, giúp mở rộng vùng tiếp xúc giữa plasma và nước nhờ các vi bọt khí mang plasma.

So với nước thường, PAW sở hữu những đặc tính lý hóa đặc biệt, bao gồm:

1.6.2.1. Tính chất vật lý

- So với nước thông thường, PAW thể hiện những đặc điểm lý hóa nổi bật. Về mặt vật lý, pH của PAW thường giảm dần theo thời gian xử lý, tạo môi trường axit nhẹ (pH khoảng 3–6) do sự hình thành của các axit vô cơ như nitric và nitrous. Giá trị thế oxy hóa khử (ORP) của PAW thường ở mức cao, phản ánh khả năng oxy hóa mạnh – yếu tố quan trọng trong các ứng dụng khử trùng và xử lý sinh học. Các chất phản ứng như H_2O_2 có thể đóng vai trò kép, vừa là chất oxy hóa vừa là chất khử [27]. Bên cạnh đó, các loại ROS như $\text{OH}^\bullet$, O_3 và RNS như NO_3^- , NO_2^- , ONOO^- cũng góp phần duy trì tính oxy hóa cao của PAW [29].
- Độ dẫn điện: Độ dẫn điện của PAW tăng đáng kể do sự hiện diện của lượng lớn các ion và hạt tự do mang điện, được hình thành từ quá trình khuếch tán các loài phản ứng vào nước trong suốt quá trình xử lý plasma. Các nghiên cứu cho thấy độ dẫn điện của PAW có thể dao động từ 100 đến 500 mS/cm, phản ánh mật độ cao của các hạt mang điện trong dung dịch. Đây là một chỉ số quan trọng để đánh giá tổng nồng độ các loài phản ứng và ion trong PAW.

1.6.2.2. Các oxy phản ứng (ROS)

- Gốc OH: Là tiền chất của H_2O_2 trong PAW và là một chất oxy hóa mạnh. OH có thời gian tồn tại ngắn trong pha khí ($\sim 200 \mu\text{s}$) và pha lỏng (vài nano giây) do tính phản ứng cao. Trong PAW, OH thường hình thành từ các phản ứng thứ cấp như phân hủy H_2O_2 hoặc phản ứng giữa O_3 với H_2O_2 .
- H_2O_2 : Là một trong những tác nhân oxy hóa có thời gian tồn tại dài phổ biến nhất trong PAW và hình thành qua hai cơ chế chính: (1) OH trong pha khí kết hợp để tạo thành H_2O_2 và khuếch tán vào pha lỏng; (2) OH khuếch tán từ pha khí vào pha lỏng rồi kết hợp để tạo thành H_2O_2 .
- O_3 : Là chất oxy hóa kháng khuẩn mạnh, có thế oxy hóa-khử cao hơn nhiều so với các chất oxy hóa thông thường như permanganate hay chlorine. O_3 trong PAW hình thành từ hai cơ chế: khuếch tán từ pha khí vào pha lỏng hoặc được

sinh ra trực tiếp trong pha lỏng bởi phóng điện. Tuy nhiên, nồng độ O_3 trong PAW thường thấp do khả năng hòa tan kém.

- Superoxide (O_2^-): Là một ROS quan trọng, hình thành khi nước được xử lý bằng plasma áp suất khí quyển. O_2^- có thể sinh ra từ phản ứng của các electron năng lượng cao với phân tử oxy, hoặc từ phản ứng giữa $OH^\bullet$ và O_3 . Gốc này rất cần thiết cho quá trình diệt khuẩn, đặc biệt ở các giá trị pH nhất định.

1.6.2.3. Các gốc nitrogen

- NO_2^- và NO_3^- : Là các tác nhân sinh ra như sản phẩm thứ cấp trong PAW. NO_2^- có thể chuyển đổi thành NO_3^- khi tương tác với các chất oxy hóa như H_2O_2 hoặc O_3 .
- NO: Là hợp chất có khả năng diệt khuẩn, kích hoạt quá trình chết theo chương trình ở tế bào ung thư và hỗ trợ lành vết thương. Trong PAW, NO chủ yếu hình thành từ các phản ứng thứ cấp do khả năng hòa tan thấp của nó trong nước.
- $ONOO^-$: Hình thành từ phản ứng giữa NO và H_2O_2 hoặc O_2^- . $ONOO^-$ có khả năng vô hiệu hóa vi sinh vật trong môi trường PAW, góp phần vào hiệu quả khử trùng.

1.7. Cơ chế kích thích tăng trưởng thực vật bằng plasma

Nước hoạt hóa bằng (PAW) đã chứng minh tiềm năng đáng kể trong việc tăng cường sinh trưởng của thực vật thông qua nhiều cơ chế sinh học. PAW chứa RONS bao gồm H_2O_2 , NO_2^- và NO_3^- hoạt động như các phân tử truyền tín hiệu và chất dinh dưỡng [62,63]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy tác động kích thích tăng trưởng ở các loài thực vật khác nhau, ví dụ như trên cà chua, tưới PAW dẫn đến sự tích lũy tương ứng của RONS nội sinh, qua đó gia tăng hoạt động các hormone phòng vệ (axit salicylic và axit jasmonic) cũng như biểu hiện của gene liên quan đến bệnh [64]. Ở ngô và lúa mạch, PAW đã cải thiện các thông số sinh trưởng và chức năng sinh lý mà không gây tổn thương DNA [62]. Cây rau diếp được xử lý bằng PAW thể hiện hàm lượng sắc tố quang hợp và tốc độ quang hợp cao hơn so với các đối chứng [65]. Cây cà chua được xử lý bằng PAW trong 30 phút cho thấy chiều dài thân cao hơn 1,5 lần, số lá nhiều hơn 4 lần, hàm lượng diệp lục tăng gấp đôi và trọng lượng tươi cao hơn 61% so với cây đối chứng [66]. Mặc dù cơ chế tác động của plasma lên thực vật đã được

nghiên cứu khá sâu rộng, các nghiên cứu về ảnh hưởng của plasma lên vi tảo vẫn còn tương đối hạn chế.

Tuy chưa có nhiều nghiên cứu trực tiếp về tác động của plasma lên quá trình sinh trưởng của vi tảo *H.pluvialis*, nhưng những kết quả ban đầu từ các loài tảo khác cho thấy tiềm năng ứng dụng plasma trong nuôi cấy vi sinh vật quang dưỡng là rất đáng quan tâm. Việc tiếp tục làm rõ cơ chế tác động và tối ưu hóa các thông số xử lý plasma sẽ là bước quan trọng để khai thác hiệu quả công nghệ này trong sản xuất sinh khối và các hợp chất sinh học từ vi tảo.

1.7.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Nhiều nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc sử dụng các phân tử tín hiệu để kích thích sự phân chia tế bào và tích lũy sinh khối trong pha tăng trưởng xanh của vi tảo. Vo và cộng sự (2016) [68] đã chứng minh rằng việc bổ sung 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (tiền chất ethylene) giúp thúc đẩy tăng trưởng và tích lũy astaxanthin bằng cách gây ra sản xuất ROS. Gong và cộng sự (2024) [69] báo cáo rằng việc thêm chất lỏng ion amino acid (12.5 mg/L) đã kích thích đáng kể sự phân chia tế bào *H. pluvialis*, tăng mật độ tế bào từ 30×10^4 lên 160×10^4 tế bào/mL sau 7 ngày nuôi cấy. Sự cải thiện này đi kèm với sự tích lũy protein, carbohydrate, sắc tố quang hợp, và sự gia tăng mức ROS nội bào. Bên cạnh đó, việc bổ sung axit gamma aminobutyric (GABA) [70] vào môi trường nuôi cấy ban đầu cũng đã được chứng minh là tăng cường tích lũy sinh khối thông qua vai trò là nguồn nitrogen, đồng thời cải thiện sắc tố quang hợp và khả năng chịu đựng stress oxy hóa, từ đó tăng sản xuất astaxanthin. những phương pháp này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tích lũy dinh dưỡng trong pha xanh, có thể được kích thích hiệu quả thông qua việc bổ sung các tác nhân tín hiệu như hormone hoặc chất điều chỉnh ROS để thúc đẩy hoạt động trao đổi chất và tăng sinh tế bào. Tuy nhiên trong những năm gần đây, việc sử dụng nước hoạt hóa plasma thay thế cho nguồn nitrogen thông qua RNS vừa có tín hiệu ROS. Trên thế giới đã sử dụng plasma ứng dụng trên 1 số loài vi tảo xanh như *Chlorella* để chứng minh tính hiệu quả của công nghệ này [91-93].

1.7.2. Tình hình nghiên cứu ứng dụng plasma trong nuôi cấy vi tảo

Công nghệ plasma lạnh (NTP) là một phương pháp tiên tiến có khả năng tạo ra các RONS một cách ổn định và hiệu quả. Khi nước được kích hoạt bởi plasma lạnh, quá trình phóng điện sẽ ion hóa và phân ly các phân tử nitrogen, oxy và hơi ẩm trong không khí, tạo ra nhiều loài hoạt tính như nitơ nguyên tử (N), oxy nguyên tử (O), hydroperoxyl ($\cdot\text{HO}_2^-$), $\cdot\text{OH}$, O_3 và oxy nhóm đơn ($^1\text{O}_2$) trong pha khí. Các gốc này sau đó có thể chuyển hóa thành các chất thứ cấp thông qua phản ứng tại bề mặt khí-lỏng hoặc trong dung dịch, dẫn đến sự hình thành PAW. Nhờ sở hữu các đặc tính hóa lý độc đáo như khả năng khử trùng mạnh, an toàn với môi trường và không để lại dư lượng độc hại, PAW đã được ứng dụng hiệu quả trong các lĩnh vực như xử lý thực phẩm, bảo quản nông sản và khử trùng trong lĩnh vực y sinh [67]. Ở *H. pluvialis*, tác động của plasma lạnh lần đầu tiên được Chen và cộng sự đánh giá (2020) [94] cho thấy sự kích thích tăng trưởng đáng kể thông qua việc điều hòa các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp phytohormone và quang hợp nhưng plasma chỉ được sử dụng ở tiền xử lý tế bào trước khi nuôi và nghiên cứu sử dụng RONS trong môi trường nuôi vẫn chưa được đánh giá.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Tảo *Haematococcus pluvialis* chủng LC (HP-C) được cung cấp bởi Viện nuôi trồng thủy sản 2.

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu khả năng tích lũy sinh khối của *H. pluvialis* ở phase xanh khi xử lý plasma.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng Công nghệ plasma và Vật lý tính toán – Viện Công nghệ tiên tiến.

2.2. Hóa chất và thiết bị

Các hóa chất và thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê trong bảng sau

Bảng 2.1. Hóa chất

STT	Tên hóa chất
1	Sodium nitrate (NaNO_3)
2	Copper(II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
3	Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
4	Zinc Sulfate Heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
5	Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)
6	Sodium chloride (NaCl)
7	Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
8	Boric acid (H_3BO_3)
9	Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
10	Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)
11	Manganese sulfate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
12	Ammonium heptamolybdate tetrahydrate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
13	Cobalt(II) nitrate hexahydrate ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
14	Methanol (CH_3OH)
15	Trichloromethane (CHCl_3)

Bảng 2.2. Thiết bị và dụng cụ

STT	Tên dụng cụ	Hãng sản xuất
1	Ống nghiệm	Duran
2	Cốc thủy tinh	Duran
3	Bình định mức	Duran
4	Pipette	Duran
5	Micropipet 1000	Vitlab
6	Micropipet 200	Vitlab
7	Erlen 250ml	Duran
8	Máy đo pH	Hannah
9	Máy đo quang phổ UV-Vis	Shimadzu
10	Máy ly tâm Spindown	DLAB
11	Cân phân tích 4 số (PA214)	Ohaus
12	Máy đo NO ₂	Barry Century
13	Máy đo O ₃	Horiba
14	Hệ plasma DBD	Viện Công nghệ tiên tiến
15	Burette	Duran
16	Hệ thống điều chỉnh lưu lượng	
17	Hệ plasma DBD	
18	Kính hiển vi	Olympus
19	Buồng đếm tảo	Anh
20	Máy khuấy từ	DLAB
21	Hệ thống đèn chiếu sáng	Philips

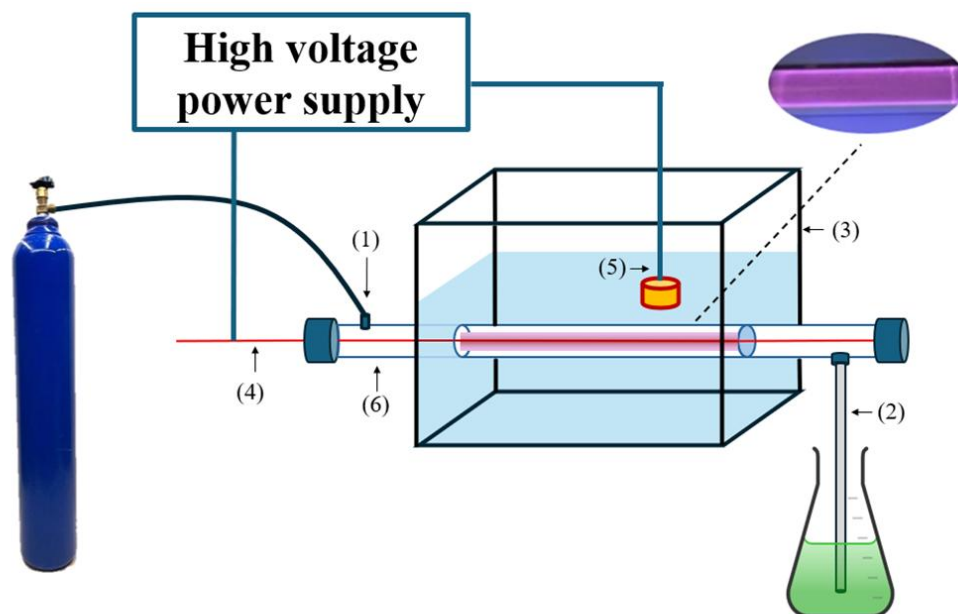
2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng, lắp đặt hệ thống plasma và xác định đặc tính lý hóa của nước hoạt hóa plasma.

2.3.1.1. Xây dựng, lắp đặt hệ thống plasma

Hệ thống plasma DBD sử dụng trong thí nghiệm này được chế tạo tại Viện Công nghệ tiên tiến, gồm một ống thạch anh chứa điện cực trong là ống đồng rỗng dài 40 cm và điện cực ngoài là khối đồng hình trụ ngâm trong nước. Trong nghiên cứu này, nước

vừa đóng vai trò làm điện cực ngoài vừa giúp ổn định nhiệt độ. Plasma được tạo ra bằng cách dẫn không khí vào ống thạch anh với lưu lượng 2 L/phút, kết hợp với nguồn điện cao áp 220V ở tần số 5 kHz. Các sản phẩm sinh ra từ quá trình phóng điện plasma được đưa vào môi trường thông qua hệ thống dẫn khí, với thời gian xử lý thay đổi từ 5 đến 25 phút để tạo môi trường hoạt hóa plasma (PAW). Sau xử lý, các đặc tính lý hóa của PAW được phân tích nhằm đánh giá sự biến đổi.



(1) Khí đầu vào, (2) Ống dẫn khí ra, (3) Thùng chứa nước, (4) Điện cực trong, (5) Điện cực ngoài, (6) Ống thạch anh.

Hình 2.1. Hệ thống plasma DBD sử dụng không khí trong nghiên cứu đánh giá tại Viện công nghệ tiên tiến

2.3.1.2. Sự thay đổi đặc tính lý hóa của môi trường sau xử lý plasma.

Dưới tác động của phóng điện plasma, pha khí tạo ra nhiều hợp chất phản ứng, tuy nhiên khi được dẫn vào dung dịch, chỉ một số sản phẩm bền như các ROS gồm H_2O_2 và O_3 hòa tan, cùng với RNS như NO_3^- và NO_2^- mới được hình thành và duy trì. Những chất này đóng vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến môi trường sinh trưởng của tế bào hoặc vi sinh vật. Đặc biệt, giá trị pH của dung dịch sau xử lý cũng có tác động đáng kể đến quá trình tăng trưởng, do đó yếu tố này cũng được đưa vào đánh giá và phân tích trong phạm vi luận văn.

- Phương pháp đánh giá NO_3^- , NO_2^- : Nồng độ các ion có trong sản phẩm được tạo từ plasma lạnh được xác định dựa vào phản ứng màu và thang đo đã quy định sẵn trong bộ kit nitrate và nitrite (Sera test kit, Đức)
- Nồng độ H_2O_2 được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với KMnO_4
- pH dùng để đo nồng độ ion hydro của dung dịch. Giá trị pH được đo bằng máy đo pH (Hanna Instruments HI991300, Romania)

2.3.2. *Đánh tác động của plasma lạnh đến tốc độ tăng trưởng của tảo*

H. pluvialis.

2.3.2.1. *Nuôi thích nghi Haematococcus pluvialis*

Chủng tảo giống được cung cấp bởi Viện Nuôi trồng Thủy sản II đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Trước khi tiến hành thí nghiệm, tảo được nuôi thích nghi trong môi trường RM, với các thành phần dinh dưỡng được trình bày chi tiết trong bảng 2.3. Môi trường nuôi được pha chế theo đúng tỷ lệ quy định, sau đó được hấp khử trùng nhằm đảm bảo điều kiện vô trùng, tạo môi trường tối ưu cho sự phát triển và sinh trưởng của tảo giống.

Chuẩn bị bình erlen 250 ml chứa 90 ml môi trường RM, điều chỉnh pH về mức 7.5 ± 0.5 sau đó thêm 10 ml giống tảo gốc (10 % giống tảo gốc/môi trường RM). Các bình nuôi cấy được duy trì ở điều kiện nuôi ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$ với cường độ chiếu sáng là 2000 lux, chu kỳ chiếu sáng là 12 giờ sáng/12 giờ tối, bên cạnh đó sục khí không khí liên tục (lưu lượng 2 L/phút). Mật độ tảo được đánh giá mỗi ngày bằng buồng đếm tảo dưới kính hiển vi cho đến ngày 7 ngày.

Bảng 2.3. Thành phần môi trường dinh dưỡng RM

Thành phần dinh dưỡng	Nồng độ (mg/L)
NaNO_3	300
$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0,08
$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$	17
$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,1
K_2HPO_4	80
KH_2PO_4	20

NaCl	20
MgSO ₄ .7H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	0,3
CaCl ₂ .2H ₂ O	58,5
EDTA	7,5
MnSO ₄ .H ₂ O	1,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,3
Co(NO ₃).6H ₂ O	0,26

2.3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của plasma lạnh đến quá trình sinh trưởng của tảo *Haematococcus pluvialis*

Phân sinh khối tảo sau quá trình nuôi thích nghi được thu nhận bằng máy li tâm, sau đó tái huyền phân trong môi trường RM để đạt mật độ ban đầu là 4×10^3 CFU/ml. Cho 10 ml giống tảo gốc vào bình erlen 250 ml chứa 90 ml môi trường RM đã được điều chỉnh pH về mức 7.0 ± 0.5 .

Trong nghiên cứu này, các bình nuôi chứa tảo được xử lý plasma, thông qua việc dẫn sản phẩm khí sau phóng điện vào môi trường nuôi cấy theo các nghiệm thức. Hệ thống plasma DBD sử dụng dòng không khí với lưu lượng 2 L/phút, tiến hành xử lý ở các mốc thời gian lần lượt là 0, 5, 10, 15, 20 và 25 phút (tên mẫu lần lượt là T0, T5, T10, T15, T20, T25). Sau khi xử lý, các bình tảo tiếp tục được duy trì trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn với nhiệt độ ổn định ở mức $27 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng 2000 lux theo chu kỳ 12 giờ sáng và 12 giờ tối, đồng thời được sục khí oxy liên tục với lưu lượng 2 L/phút. Quá trình theo dõi được thực hiện định kỳ 3 ngày/lần, tập trung đánh giá các chỉ tiêu tăng trưởng như mật độ tế bào, hình thái, hàm lượng chlorophyll nhằm phân tích ảnh hưởng của xử lý plasma đến sự phát triển của tảo.

a) Phương pháp đánh giá mật độ tế bào

Mật độ tế bào *H. pluvialis* được đánh giá bằng buồng đếm tảo dưới kính hiển vi với độ phóng đại 100x. Trong quá trình đếm tế bào tảo, số lượng ô vuông được chọn để quan sát phụ thuộc vào mật độ tế bào trong buồng đếm, với yêu cầu tối thiểu là 200 tế bào cho mỗi lần đếm. Mật độ tế bào tảo được tính toán theo công thức sau:

Số tế bào/mL = Lượng tế bào trung bình đếm được trong 1 ô x 1000

b) Phương pháp đánh giá hàm lượng sắc tố

Để đánh giá hàm lượng sắc tố, 1 mL sinh khối được ủ với 1ml acetone 90% trong eppendorf 2 mL ở 70 °C trong vòng 5 phút sau đó dùng chày nghiền nhuyễn. Hỗn hợp này sau đó được li tâm 4000 v/p trong 5 phút để thu phần dịch nổi. Quy trình này được lặp lại nhiều lần cho tới khi phần cặn không còn màu. Dịch chiết sau đó được định mức thành 3 mL và tiến hành đo tại OD652, OD665 và OD480. Tổng hàm lượng diệp lục được tính theo các phương trình sau do Ritchie [49]

$$\text{Chla } (\mu\text{g/mL}) = -8.0962 \times \text{OD}_{652} + 16.5169 \times \text{OD}_{665}$$

$$\text{Chlb } (\mu\text{g/mL}) = 27.4405 \times \text{OD}_{652} - 12.1688 \times \text{OD}_{665}$$

$$\text{Total Chl} = \text{Chla} + \text{Chlb}$$

$$\text{Carotene}(\mu\text{g/mL}) = 4 \times \text{OD}_{480}$$

c) Phương pháp quan sát hình thái tế bào *H. pluvialis*

Trong quá trình nghiên cứu, hình thái tế bào của loài tảo *H. pluvialis* được theo dõi định kỳ sau các ngày nuôi cấy bằng kính hiển vi quang học. Việc quan sát được thực hiện với độ phóng đại 100x nhằm ghi nhận sự thay đổi về cấu trúc, hình dạng và đặc điểm hình thái của tế bào qua từng giai đoạn phát triển, từ đó đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến sự biến đổi hình thái của tảo.

2.3.2.3. Đánh giá tác động của plasma lạnh đến sự tích lũy một số hợp chất hữu cơ trong *H. pluvialis*.

Nội dung nghiên cứu tập trung đánh giá tác động của plasma lạnh đến quá trình tích lũy một số hợp chất hữu cơ trong tảo *H. pluvialis* ở giai đoạn cuối pha xanh. Các hợp chất được phân tích bao gồm carbohydrate, lipid và protein, vốn đóng vai trò quan trọng cho quá trình tổng hợp astaxanthin khi tế bào chuyển sang trạng thái nang hóa dưới điều kiện môi trường stress. Việc theo dõi sự biến đổi hàm lượng các hợp chất này giúp làm rõ ảnh hưởng của xử lý plasma lạnh đến tiềm năng sinh tổng hợp astaxanthin của tảo, từ đó góp phần tối ưu hóa quy trình nuôi cấy và khai thác sinh khối giàu giá trị sinh học.

a) Phương pháp xác định trọng lượng khô (Dry cell weight)

Tảo được thu sinh ở ngày 15, hút 4ml dung dịch tảo vào giấy lọc Whatman để thu sinh khối ban đầu (W_t), sau đó đem sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi khối lượng không đổi (W_f). Tiến hành cân và ghi nhận số liệu [61]. Trọng lượng tính theo công thức:

$$B = W_t - W_f$$

Trong đó:

B: Lượng sinh khối khô (g)

W_t : Tổng khối lượng giấy lọc và sinh khối

W_f : Khối lượng giấy lọc

b) Phương pháp xác định hàm lượng carbohydrate

Để đánh giá hàm lượng carbohydrate, 10 mg sinh khối khô được ủ với 0,5 mL axit axetic băng ở 80°C trong 20 phút. Sau đó thêm 10 mL acetone, ly tâm ở 3500 g trong 10 phút. Phần cặn được hòa lại trong 2,5 mL axit trifluoroacetic 4 M và đun sôi trong 4 giờ để giải phóng các đường khử. Hỗn hợp này sau đó được làm nguội và ly tâm ở 10.000 g trong 5 phút. Tiếp theo, 20 μL dịch nổi được trộn với 900 μL hỗn hợp axit sulfuric 98 %: nước: phenol (300:150:3, v/v/w) và đun sôi trong 20 phút trước khi đo mật độ quang học ở bước sóng 490 nm. Glucose được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Hàm lượng carbohydrate tổng được tính toán dựa trên đường chuẩn glucose [50]

c) Phương pháp xác định hàm lượng protein

Để xác định hàm lượng protein, 10 mg sinh khối khô được nghiền nhuyễn và đồng hóa trong NaOH 0,1N đun trong bể ủ nhiệt ở 80°C trong 10 phút. Dịch đồng hóa sau đó được ly tâm 12000 vòng/phút trong 30 phút [51] thu dịch nổi, và protein được kết tủa bằng cách thêm 2 thể tích acetone, ủ lạnh qua đêm, và ly tâm (12000 vòng/phút, 10 phút). Tủa protein được làm khô, hòa tan trong dung dịch NaCl 0,01M, và ly tâm (10000 vòng/phút, 20 phút) để thu dịch trong.

Dịch trong này được sử dụng cho phương pháp định lượng protein Lowry, dựa trên phản ứng màu giữa protein và thuốc thử Folin-Ciocalteu, tạo ra màu xanh dương do sự khử các phức chất kim loại, được đo quang phổ ở bước sóng 620-720nm. Cường độ màu tỉ lệ với hàm lượng protein. Hóa chất sử dụng bao gồm dung dịch A (Natri carbonat 2% trong natri hydroxit 0,1N), dung dịch B (Đồng sulfat 0,5% trong natri

tartrate 1%), dung dịch C (hỗn hợp 49 phần dung dịch A và 1 phần dung dịch B, pha mới trước khi dùng) và thuốc thử Folin-Ciocalteu. Quy trình phân tích protein được tiến hành bằng cách cho 300 µl dung dịch C với 30 µl mẫu, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó thêm 15 µl thuốc thử Folin và tiếp tục ủ 30 phút. Hỗn hợp được pha loãng với 1655 µl nước cất trước khi đo độ hấp thụ quang trong khoảng 620–720 nm. Hàm lượng protein sau đó được tính toán dựa trên đường chuẩn xây dựng từ albumin huyết thanh bò (BSA).

d) Phương pháp xác định hàm lượng lipid

Hàm lượng lipid tổng cộng được xác định bằng phương pháp Bligh và Dyer. 0,05g tế bào tảo khô được sử dụng để chiết xuất lipid bằng hỗn hợp 2ml chloroform và 2ml methanol (1:1), có bổ sung 2ml dung dịch natri clorua 0,88% để tăng hiệu quả. Hỗn hợp được lắc mạnh, ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 3 phút, rồi tách riêng pha methanol/nước và pha chloroform. Pha chloroform sau đó được tinh sạch bằng bột natri sulfat khan và thu vào cốc đã cân. Cuối cùng, dung môi hữu cơ được làm bay hơi bằng khí nitơ, và lipid còn lại được cân để xác định hàm lượng [52]

Hiệu quả tích lũy astaxanthin sau quá trình nuôi cấy kết hợp plasma.

Sau quá trình tăng sinh (15 ngày), mật độ ở các bình nuôi cấy các mẫu được đồng nhất mật độ. Các mẫu tảo đã đồng nhất mật độ sau đó được cảm ứng tích lũy astaxanthin thông qua chiếu sáng cường độ cao (10 000 lux). Trong suốt quá trình cảm ứng stress sự thay đổi hình thái của các tế bào vi tảo được theo dõi bằng kính hiển vi quang học. Nhằm ghi nhận các thay đổi về hình thái tế bào, bao gồm sự biến đổi kích thước, hình dạng, và sự xuất hiện của các cấu trúc tế bào đặc trưng. Hiệu quả tích lũy astaxanthin của các tế bào nuôi cấy từ môi trường hoạt hóa plasma ở các thời gian khác nhau được đánh giá. Cụ thể sau quá trình cảm ứng stress, hàm lượng astaxanthin nội bào được đánh giá bằng phương pháp của Gong và cộng sự (2024) [73]. Sinh khối tảo sau ly tâm được đồng hóa bằng dung môi Dimethyl sulfoxide (DMSO), dịch đồng hóa sau đó được đo ở bước sóng 530 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis (Shimadzu, Nhật Bản). Hàm lượng astaxanthin được tính toán dựa trên đường chuẩn xây dựng từ astaxanthin thương mại (Sigma, Đức) theo công thức (1) và (2).

$$(1) \quad C_a(\text{mg/L}) = \frac{A_{530} - 0,0967}{0,1023}$$

(2)

$$\text{Hàm lượng astaxanthin trong tế bào (mg}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}_{\text{sinh khối}}) = \frac{\text{Nồng độ astaxanthin (mg/L)}}{\text{Nồng độ sinh khối (g/L)}}$$

Trong đó: A_{530} là độ hấp thụ của chất chiết xuất ở bước sóng 530nm.

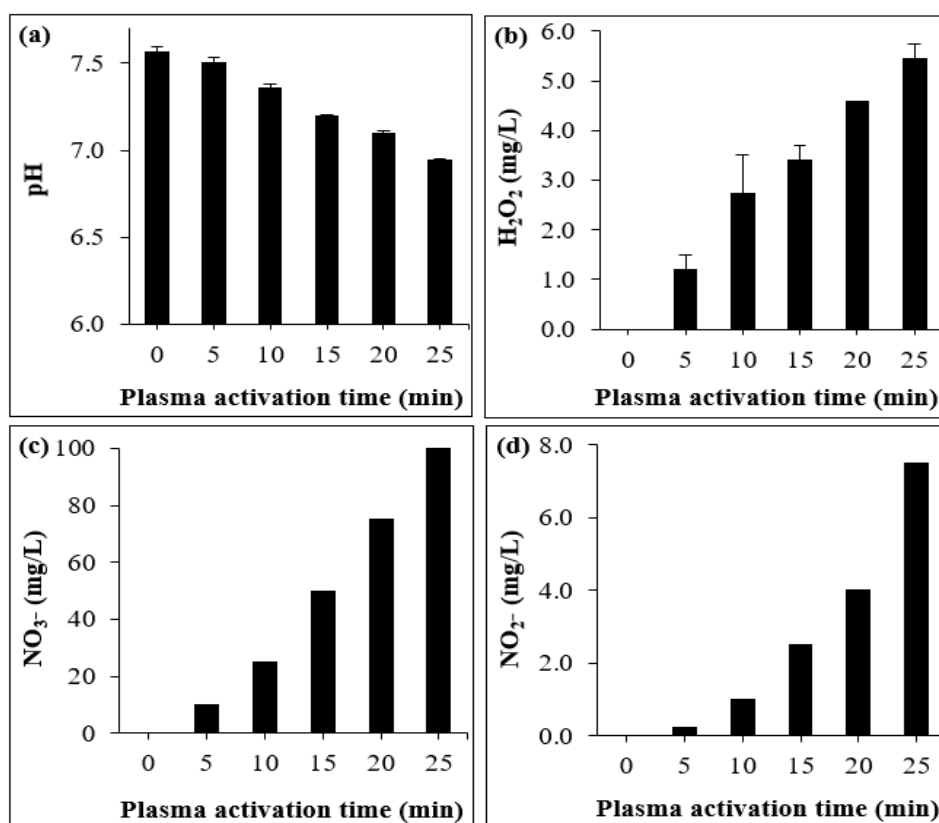
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý và xác định ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2013, phần mềm xử lý Minitab. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định thông qua phân tích ANOVA 1 yếu tố và kiểm định Tukey ở mức $p < 0,05$ (p: Probability)

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tính chất hóa lý của môi trường được hoạt hóa plasma

Trong nghiên cứu này, sự biến đổi một số đặc tính lý hóa của môi trường sau khi được xử lý bằng plasma lạnh đã được đánh giá thông qua các chỉ tiêu gồm: pH, NO_2^- , NO_3^- và H_2O_2 .



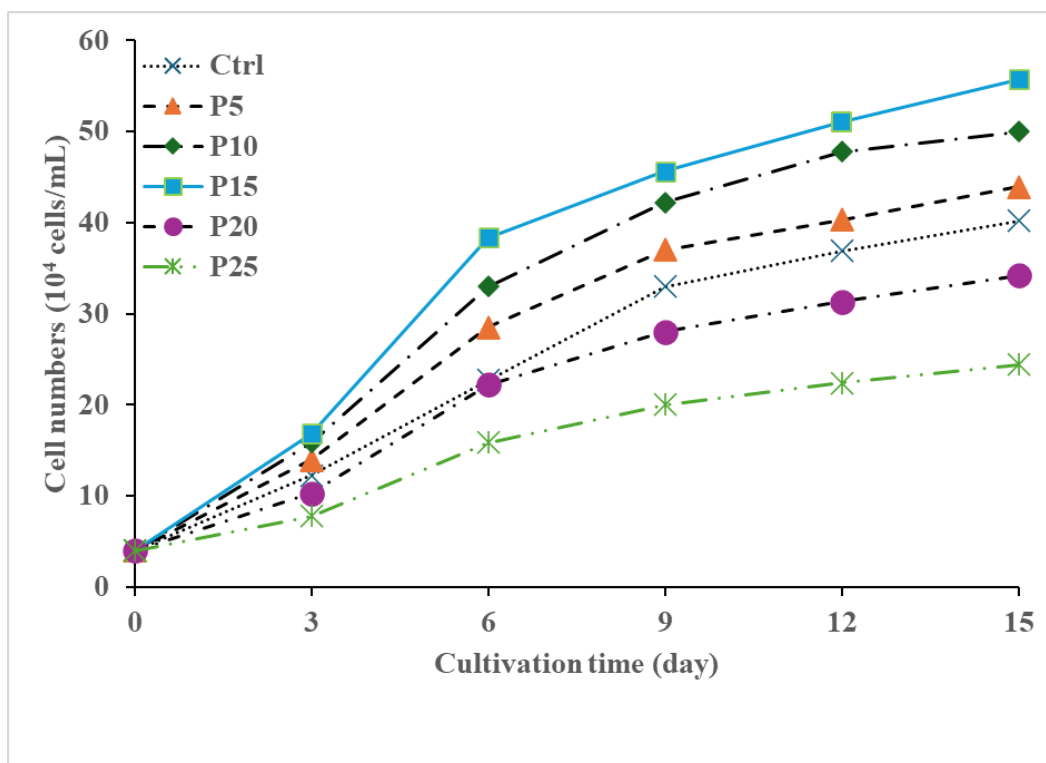
Hình 3.1. Sự thay đổi của (a) pH, (b) H_2O_2 , (c) NO_3^- và (d) NO_2^- của môi trường nuôi cấy RM sau khi hoạt hóa plasma

Trước hết, độ pH của môi trường hoạt hóa plasma (PAW) cho thấy xu hướng giảm dần theo thời gian xử lý. Trong 5 phút đầu, pH chỉ giảm nhẹ, nhưng sau đó suy giảm rõ rệt, đạt khoảng 6,9 sau 25 phút xử lý, tương ứng mức giảm khoảng 10% so với giá trị ban đầu ($\approx 7,5$). Sự suy giảm này phản ánh quá trình hình thành các acid vô cơ như acid nitric (HNO_3) và acid nitrous (HNO_2), được tạo ra từ phản ứng oxy hóa – khử giữa các loài ROS và RNS sinh ra trong plasma với phân tử nước. Các acid này làm tăng nồng độ ion H^+ trong dung dịch, từ đó làm giảm pH. Mặc dù có sự suy giảm, giá trị pH sau xử lý vẫn nằm trong khoảng thuận lợi cho sự phát triển của vi tảo (7,0 – 7,5), cho thấy tiềm năng ứng dụng PAW trong nuôi cấy sinh học mà không gây ảnh hưởng tiêu cực.

Song song với biến đổi pH, nồng độ các ion nitrogen phản ứng cũng thay đổi đáng kể. NO_3^- có tốc độ tích lũy nhanh nhất, đạt khoảng 110 ppm sau 25 phút xử lý, trong khi NO_2^- chỉ đạt khoảng 7,5 ppm, điều này cho thấy quá trình oxy hóa NO_2^- thành NO_3^- diễn ra trong môi trường PAW. NO_2^- vốn là hợp chất kém ổn định, dễ bị oxy hóa trong điều kiện giàu chất oxy hóa, đặc biệt khi có mặt H_2O_2 , dẫn đến sự chuyển hóa nhanh chóng sang dạng NO_3^- có độ bền cao hơn. Sự hình thành HNO_3 và HNO_2 không chỉ góp phần làm giảm pH mà còn phản ánh hiệu quả chuyển hóa nitrite thành nitrate trong hệ thống plasma lạnh [74].

Bên cạnh sự biến đổi của các thông số NO_3^- và NO_2^- , hàm lượng H_2O_2 trong môi trường cũng ghi nhận xu hướng tăng dần theo thời gian xử lý, đạt khoảng 5,5 ppm sau 25 phút. H_2O_2 được hình thành thông qua các phản ứng kích hoạt bởi plasma, bao gồm quá trình tái tổ hợp gốc hydroxyl và các tương tác giữa các phân tử oxy. Sự hiện diện của H_2O_2 không chỉ góp phần điều chỉnh độ pH thông qua việc tạo ra proton (H^+), mà còn đóng vai trò xúc tác trong chuỗi phản ứng oxy hóa nitrite. Nhờ khả năng phản ứng mạnh với các hợp chất kém bền như NO_2^- , H_2O_2 thúc đẩy quá trình chuyển hóa sang dạng nitrate ổn định hơn, từ đó làm giảm nồng độ nitrite trong dung dịch. Việc H_2O_2 gia tăng đồng thời với sự tích lũy NO_3^- và suy giảm pH cho thấy vai trò trung tâm của nó trong việc duy trì trạng thái oxy hóa cao của môi trường hoạt hóa plasma.

3.2. Ảnh hưởng của plasma đến quá trình sinh trưởng của tảo *Haematococcus pluvialis*

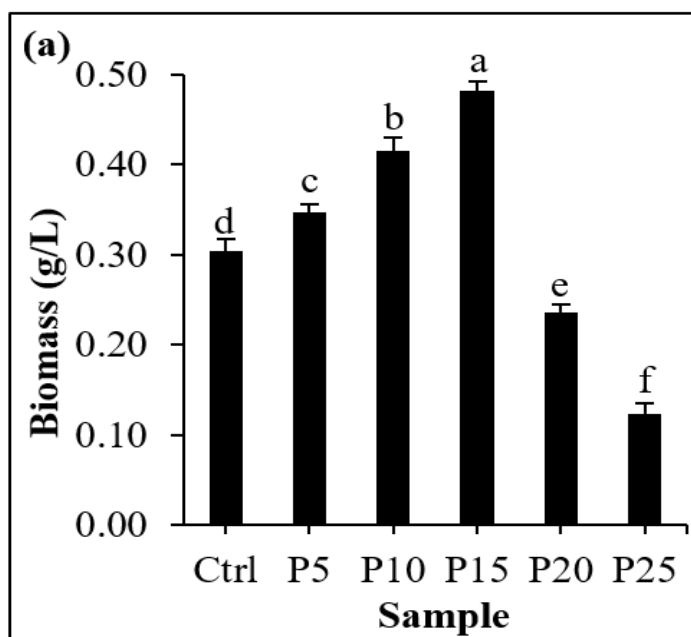


Hình 3.2. Mật độ tế bào *H. pluvialis* trong 15 ngày nuôi cấy trong môi trường RM hoạt hóa plasma

Biểu đồ mật độ tế bào cho thấy trong 6 ngày đầu tiên của quá trình nuôi cấy, các nhóm xử lý plasma (P5–P15) có tốc độ tăng trưởng rõ rệt, thể hiện qua độ dốc lớn của đường cong tăng trưởng. Giai đoạn này phản ánh sự kích hoạt mạnh mẽ của các tín hiệu phân chia tế bào, chủ yếu thông qua các gốc oxy hóa hoạt tính như NO_2^- , NO_3^- và H_2O_2 – những sản phẩm phụ được tạo ra sau xử lý plasma lạnh. Các phân tử này đóng vai trò như tín hiệu thứ cấp, kích thích biểu hiện các gen liên quan đến chu kỳ tế bào, đặc biệt là các gen mã hóa cyclin D/E và kinase phụ thuộc cyclin (CDKs), từ đó thúc đẩy quá trình nhân đôi DNA và tổng hợp protein cần thiết cho nguyên phân [82]

Tuy nhiên, theo nguyên lý hoạt động của plasma lạnh, các gốc oxy hóa này có tính không ổn định và thường giảm dần sau khoảng 96 giờ do bị phân hủy bởi enzyme nội bào hoặc bị chuyển hóa thành các dạng không hoạt tính. Sự suy giảm này dẫn đến việc giảm kích thích trực tiếp từ môi trường ngoài, buộc tế bào phải chuyển sang cơ chế điều hòa nội sinh để duy trì tốc độ phân chia.

Từ ngày thứ 6 trở đi, biểu đồ cho thấy tốc độ tăng trưởng bắt đầu đồng đều hơn, phản ánh sự chuyển đổi sang trạng thái tự điều hòa nội bào. Trong giai đoạn này, tế bào không còn phụ thuộc vào tín hiệu ngoại sinh mà bắt đầu kích hoạt các đường truyền tín hiệu nội bào như PI3K/Akt, MAPK/ERK và mTOR, giúp duy trì biểu hiện ổn định của cyclin và CDKs, đồng thời kiểm soát quá trình tổng hợp protein và năng lượng. Đặc biệt, các ROS nội sinh được duy trì ở mức thấp thông qua hoạt động của các enzyme chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase và glutathione peroxidase, giúp bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa kéo dài. Nếu không được kiểm soát, ROS tích lũy quá mức có thể gây peroxid hóa lipid màng, làm rối loạn chức năng ty thể, phá vỡ cân bằng nội môi và kích hoạt các con đường chết tế bào theo chương trình như apoptosis hoặc necrosis, từ đó làm giảm mật độ tế bào và hiệu suất sinh học tổng thể [83]. Sự chuyển đổi từ kích thích ngoại sinh sang điều hòa nội sinh là một minh chứng cho khả năng thích nghi sinh học của tế bào, cho phép chúng duy trì tốc độ phân chia ổn định và hiệu quả trong điều kiện nuôi cấy kéo dài.

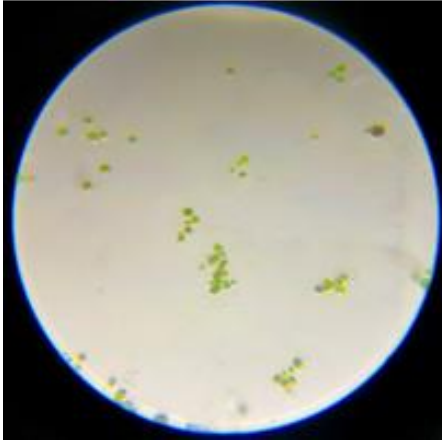


Hình 3.3. Thay đổi tích lũy sinh khối khô của *H. pluvialis* sau 15 ngày nuôi cấy trong môi trường RM được hoạt hóa plasma

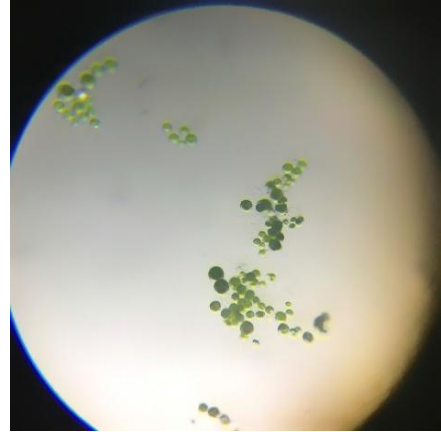
Biểu đồ sinh khối tảo cũng phản ánh xu hướng tương tự: sinh khối tăng dần từ 0 đến 15 phút xử lý, đạt giá trị cao nhất tại 15 phút (0.47 g/L), sau đó giảm mạnh ở các thời điểm 20 và 25 phút. Điều này cho thấy rằng thời gian xử lý plasma ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tích lũy sinh khối, đồng thời phản ánh trạng thái phân chia tế bào tích cực trong giai đoạn đầu và suy giảm khi vượt ngưỡng chịu đựng.



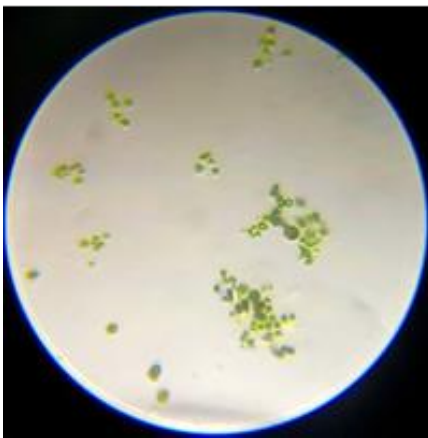
Hình 3.4. Tảo được nuôi cấy giai đoạn tích lũy sinh khối



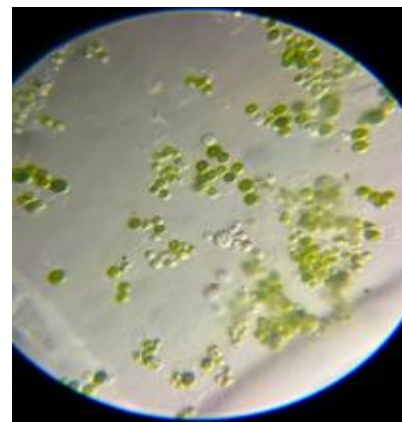
(A) Đối chứng



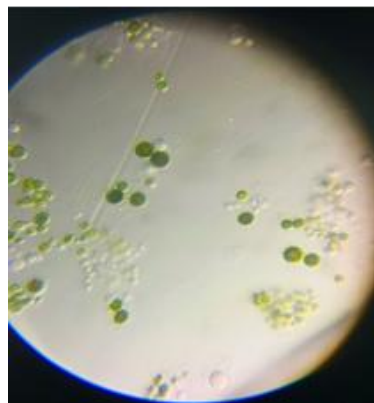
(B) T5



(C) T10



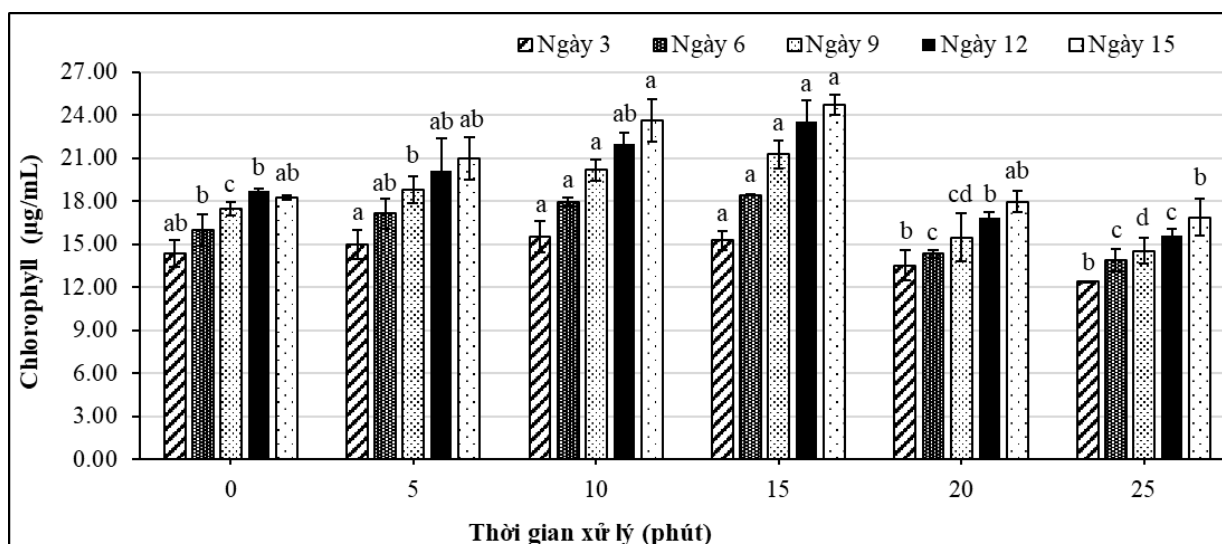
(D) T15



(E) T20

Hình 3.5. Hình thái tế bào sau 5 ngày nuôi cấy ở các mốc thời gian khác nhau với T5 (5 phút), T10 (10 phút), T15 (15 phút), T20 (20 phút)

Quan sát hình ảnh hiển vi cho thấy mật độ và màu sắc của tế bào thay đổi theo thời gian xử lý. Mẫu đối chứng (A) có màu xanh trung bình, trong khi mẫu T5 và T10 (B, C) có màu xanh đậm hơn, phản ánh sự gia tăng sắc tố quang hợp như chlorophyll-a và carotenoid. Mẫu T15 (D) duy trì sắc tố ở mức cao, phù hợp với đỉnh sinh khối, còn mẫu T20 (E) cho thấy sự phân tán và giảm sắc tố, biểu hiện của stress oxy hóa và tổn thương cấu trúc tế bào. Sự thay đổi sắc tố và mật độ tế bào trong vi tảo dưới tác động của plasma không chỉ phản ánh trạng thái sinh lý tức thời mà còn là kết quả của các chuỗi tín hiệu nội bào, trong đó các loại phản ứng oxy hóa (ROS) và phản ứng nitrogen hóa (RNS) đóng vai trò trung tâm. ROS như superoxide (O_2^-) và hydrogen peroxide (H_2O_2) được hình thành chủ yếu thông qua quá trình truyền electron trong chuỗi quang hợp và hô hấp tế bào. Năm 2017, Mittler và cộng sự cũng đã chứng minh ROS như superoxide và hydrogen peroxide có vai trò như tín hiệu nội bào kích hoạt phân chia tế bào ở mức độ thấp, nhưng gây tổn thương màng và DNA khi tích lũy quá mức. Ở nồng độ thấp, các ROS này hoạt động như tín hiệu điều hòa, kích hoạt các protein cảm biến oxy hóa như thioredoxin và glutaredoxin, từ đó dẫn đến sự hoạt hóa các yếu tố phiên mã nhạy cảm với trạng thái khử-oxy hóa như APX, WRKY và NAC. Những yếu tố này điều phối biểu hiện gen liên quan đến chu kỳ tế bào, tổng hợp enzyme và điều hòa chuyển hóa năng lượng [84]. Trong khi đó, RNS như nitric oxide có thể điều hòa quá trình hấp thu dinh dưỡng và tăng cường hoạt động enzyme liên quan đến sinh trưởng (Delledonne, 2001). Bên cạnh đó, plasma có thể phân giải các chất hữu cơ phức tạp thành các chất dinh dưỡng dễ hấp thụ hơn, thúc đẩy sự phát triển của tảo (Pankaj et al., 2018). Do đó, thời gian xử lý plasma tối ưu (khoảng 10–15 phút) có thể tạo ra sự cân bằng giữa tín hiệu ROS và RNS, thúc đẩy sinh trưởng mà không gây tổn hại tế bào.



Hình 3.6. Sự thay đổi hàm lượng chlorophyll khi xử lý plasma ở các mốc thời gian khác nhau

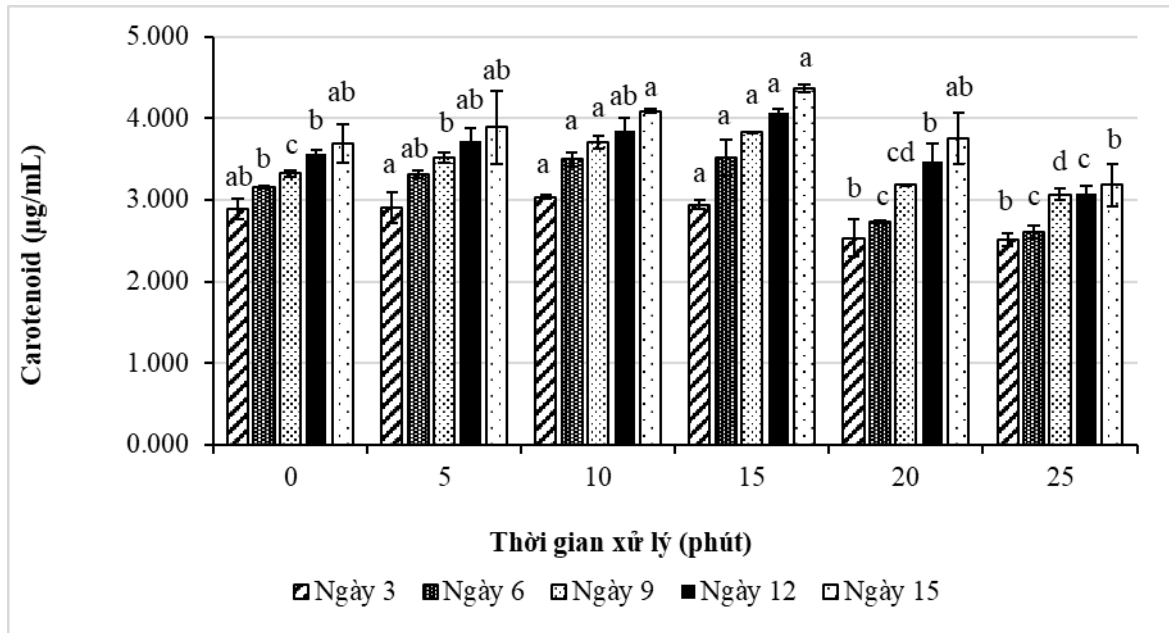
Biểu đồ hàm lượng chlorophyll cho thấy xu hướng biến đổi rõ rệt theo thời gian xử lý plasma và ngày nuôi cấy, phản ánh sự điều chỉnh phức tạp của hệ thống quang hợp nội bào trước tác động vật lý từ môi trường. Trong giai đoạn xử lý ngắn (5–15 phút), nồng độ chlorophyll tăng đáng kể, đặc biệt vào khoảng ngày 15, cho thấy tế bào tảo đã kích hoạt cơ chế tăng cường tổng hợp sắc tố để thích nghi với stress nhẹ từ plasma. Chlorophyll-a, sắc tố chính trong hệ thống quang hợp, được tổng hợp thông qua chuỗi phản ứng enzyme phức tạp bắt đầu từ glutamate, với sự tham gia của các enzyme như glutamyl-tRNA reductase (GluTR), Mg-chelatase, và protochlorophyllide oxidoreductase (POR). Việc tăng biểu hiện các enzyme này thường được điều hòa bởi các yếu tố phiên mã nhạy cảm với ánh sáng và trạng thái oxy hóa-khử, như HY5 và GUN5, vốn có thể bị kích hoạt bởi tín hiệu plasma ở cường độ vừa phải [77].

Trong điều kiện xử lý plasma ở thời gian ngắn, tế bào tảo có xu hướng tăng cường biểu hiện gen liên quan đến hệ thống quang hợp, bao gồm các protein LHCI và LHCII, nhằm mở rộng khả năng hấp thụ ánh sáng và tối ưu hóa hiệu suất chuyển hóa photon thành năng lượng hóa học. Sự gia tăng chlorophyll trong giai đoạn này không chỉ phục vụ chức năng hấp thụ ánh sáng mà còn đóng vai trò trong việc duy trì cấu trúc màng thylakoid, nơi diễn ra các phản ứng quang hóa. Việc duy trì hàm lượng chlorophyll cao giúp ổn định tổ hợp PSI và PSII, từ đó đảm bảo dòng electron trong chuỗi truyền điện

tử không bị gián đoạn, góp phần duy trì sản xuất ATP và NADPH cần thiết cho các phản ứng pha tối của quang hợp.

Tuy nhiên, khi thời gian xử lý plasma vượt quá ngưỡng tối ưu (trên 15 phút), hàm lượng chlorophyll giảm mạnh, phản ánh trạng thái stress oxy hóa nghiêm trọng. Trong giai đoạn này, các ROS như singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) và hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) có thể gây oxy hóa trực tiếp lên phân tử chlorophyll, đặc biệt là tại vòng tetrapyrrole, dẫn đến sự phân hủy sắc tố và mất hoạt tính quang học. Đồng thời, các ROS cũng làm tổn thương màng thylakoid, gây rò rỉ ion và phá vỡ tổ hợp protein quang hợp, dẫn đến sự bất hoạt của PSI/PSII và giảm hiệu suất chuyển hóa năng lượng. Để đáp ứng với tình trạng này, tế bào tảo có thể kích hoạt cơ chế bảo vệ bằng cách giảm tổng hợp chlorophyll thông qua ức chế biểu hiện gen liên quan đến biosynthesis, đồng thời tăng cường biểu hiện các enzyme chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và ascorbate peroxidase (APX), nhằm trung hòa ROS và bảo vệ cấu trúc nội bào [85].

Sự biến đổi hàm lượng chlorophyll dưới tác động của plasma là kết quả của sự điều hòa đa tầng, bao gồm điều chỉnh biểu hiện gen, hoạt hóa enzyme, tái cấu trúc tổ hợp quang hợp và cơ chế bảo vệ chống oxy hóa. Việc tối ưu hóa thời gian xử lý plasma là yếu tố then chốt để duy trì hàm lượng chlorophyll ở mức sinh lý phù hợp, từ đó đảm bảo hiệu suất quang hợp và khả năng sinh trưởng của vi tảo trong điều kiện nuôi cấy có kiểm soát.



Hình 3.7. Sự thay đổi hàm lượng carotenoid khi xử lý plasma ở các mốc thời gian khác nhau.

Biểu đồ hàm lượng carotenoid cho thấy xu hướng biến đổi rõ rệt theo thời gian xử lý plasma, với mức tăng ổn định từ 0 đến 15 phút, sau đó giảm đáng kể ở các thời điểm xử lý kéo dài hơn. Sự biến động này phản ánh vai trò sinh lý quan trọng của carotenoid trong điều hòa và bảo vệ hệ thống quang hợp của vi tảo dưới điều kiện stress vật lý. Carotenoid là nhóm sắc tố phụ, bao gồm các xanthophyll như lutein, zeaxanthin và violaxanthin, có cấu trúc polyene cho phép chúng hấp thụ năng lượng dư thừa và trung hòa các gốc tự do sinh ra trong quá trình quang hợp. Dưới tác động của plasma ở mức độ vừa phải, tế bào tảo kích hoạt cơ chế bảo vệ quang học thông qua quá trình quang làm nguội không quang hóa (non-photochemical quenching, NPQ), trong đó các xanthophyll đóng vai trò trung tâm trong việc phân tán năng lượng dư thừa dưới dạng nhiệt, ngăn ngừa hiện tượng quá kích thích hệ thống anten quang hợp và tổn thương đến tổ hợp PSII [78].

Cơ chế điều hòa sinh tổng hợp carotenoid trong vi tảo được kiểm soát bởi các yếu tố phiên mã nhạy cảm với ánh sáng và stress oxy hóa, chẳng hạn như CrtB, CrtP và CrtR-b, vốn điều phối biểu hiện các enzyme như phytoene synthase và lycopene cyclase trong chu trình carotenogenesis. Dưới điều kiện plasma, các tín hiệu ROS ở mức độ thấp có thể kích hoạt các yếu tố này, từ đó thúc đẩy tổng hợp carotenoid nhằm bảo vệ

cấu trúc thylakoid và duy trì hoạt động quang hợp. Sự gia tăng carotenoid trong giai đoạn xử lý tối ưu không chỉ phản ánh trạng thái quang hợp tích cực mà còn là chỉ dấu cho khả năng chống chịu sinh lý của tế bào, cho thấy vi tảo đang ở trạng thái cân bằng giữa hấp thụ ánh sáng và kiểm soát stress nội bào. Mối liên hệ giữa carotenoid và chlorophyll thể hiện rõ qua sự đồng biến động của hai sắc tố trong giai đoạn sinh trưởng mạnh. Trong khi chlorophyll đảm nhiệm vai trò hấp thụ photon và truyền năng lượng đến trung tâm phản ứng, carotenoid đóng vai trò bảo vệ chlorophyll khỏi quá trình quang oxy hóa bằng cách loại bỏ các trạng thái kích thích nguy hiểm như singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) và triplet chlorophyll. Ngoài ra, carotenoid còn tham gia vào việc ổn định cấu trúc của tổ hợp protein–sắc tố trong màng thylakoid, đặc biệt là các phức hợp anten LHCII, giúp duy trì sự toàn vẹn của hệ thống truyền electron trong chuỗi quang hóa [86].

Khi thời gian xử lý plasma vượt ngưỡng tối ưu, stress oxy hóa tăng cao làm suy giảm khả năng tổng hợp carotenoid, đồng thời gây tổn thương trực tiếp đến các phân tử carotenoid đã tồn tại trong màng thylakoid. Các gốc tự do mạnh như hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) có thể phá vỡ liên kết đôi liên hợp trong chuỗi polyene của carotenoid, làm mất khả năng hấp thụ ánh sáng và trung hòa ROS. Sự suy giảm này kéo theo mất cân bằng năng lượng trong hệ thống quang hợp, dẫn đến rối loạn chức năng PSII và giảm hiệu suất chuyển hóa năng lượng. Việc thiếu hụt carotenoid cũng làm tăng nguy cơ phân hủy chlorophyll do không được bảo vệ, từ đó làm giảm hiệu suất quang hợp và ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng của tế bào.

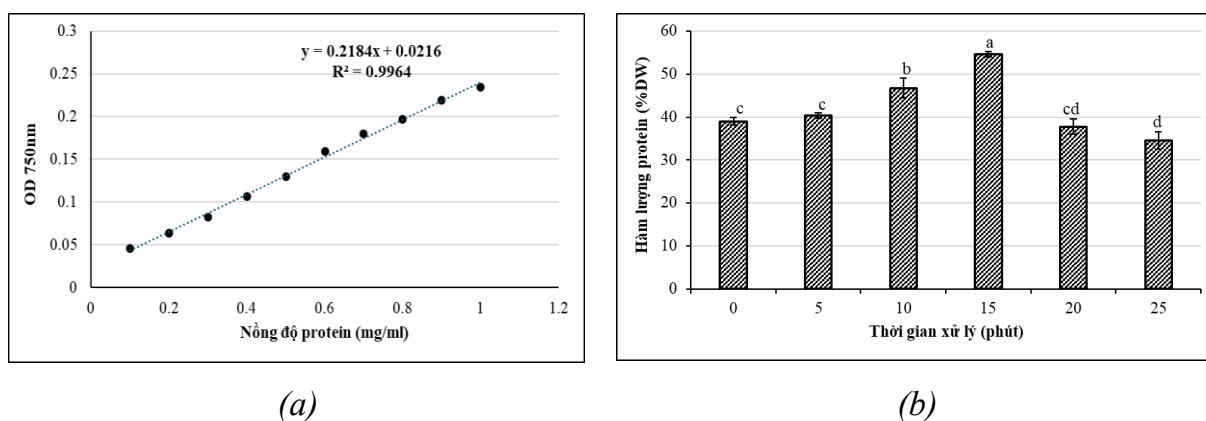
Carotenoid không chỉ là sắc tố phụ hỗ trợ hấp thụ ánh sáng mà còn là yếu tố điều hòa thiết yếu trong hệ thống quang hợp của vi tảo. Sự biến động hàm lượng carotenoid dưới tác động của plasma phản ánh khả năng thích nghi và điều chỉnh nội bào của tế bào tảo trước stress vật lý, đồng thời cho thấy vai trò trung tâm của carotenoid trong việc duy trì hiệu suất quang hợp và bảo vệ cấu trúc tế bào. Việc tối ưu hóa thời gian xử lý plasma là điều kiện tiên quyết để khai thác hiệu quả sinh học của vi tảo mà không làm gián đoạn hệ thống sắc tố quang hợp.

3.3. Ảnh hưởng của plasma đến sự tích lũy các hợp chất hữu cơ

Bên cạnh việc thúc đẩy phân chia tế bào, xử lý plasma còn tạo ra những biến đổi sâu rộng trong hệ thống chuyển hóa các hợp chất hữu cơ nội bào, đặc biệt là sắc tố quang hợp, carbohydrate, protein và lipid. Sắc tố quang hợp như chlorophyll và carotenoid không chỉ đóng vai trò hấp thụ ánh sáng mà còn là yếu tố quyết định hiệu suất cố định CO₂ thông qua chu trình Calvin. Các sắc tố này được cấu thành từ nguyên tử nitrogen và chịu ảnh hưởng trực tiếp bởi tín hiệu ROS, đặc biệt là H₂O₂ và NO vốn có khả năng điều hòa biểu hiện gen mã hóa enzyme quang hợp như Rubisco và PGK.

Sự gia tăng sắc tố quang hợp dẫn đến hiệu quả cố định CO₂ cao hơn, từ đó thúc đẩy tổng hợp carbohydrate – hợp chất hữu cơ nền tảng cung cấp sườn carbon cho hầu hết các đại phân tử khác. Carbohydrate không chỉ là nguồn năng lượng sơ cấp mà còn là tiền chất cho các chu trình chuyển hóa thứ cấp như tổng hợp acid béo và amino acid. Sản phẩm trung gian như pyruvate và acetyl-CoA từ glycolysis có thể được chuyển hóa thành acid béo thông qua chu trình tổng hợp lipid, hoặc amin hóa để tạo thành amino acid, góp phần vào tổng hợp protein nội bào.

3.3.1. Protein



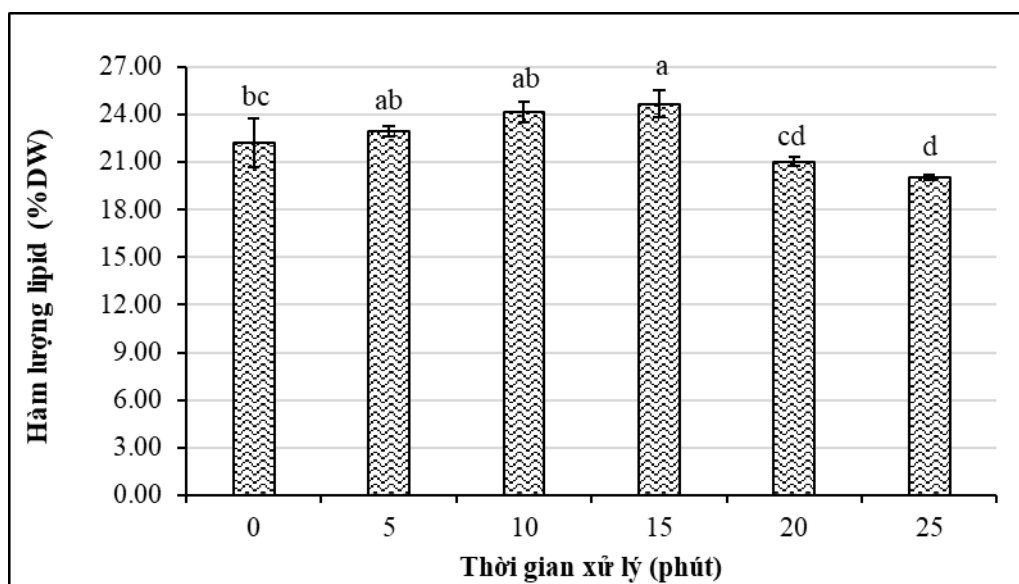
Hình 3.8. (a) Đường chuẩn protein , (b) Ảnh hưởng của thời gian xử lý plasma đến hàm lượng protein

Biểu đồ hàm lượng protein cho thấy xu hướng tăng rõ rệt từ 0 đến 15 phút xử lý plasma, phản ánh sự kích hoạt mạnh mẽ của các quá trình sinh tổng hợp protein nội bào. Protein trong vi tảo không chỉ là thành phần cấu trúc mà còn đóng vai trò trung tâm trong điều hòa enzyme, tín hiệu nội bào và phản ứng trao đổi chất. Về mặt hóa

học, quá trình tổng hợp protein bắt đầu từ sự hoạt hóa amino acid thông qua phản ứng tạo aminoacyl-tRNA, sau đó diễn ra quá trình kéo dài chuỗi polypeptide tại ribosome. Dưới tác động của plasma ở mức độ vừa phải, các tín hiệu ROS như H_2O_2 có thể kích hoạt các yếu tố phiên mã nhạy cảm với trạng thái oxy hóa-khử, chẳng hạn như bZIP và MYB, từ đó thúc đẩy biểu hiện gen mã hóa enzyme phiên mã RNA polymerase II và các ribosomal protein [87].

Ngoài ra, các ROS ở nồng độ thấp còn có khả năng kích hoạt các kinase phụ thuộc tín hiệu như MAPK và CDPK, làm tăng tốc độ phiên mã và dịch mã protein. Một số enzyme quan trọng như glutamine synthetase (GS) và nitrate reductase (NR) cũng được điều hòa bởi các tín hiệu này, góp phần vào quá trình đồng hóa nitơ và tổng hợp amino acid. Khi thời gian xử lý plasma vượt ngưỡng tối ưu, ROS tích lũy gây tổn thương đến cấu trúc protein thông qua quá trình oxy hóa nhóm sulfhydryl (-SH) và carbonyl hóa chuỗi bên dẫn đến biến tính protein và mất hoạt tính enzyme. Điều này làm gián đoạn quá trình tổng hợp protein mới và kích hoạt các con đường phân hủy như ubiquitin–proteasome hoặc autophagy, phản ánh trạng thái suy thoái sinh lý của tế bào.

3.3.2. Lipid



Hình 3.9. Ảnh hưởng của plasma đến hàm lượng lipid

Biểu đồ hàm lượng lipid cho thấy sự biến động tương tự, với mức tăng mạnh từ 0 đến 15 phút xử lý plasma, đạt đỉnh tại thời điểm này trước khi suy giảm ở các thời điểm xử lý kéo dài hơn. Lipid trong vi tảo chủ yếu tồn tại dưới dạng triacylglycerol (TAG), phospholipid và glycolipid, đóng vai trò quan trọng trong cấu trúc màng, dự trữ năng lượng và điều hòa phản ứng sinh lý. Về mặt hóa học, quá trình sinh tổng hợp lipid bắt đầu từ acetyl-CoA, thông qua chuỗi phản ứng của enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACCase), malonyl-CoA ACP transacylase, và fatty acid synthase (FAS), tạo thành acid béo mạch dài. Dưới tác động của plasma, ROS ở mức độ thấp có thể kích hoạt các yếu tố phiên mã như WRINKLED1 (WRI1) và ABI4, từ đó thúc đẩy biểu hiện gen liên quan đến chu trình tổng hợp acid béo và ester hóa TAG [89, 90].

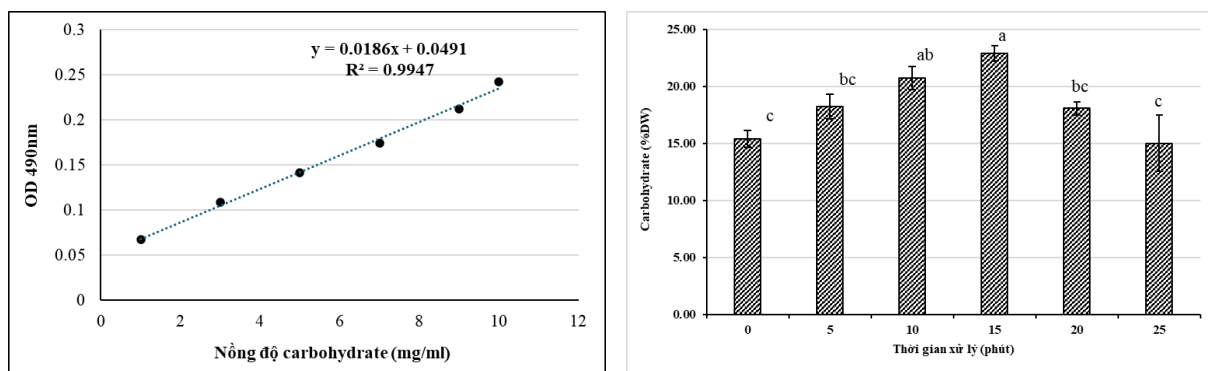
Đặc biệt, stress plasma có thể làm thay đổi dòng chuyển hóa carbon nội bào, ưu tiên hướng carbon từ chu trình Calvin sang chu trình tổng hợp lipid thông qua tăng biểu hiện của pyruvate dehydrogenase (PDH) và glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT). Điều này phản ánh sự tái phân bố năng lượng và vật chất trong tế bào nhằm tích lũy lipid như một cơ chế bảo vệ chống stress. Tuy nhiên, khi thời gian xử lý vượt ngưỡng, ROS tích lũy gây peroxid hóa lipid màng, đặc biệt là các acid béo không bão hòa, dẫn đến mất tính toàn vẹn màng và rò rỉ ion. Các enzyme chuyển hóa lipid như DGAT và PDAT cũng bị bất hoạt do biến đổi cấu trúc, làm giảm hiệu suất tổng hợp lipid và ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của tế bào.

Từ các kết quả phân tích hàm lượng protein và lipid dưới tác động của plasma, có thể kết luận rằng thời gian xử lý plasma là yếu tố quyết định đến hiệu quả chuyển hóa nội bào của vi tảo. Trong giai đoạn xử lý tối ưu (khoảng 15 phút), các tín hiệu oxy hóa ở mức độ vừa phải đã kích hoạt mạnh mẽ các chuỗi phản ứng sinh hóa, thúc đẩy biểu hiện gen và hoạt động enzyme liên quan đến tổng hợp protein và acid béo. Điều này phản ánh trạng thái sinh trưởng tích cực, với sự gia tăng rõ rệt các hợp chất hữu cơ nền tảng cho cấu trúc và chức năng tế bào.

Về mặt hóa học, quá trình tổng hợp protein và lipid đều phụ thuộc vào sự ổn định của hệ thống enzyme và cân bằng oxy hóa–khử nội bào. Plasma ở mức độ kiểm soát đã đóng vai trò như một tác nhân kích thích sinh học, điều hòa các chu trình chuyển hóa nitrogen và carbon thông qua các cơ chế cảm biến ROS. Tuy nhiên, khi thời gian xử lý

vượt ngưỡng, sự tích lũy ROS gây tổn thương đến cấu trúc phân tử, làm biến tính protein, peroxid hóa lipid và rối loạn hoạt động enzyme, dẫn đến suy giảm hiệu suất sinh học tổng thể. Do đó, việc tối ưu hóa thời gian xử lý plasma không chỉ giúp nâng cao hàm lượng protein và lipid mà còn đảm bảo tính toàn vẹn hóa học của các phân tử chức năng trong tế bào.

3.3.3. Carbohydrate



(a)

(b)

Hình 3.10. (a) Đường chuẩn carbohydrate, (b) Ảnh hưởng của thời gian xử lý plasma đến hàm lượng carbohydrate

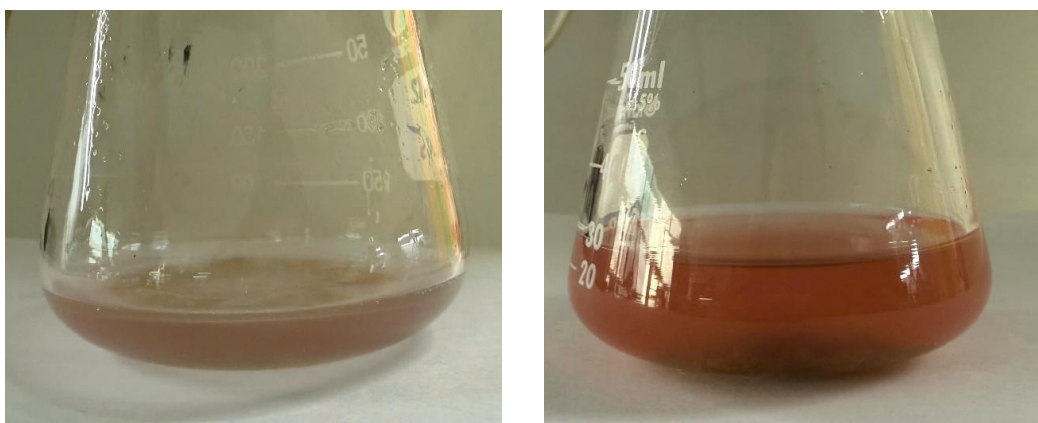
Biểu đồ hàm lượng carbohydrate cho thấy xu hướng tăng rõ rệt từ 0 đến 15 phút xử lý plasma, phản ánh sự kích hoạt mạnh mẽ của các chu trình chuyển hóa carbon trong tế bào *Haematococcus pluvialis*. Carbohydrate là hợp chất hữu cơ nền tảng, đóng vai trò là nguồn carbon sơ cấp cho các phản ứng sinh tổng hợp và là chất dự trữ năng lượng quan trọng trong điều kiện stress. Dưới tác động của plasma ở mức độ vừa phải, tế bào tảo kích hoạt chu trình Calvin trong pha tối của quang hợp, dẫn đến sự tích lũy carbohydrate dưới dạng polysaccharide như tinh bột (amylose, amylopectin) và cellulose. Quá trình này được điều hòa bởi các enzyme như ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), phosphoglycerate kinase (PGK), và glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), vốn có hoạt tính cao trong điều kiện ánh sáng mạnh và stress nhẹ [79]. Về mặt hóa học, carbohydrate tích lũy trong tế bào không chỉ đóng vai trò là nguồn năng lượng thông qua quá trình phân giải trong glycolysis, mà còn là tiền chất cho các chu trình chuyển hóa thứ cấp. Sản phẩm trung gian như pyruvate và acetyl-CoA từ glycolysis có thể được chuyển hóa thành acid béo thông

qua chu trình tổng hợp lipid, hoặc tham gia vào chu trình Krebs để cung cấp năng lượng dưới dạng ATP. Đồng thời, các đường đơn như glucose và fructose có thể được amin hóa để tạo thành amino acid thông qua các phản ứng transamination, từ đó góp phần vào tổng hợp protein nội bào. Sự liên kết giữa carbohydrate, lipid và protein trong *H. pluvialis* thể hiện rõ qua việc carbohydrate đóng vai trò trung gian chuyển hóa, là điểm khởi đầu cho các nhánh tổng hợp sinh học khác trong tế bào.

Khi thời gian xử lý plasma vượt ngưỡng tối ưu (>15 phút), stress oxy hóa gia tăng làm rối loạn cân bằng nội bào, ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động của các enzyme chuyển hóa carbohydrate. Các gốc tự do như hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) và singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) có thể oxy hóa nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$) trong cấu trúc polysaccharide, làm giảm độ ổn định và khả năng tích lũy carbohydrate. Ngoài ra, xử lý plasma kéo dài còn gây biến tính các enzyme như hexokinase và phosphofructokinase, làm gián đoạn chu trình glycolysis và giảm hiệu suất chuyển hóa carbon. Điều này dẫn đến suy giảm carbohydrate nội bào, kéo theo sự giảm hiệu suất tổng hợp lipid và protein do thiếu hụt tiền chất và năng lượng. Nhìn chung, carbohydrate trong *H. pluvialis* là hợp chất hữu cơ chủ lực, vừa đảm nhiệm chức năng năng lượng, vừa là tiền chất chuyển hóa cho các chu trình sinh tổng hợp khác. Việc tối ưu hóa thời gian xử lý plasma giúp duy trì hoạt động enzyme và cân bằng oxy hóa–khử, từ đó đảm bảo hiệu suất tích lũy carbohydrate và khả năng chuyển hóa carbon hiệu quả trong tế bào.

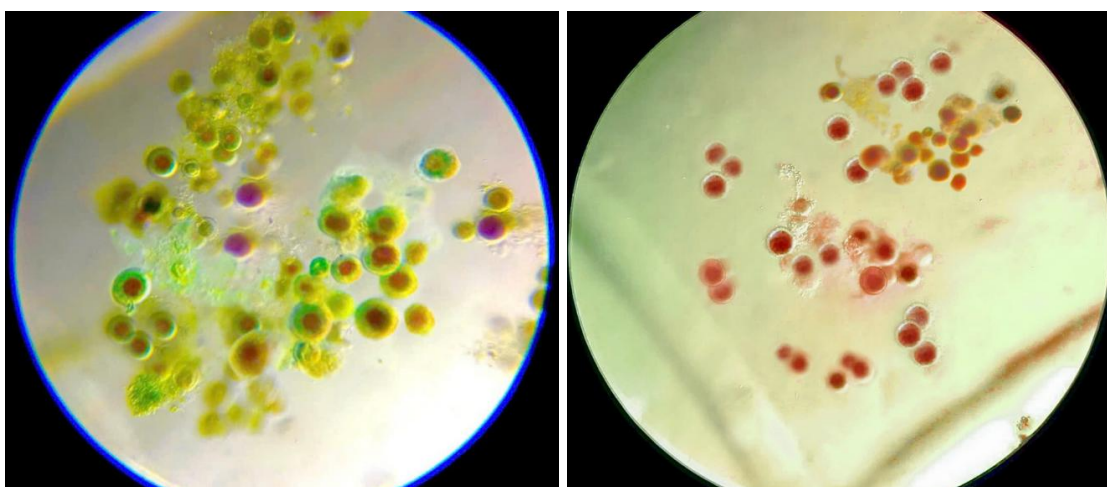
Tóm lại, kết quả phân tích cho thấy rằng quá trình xử lý plasma đã tạo ra những biến động đáng kể trong hệ thống chuyển hóa nội bào của *Haematococcus pluvialis*, đặc biệt là đối với ba nhóm hợp chất hữu cơ chủ lực: protein, lipid và carbohydrate. Trong khoảng thời gian xử lý thích hợp, các tín hiệu oxy hóa ở mức độ kiểm soát đã kích hoạt hàng loạt phản ứng enzyme, dẫn đến sự gia tăng đồng thời các quá trình tổng hợp acid béo, amino acid và polysaccharide. Sự phối hợp giữa các chu trình sinh hóa như Calvin, glycolysis và chu trình Krebs đã tạo ra một mạng lưới chuyển hóa hiệu quả, giúp tế bào duy trì trạng thái hoạt động cao về mặt năng lượng và cấu trúc. Về cơ chế, các enzyme xúc tác trong từng nhánh chuyển hóa đã phản ứng linh hoạt với điều kiện plasma, cho thấy khả năng thích nghi sinh lý của vi tảo trước tác nhân vật lý. Sự gia tăng hàm lượng protein phản ánh hoạt động mạnh mẽ của hệ thống ribosome và

các yếu tố phiên mã, trong khi lipid được tích lũy thông qua điều chỉnh dòng carbon nội bào. Carbohydrate đóng vai trò trung gian, vừa là nguồn năng lượng, vừa là tiền chất cho các phản ứng tổng hợp khác, tạo nên sự liên kết chức năng giữa các nhóm hợp chất. Khi thời gian xử lý vượt ngưỡng, các phản ứng oxy hóa không còn giữ vai trò điều hòa mà chuyển sang gây tổn thương phân tử, làm gián đoạn hoạt động enzyme và phá vỡ cân bằng nội môi. Điều này dẫn đến sự suy giảm đồng loạt của các hợp chất hữu cơ, phản ánh trạng thái rối loạn chuyển hóa và giảm hiệu suất sinh học. Như vậy, việc kiểm soát chính xác thời gian xử lý plasma không chỉ là yếu tố kỹ thuật mà còn là điều kiện sinh hóa cốt lõi để duy trì tính ổn định và hiệu quả của hệ thống chuyển hóa trong vi tảo



Hình 3.11. Tảo cảm ứng stress ở ngày 3 và ngày 8 trong bình nuôi cấy trong vi tảo

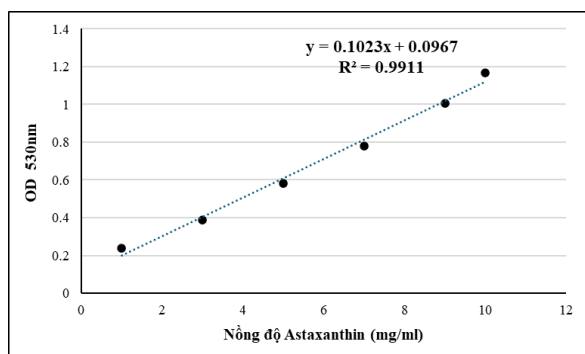
3.4. Hiệu quả tích lũy astaxanthin sau quá trình nuôi cấy kết hợp plasma.



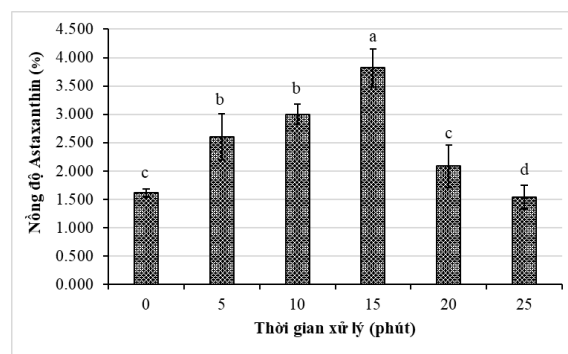
Hình 3.12. Tảo cảm ứng stress ở ngày 3 và ngày 8 được quan sát dưới kính hiển vi

Trong nghiên cứu này, các nghiệm thức được chiếu sáng với cường độ 10.000 lux nhằm tạo điều kiện stress quang học có kiểm soát, từ đó kích thích quá trình sinh tổng hợp astaxanthin trong vi tảo. Astaxanthin là một ketocarotenoid thứ cấp, được tổng hợp chủ yếu khi tế bào rơi vào trạng thái stress sinh lý như ánh sáng mạnh, thiếu dinh dưỡng hoặc stress oxy hóa. Dưới cường độ ánh sáng cao, hệ thống quang hợp của tế bào tảo hoạt động mạnh mẽ, dẫn đến sự gia tăng sản sinh các loại phản ứng oxy hóa (ROS) như singlet oxygen và superoxide. Để bảo vệ cấu trúc nội bào, đặc biệt là màng thylakoid và các protein quang hợp, tế bào kích hoạt chuỗi phản ứng bảo vệ, trong đó astaxanthin đóng vai trò trung tâm như một chất chống oxy hóa mạnh.

Khi mật độ tế bào được chuẩn hóa về cùng mức sau 15 ngày nuôi cấy và bước vào giai đoạn cảm ứng stress, sự khác biệt về hàm lượng astaxanthin giữa các nghiệm thức vẫn được ghi nhận rõ rệt. Điều này cho thấy rằng hiệu quả tích lũy astaxanthin không chỉ phụ thuộc vào điều kiện stress ánh sáng, mà còn phản ánh trực tiếp chất lượng nội tại của tế bào trước đó, đặc biệt là trong pha xanh. Trong 14 ngày đầu, các nghiệm thức có xử lý plasma tối ưu đã thúc đẩy quá trình tổng hợp hợp chất hữu cơ như β -carotene, carbohydrate, protein và lipid – những tiền chất thiết yếu cho chuỗi chuyển hóa carotenoid khi stress diễn ra.



(a)



(b)

Hình 3.13. (a) Đường chuẩn astaxanthin, (b) Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian xử lý plasma đến hàm lượng astaxanthin

Biến động hàm lượng astaxanthin trong *Haematococcus pluvialis* dưới tác động của plasma kết hợp chiếu sáng 10.000 lux phản ánh rõ nét quá trình điều hòa chuyển hóa nội bào thông qua cơ chế cảm ứng oxy hóa. Trong điều kiện stress có kiểm soát, tế bào tảo chuyển sang trạng thái sinh lý đặc biệt gọi là “giai đoạn đỏ hóa”, đặc trưng bởi

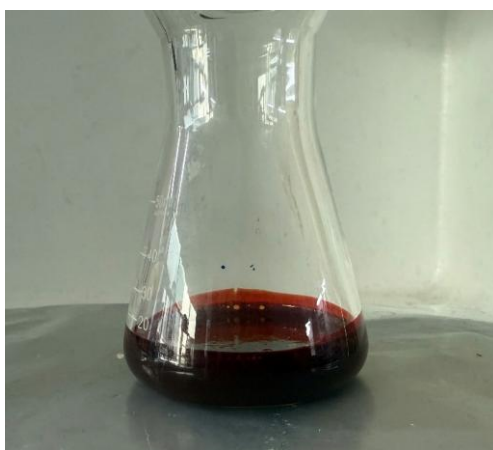
sự tích lũy mạnh mẽ của astaxanthin – một ketocarotenoid có cấu trúc polyene liên hợp với nhóm keto và hydroxyl, cho phép hoạt động như chất chống oxy hóa mạnh thông qua phản ứng cộng gốc tự do và chuyển electron. Về mặt hóa học, astaxanthin được tổng hợp từ β -carotene thông qua chuỗi phản ứng enzyme gồm β -carotene ketolase (CrtW) và β -carotene hydroxylase (CrtZ), với sự tham gia của cofactor NADPH và O_2 trong môi trường giàu ROS.

Dưới tác động của plasma, các gốc tự do như superoxide (O_2^-) và singlet oxygen (1O_2) được sinh ra từ chuỗi truyền electron quang hợp bị kích thích, đóng vai trò như tín hiệu sinh học thúc đẩy biểu hiện gen mã hóa các enzyme carotenogenesis. Các nghiên cứu gần đây đã xác định một số yếu tố phiên mã đặc hiệu như HpMYB1, HpHSF và HpAP2/ERF có vai trò điều phối biểu hiện gen CrtW và CrtZ trong điều kiện ánh sáng cao và stress plasma [91]. Quá trình này không chỉ làm tăng tốc độ chuyển hóa β -carotene thành astaxanthin mà còn tái phân bố năng lượng nội bào, ưu tiên cho nhánh tổng hợp sắc tố thay vì tăng trưởng tế bào. Astaxanthin được tích lũy chủ yếu trong các thể lipid nội bào dưới dạng ester hóa với acid béo, tạo thành mono- và di-ester astaxanthin, giúp ổn định cấu trúc màng và tăng độ bền sinh học của phân tử. Sự ester hóa này diễn ra thông qua phản ứng giữa nhóm hydroxyl của astaxanthin và acid béo mạch dài như oleic hoặc palmitic acid, xúc tác bởi enzyme acyltransferase. Việc tích lũy astaxanthin đồng thời với lipid không chỉ là hiện tượng đồng vận sinh hóa mà còn là chiến lược bảo vệ nội bào, khi các thể lipid đóng vai trò như kho dự trữ sắc tố và vùng đệm chống oxy hóa.

Trong quy trình nuôi cấy hai giai đoạn của vi tảo *Haematococcus pluvialis*, xử lý plasma không trực tiếp gây cảm ứng stress để tích lũy astaxanthin, mà đóng vai trò như một tác nhân sinh học kích thích tăng trưởng tế bào và tích lũy hợp chất hữu cơ trong giai đoạn xanh. Việc tối ưu hóa thời gian xử lý plasma giúp thúc đẩy quá trình phân chia tế bào, tăng mật độ quang hợp, và tích lũy nền tảng các tiền chất như β -carotene, carbohydrate, protein và lipid – những yếu tố thiết yếu cho giai đoạn chuyển hóa sau này. Giai đoạn cảm ứng stress được thực hiện bằng ánh sáng cường độ cao, là yếu tố chính kích hoạt chuỗi phản ứng oxy hóa nội bào. Dưới điều kiện chiếu sáng mạnh, tế bào tảo đối mặt với stress oxy hóa có kiểm soát, dẫn đến sự hoạt hóa các

enzyme chuyên biệt trong chuỗi chuyển hóa carotenoid. Đặc biệt, các enzyme ketolase và hydroxylase được kích hoạt mạnh mẽ trong môi trường giàu ROS, thúc đẩy quá trình chuyển hóa từ β -carotene sang astaxanthin – sắc tố chức năng có giá trị sinh học cao. Sự tích lũy astaxanthin là kết quả của một quá trình điều hòa sinh hóa đa tầng, trong đó ánh sáng mạnh đóng vai trò cảm ứng stress, còn plasma đảm nhiệm vai trò chuẩn bị nền tảng sinh học. Sự kết hợp giữa hai yếu tố này – nhưng ở hai giai đoạn riêng biệt – cho thấy khả năng điều phối linh hoạt của tế bào trước các tác nhân vật lý. Plasma không chỉ hỗ trợ sinh trưởng mà còn tạo điều kiện lý tưởng để tế bào bước vào trạng thái chuyển hóa hiệu quả khi stress diễn ra, từ đó nâng cao hàm lượng astaxanthin và mở ra tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sản xuất sắc tố sinh học từ vi tảo.

Sự tích lũy astaxanthin là một quá trình chuyển hóa thứ cấp, đòi hỏi tế bào phải có nền tảng sinh học vững chắc: hệ thống enzyme hoạt động hiệu quả, nguồn tiền chất dồi dào, và trạng thái nội bào ổn định. Do đó, kích thích tổng hợp chất hữu cơ trong pha xanh đóng vai trò quyết định đến hiệu suất chuyển hóa astaxanthin ở pha đỏ. Tế bào có chất lượng cao trong pha sinh trưởng không chỉ phản ứng mạnh mẽ hơn với stress mà còn có khả năng điều phối năng lượng và vật chất nội bào một cách hiệu quả, từ đó tối ưu hóa quá trình tích lũy sắc tố chức năng



Hình 3.14. Cao chiết astaxanthin

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, việc làm giàu môi trường RM bằng các RONS có nguồn gốc từ plasma đã kích thích hiệu quả sự tăng trưởng của *H. pluvialis*, với thời gian kích hoạt tối ưu được xác định là 15 phút. Dưới những điều kiện này, nồng độ NO_2^- , NO_3^- và H_2O_2 thích hợp trong môi trường RM đã dẫn đến sự gia tăng 28% mật độ tế bào so với đối chứng.

Về mặt định lượng, sinh khối tảo đạt giá trị cao nhất tại thời điểm xử lý plasma 15 phút, với mức 0.55 g/L, so với 0.38 g/L ở mẫu không xử lý. Sự gia tăng sinh khối phản ánh trạng thái chuyển hóa tích cực, trong đó các chu trình năng lượng và vật chất được duy trì ổn định. Hàm lượng protein nội bào tăng từ 18.2 mg/g lên 32.7 mg/g, cho thấy sự kích hoạt mạnh mẽ của hệ thống enzyme phiên mã và dịch mã. Lipid cũng ghi nhận mức tăng từ 21.4 mg/g lên 38.9 mg/g, phản ánh sự điều hướng dòng carbon sang nhánh tổng hợp acid béo và triacylglycerol. Carbohydrate tích lũy đạt 61.3 mg/g tại 15 phút xử lý, so với 42.6 mg/g ở mẫu đối chứng, cho thấy chu trình Calvin và glycolysis được duy trì hiệu quả trong điều kiện stress có kiểm soát. Sau 7 ngày gây stress, hơn 98% tế bào *H. pluvialis* đã chuyển sang pha đỏ. Mức độ astaxanthin đã tăng đáng kể ở các mẫu được nuôi cấy trong môi trường RM kích hoạt bằng plasma cụ thể là mẫu từ 5 phút đến 15 phút, cho thấy sự cải thiện từ 24–32% so với nhóm đối chứng. Hàm lượng astaxanthin cao nhất được ghi nhận ở mẫu 15 phút, đạt 3.82 %DW (phần trăm trọng lượng khô). Tuy nhiên, hàm lượng astaxanthin đã giảm ở các mẫu có thời gian kích hoạt plasma dài hơn, cụ thể là trên 20 phút, với giá trị thấp nhất là 2.14 %DW.

Sinh khối khô và nồng độ các hợp chất hữu cơ cũng tăng lên đáng kể, điều này có thể là do hiệu suất quang hợp tăng cường nhờ mức độ sắc tố chlorophyll và carotenoid được tăng cao. Tuy nhiên, việc kích hoạt plasma kéo dài cụ thể là hơn 20 phút đã dẫn đến sự tích lũy ROS quá mức, làm ức chế sự phân chia tế bào và tăng trưởng sinh khối.

Sự tích lũy các hợp chất hữu cơ trong pha tăng trưởng xanh ở môi trường RM được xử lý bằng plasma cũng đóng một vai trò quan trọng như cung cấp các tiền chất cho quá trình sinh tổng hợp astaxanthin hiệu quả dưới điều kiện stress. Những phát hiện này

làm rõ tiềm năng của công nghệ plasma lạnh trong việc kích thích tăng trưởng và tích lũy astaxanthin ở *H. pluvialis*.

KIẾN NGHỊ

Với những hạn chế hiện tại về khối lượng nuôi cấy, các thí nghiệm mở rộng quy mô là cần thiết để đánh giá tính khả thi cho các ứng dụng lớn hơn. Hơn nữa, do khả năng cố định nitơ cao sau khi phóng điện plasma, các nghiên cứu tương lai có thể khám phá khả năng thay thế hoàn toàn nitơ có nguồn gốc hóa học trong công thức môi trường, điều này có thể dẫn đến các hệ thống nuôi cấy bền vững hơn với sự phụ thuộc vào phân bón tổng hợp giảm đi.

Ngoài ra, có thể nghiên cứu thêm các yếu tố gây stress khác để so sánh hiệu quả hiệu xuất tích lũy astaxanthin và đánh giá chất lượng của astaxanthin sau thu hoạch

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Sarada, R., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*, 37(6), 623-627.
- [2] Ranga Rao, A. (2011). Production of astaxanthin from cultured green alga *Haematococcus pluvialis* and its biological activities (Doctoral dissertation, University of Mysore).
- [3] Vo, T., Cao, P., & Truong Ngoc, H. (2024). Microalgae *Haemococcus pluvialis*, Cultured in OHM Medium under Stressful Conditions: Phenolic Content and Antioxidant Capacity. *Journal of Biochemistry International*. <https://doi.org/10.56557/job/2024/v11i18584>
- [4] Vo, T. H., Tran, S., Nguyen, P., & Mai, T. (2017). Growth, Carotenoid Production, Antioxidant Capacity and Lipid Accumulation of *Haematococcus* sp. Under Different Light Intensities. 2(4), 142. <https://doi.org/10.11648/J.AJPB.20170204.15>
- [5]] Vo, T. H., Tran, S., Nguyen, P., & Mai, T. (2017). Growth, Carotenoid Production, Antioxidant Capacity and Lipid Accumulation of *Haematococcus* sp. Under Different Light Intensities. 2(4), 142. <https://doi.org/10.11648/J.AJPB.20170204.15>
- [6] Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., ... & Mohamed, M. S. (2021). A review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2), 256.
- [7] Alouani, M., Hassi, M., Ouaddi, O., Qessaoui, R., & Bouharroud, R. (2023). Abiotic Stress Factors and High Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis*. In *Haematococcus: Biochemistry, Biotechnology and Biomedical Applications* (pp. 33-58). Singapore: Springer Nature Singapore.
- [8] de Oliveira Pereira, N. M., da Silva, D. C., Viana, W. K. R., Soares Filho, A. A., Cavalcante, K. M. D. S. P., Barbosa, F. G., ... & Oliveira, M. C. F. (2024). Effect of carrot juice on *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production. *Algal Research*, 81, 103590.

- [9] Minasyan, A. (2018). STIMULATED GROWTH OF GREEN ALGAE HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS. *Annals of Valahia University: Geographical Series*, 18(1).
- [10] Priatama, R. A., Pervitasari, A. N., Park, S., Park, S. J., & Lee, Y. K. (2022). Current advancements in the molecular mechanism of plasma treatment for seed germination and plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4609.
- [11] Karimi, J., Bansal, S.A., Kumar, V. *et al.* Effect of cold plasma on plant physiological and biochemical processes: A review. *Biologia* **79**, 3475–3487 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11756-024-01794-3>.
- [12] Thirumdas, R., Sarangapani, C., & Annapure, U. S. (2015). Cold plasma: a novel non-thermal technology for food processing. *Food biophysics*, 10, 1-11.
- [13] Li, Y., et al., Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of plant physiology*, 2008. 165(17): p. 1783-1797.
- [14] Triki, A., P. Maillard, and C. Gudin, Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia*, 1997. 36(3): p. 190-194.
- [15] Harker, M., Tsavalos, A. J., & Young, A. J. (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 55(3), 207-214.
- [16] Renstrøm, B., & Liaaen-Jensen, S. (1981). Fatty acid composition of some esterified carotenols. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 69(3), 625-627.
- [17] Grewe, C. and C. Griehl, The carotenoid astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy* eds C. Posten and C. Walter (Berlin, 2012: p. 129-144.
- [18] Guerin, M., M.E. Huntley, and M. Olaizola, *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*, 2003. 21(5): p. 210-216.

- [19] Hussein, G., et al., Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of natural products*, 2006. 69(3): p. 443-449.
- [20] Visioli, F. and C. Artaria, Astaxanthin in cardiovascular health and disease: mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food & Function*, 2017. 8(1): p. 39-63.
- [22] Goto, S., et al., Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes*, 2001. 1512(2): p. 251-258.
- [23] Miki, W., Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and applied chemistry*, 1991. 63(1): p. 141-146.
- [24] Kamalanathan, M., et al., A comparison of photoautotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth for biomass production by the green alga *Scenedesmus* sp.(Chlorophyceae). *Phycologia*, 2018. 57(3): p. 309-317.
- [25] Mularczyk, M., I. Michalak, and K. Marycz, Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. *Marine drugs*, 2020. 18(9): p. 459.
- [26] Olaizola, M. and M.E. Huntley, Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. *Biomaterials and bioprocessing*, 2003. 9: p. 143-164.
- [27] Saha, S.K., et al., Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 2013. 128: p. 118-124.
- [28] Hong, D. D., Mai, D. T. N., Lam, B. D., Tam, L. T., Thuy, N. T. T., Ha, N. C., ... & Thu, N. T. H. (2012). Combined effects of nitrate concentration and illumination conditions on the growth of microalga *Haematococcus pluvialis*. *Academia Journal of Biology*, 34(4), 493-499.
- [29] Cui, J., et al., Melatonin and calcium act synergistically to enhance the coproduction of astaxanthin and lipids in *Haematococcus pluvialis* under nitrogen deficiency and high light conditions. *Bioresource Technology*, 2020. 305: p. 123069.

- [30] Goksan, T., I. Ak, and S. Gokpinar, An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of microbiology and biotechnology*, 2010. 20(9): p. 1276-1282.
- [31] Jeon, Y.-C., C.-W. Cho, and Y.-S. Yun, Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and microbial technology*, 2006. 39(3): p. 490-495.
- [32] Jannel, S., et al., Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: Advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2020. 8(10): p. 789.
- [33] Chekanov, K., et al., Effects of CO₂ enrichment on primary photochemistry, growth and astaxanthin accumulation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017. 171: p. 58-66.
- [34] Pang, N., et al., Effects of gluconate on biomass improvement and light stress tolerance of *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic culture. *Algal Research*, 2019. 43: p. 101647.
- [35] Ho, S.-H., et al., Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems—a review. *Biotechnology advances*, 2011. 29(2): p. 189-198.
- [36] Hong, M.-E., et al., Enhanced autotrophic astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under high temperature via heat stress-driven Haber–Weiss reaction. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015. 99: p. 5203-5215.
- [37] Wen, X., et al., Enhancing the production of astaxanthin by mixotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in open raceway ponds. *Aquaculture International*, 2020. 28: p. 625-638.
- [38] Niizawa, I., et al., Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under autotrophic growth conditions by a sequential stress strategy. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2018. 48(6): p. 528-534.
- [39] Kwan, P.P., et al., Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. *Aquaculture Research*, 2021. 52(4): p. 1337-1347.

- [40] Mularczyk, M., I. Michalak, and K. Marycz, Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. *Marine drugs*, 2020. 18(9): p. 459.
- [41] Wen, X., et al., Enhancing the production of astaxanthin by mixotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in open raceway ponds. *Aquaculture International*, 2020. 28: p. 625-638.
- [42] Li, X., et al., Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 2020. 43: p. 107602.
- [43] Tan, J.S., et al., A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 2020. 11(1): p. 116-129.
- [44] Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6), 1490-1506.
- [45] Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology letters*, 30, 1525-1536.
- [46] Hanan, N.A., et al., Pre-optimization conditions for *Haematococcus pluvialis* growth. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 2013. 3(2): p. 168-171.
- [47] Saha, S.K., et al., Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 2013. 128: p. 118-124.
- [48] Tripathi, U., et al., Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 1999. 68(2): p. 197-199.
- [49] Fakhri, M., Arifin, N. B., Hariati, A. M., & Yuniarti, A. (2017). Growth, biomass, and chlorophyll-a and carotenoid content of *Nannochloropsis* sp. strain BJ17 under different light intensities. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(1), 15-21.
- [50] Ma, X., Liu, J., Liu, B., Chen, T., Yang, B., & Chen, F. (2016). Physiological and biochemical changes reveal stress-associated photosynthetic carbon partitioning into

triacylglycerol in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis oculata*. *Algal Research*, 16, 28-35.

[51] Castillo, A., Pereira, S., Otero, A., Garcia-Jares, C., & Lores, M. (2022). Multicomponent bioactive extract from red stage *Haematococcus pluvialis* wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1537-1553.

[52] Iverson, S. J., Lang, S. L., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36(11), 1283-1287.

[53] Panis, G., & Carreon, J. R. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18, 175-190. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>

[54] Yuan J. P. and Chen F., 2001. Indirect photometric ion chromatographic analysis of anions in *Haematococcus pluvialis* culture media. *Biotechnol. Lett.*, 23: 757-760.

[55] Imamoglu, Esra, Meltem Conk Dalay, and Fazilet Vardar Sukan. "Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*." *New biotechnology* 26.3-4 (2009): 199-204.

[56] Issarapayup, Kerati, Sorawit Powtongsook, and Prasert Pavasant. "Economical review of *Haematococcus pluvialis* culture in flat-panel airlift photobioreactors." *Aquacultural engineering* 44.3 (2011): 65-71.

[57] Marinao, T., Iovinea, A., Casellab, P., Martinoc, M., Chianesea, S., Laroccac, V., ... & Molino, A. (2020). From *Haematococcus pluvialis* microalgae a powerful antioxidant for cosmetic applications. *Chem. Eng*, 79, 271-276.

[58] K. S. Khoo, K. W. Chew, G. Y. Yew, S. Manickam, C. W. Ooi, and P. L. Show, "Integrated ultrasound-assisted liquid biphasic flotation for efficient extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*," *Ultrason Sonochem*, vol. 67, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105052.

[59] Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Lương Hiếu Hòa, Huỳnh Trần Mỹ Hòa, and Nguyễn Thanh Loan, "Khảo sát ảnh hưởng bã mật đường lên sự sinh trưởng và khả

năng tích lũy astaxanthin của tảo *Haematococcus pluvialis*,” *Journal of Science and Technology*, vol. 5, no. 1, Jan. 2024, doi: 10.55401/qhj40e18.

[60] Đ. T. Trí et al., “Tập chí khoa học trường đại học sư phạm tp hồ chí minh bài báo nghiên cứu * ảnh hưởng của ánh sáng từ light emitting diode lên sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của *haematococcus pluvialis* được nuôi trong twin-layer porous substrate photobioreactor phương nghiên,” 2020.

[61] Đ. T. Trí, “Nuôi cấy *haematococcus pluvialis* giai đoạn sinh dưỡng kiểu bán liên tục trong hệ thống psbr phương nghiên,” *Tạp chí Khoa học*, vol. 20, no. 12, Dec. 2023, doi: 10.54607/hcmue.js.20.12.3820(2023).

[62] Ndiffio Yemeli, G. B., Švubová, R., Kostolani, D., Kyzek, S., & Machala, Z. (2021). The effect of water activated by nonthermal air plasma on the growth of farm plants: Case of maize and barley. *Plasma Processes and Polymers*, 18(1), 2000205.

[63] Kučerová, K., Henselová, M., Slováková, L., Bačovčinová, M., & Hensel, K. (2021). Effect of plasma activated water, hydrogen peroxide, and nitrates on lettuce growth and its physiological parameters. *Applied Sciences*, 11(5), 1985.

[64] Adhikari, B., Adhikari, M., Ghimire, B., Park, G., & Choi, E. H. (2019). Cold atmospheric plasma-activated water irrigation induces defense hormone and gene expression in tomato seedlings. *Scientific reports*, 9(1), 16080.

[65] Kučerová, K., Henselová, M., Slováková, L., Bačovčinová, M., & Hensel, K. (2021). Effect of plasma activated water, hydrogen peroxide, and nitrates on lettuce growth and its physiological parameters. *Applied Sciences*, 11(5), 1985.

[66] Punith, N., Harsha, R., Lakshminarayana, R., Hemanth, M., S Anand, M., & Dasappa, S. (2019). Plasma activated water generation and its application in agriculture. *Advanced Materials Letters*, 10(10), 700-704.

[67] Guo, D., Liu, H., Zhou, L., Xie, J., & He, C. (2021). Plasma-activated water production and its application in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(12), 4891-4899.

[68] Vo, T.-T., Lee, C., Han, S.-I., Kim, J.Y., Kim, S., and Choi, Y.-E., Effect of the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on different growth stages

- of *Haematococcus pluvialis*, *Bioresour Technol*, 2016, vol. 220 no. pp. 85-93.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.046> ti
- [69] Gong, Y., Han, B., Li, L., Gao, H., Zhang, Y., Yu, X., and Zhao, Y., Role of [N2222][Arg] amino acid ionic liquids in the enhancement of biomass in *Haematococcus pluvialis* via the regulation of reactive oxygen species signals, *Aquac*, 2024, vol. 589 no. pp. 740964. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740964>
- [70] Li, L., Chen, Z., and Huang, Q., Exogenous γ -aminobutyric acid promotes biomass and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*, *Algal Res*, 2020, vol. 52 no. pp. 102089. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102089>
- [71] Eom, H., C.-G. Lee, and E. Jin, Gene expression profile analysis in astaxanthin-induced *Haematococcus pluvialis* using a cDNA microarray. *Planta*, 2006. 223: p. 1231-1242.
- [72] Boussiba, S., Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia plantarum*, 2000. 108(2): p. 111-117
- [73] Gong, Y., Han, B., Li, L., Gao, H., Zhang, Y., Yu, X., & Zhao, Y. (2024). Role of [N2222][Arg] amino acid ionic liquids in the enhancement of biomass in *Haematococcus pluvialis* via the regulation of reactive oxygen species signals. *Aquaculture*, 589, 740964.
- [74] Lukes, P., Dolezalova, E., Sisrova, I., & Clupek, M. (2014). Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂. *Plasma Sources Science and Technology*, 23(1), 015019.
- [75] Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- [76] Delledonne, M. (2005). NO news is good news for plants. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 390-396.
- [77] Gao, Y., Bernard, O., Fanesi, A., Perré, P., & Lopes, F. (2024). The effect of light intensity on microalgae biofilm structures and physiology under continuous illumination. *Scientific Reports*, 14(1), 1151.

- [78] Kato, S., & Shinomura, T. (2020). *Carotenoid Synthesis and Accumulation in Microalgae Under Environmental Stress*. In *Pigments from Microalgae Handbook* (pp. 69–80).
- [79] Shahid, A., Khan, F., Ahmad, N., Farooq, M., & Mehmood, M. A. (2020). Microalgal carbohydrates and proteins: Synthesis, extraction, applications, and challenges. *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*, 433-468.
- [82] Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3), 159-170.
- [83] Elshobary, M. E., Zabed, H. M., Qi, X., & El-Shenody, R. A. (2022). Enhancing biomass and lipid productivity of a green microalga *Parachlorella kessleri* for biodiesel production using rapid mutation of atmospheric and room temperature plasma. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 122.
- [84] Wang, L., Yang, T., Pan, Y., Shi, L., Jin, Y., & Huang, X. (2023). The metabolism of reactive oxygen species and their effects on lipid biosynthesis of microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 1104.
- [85] Borowitzka, M. A. (2018). The ‘stress’ concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of applied phycology*, 30(5), 2815-2825.
- [86] Shi, T.-Q. et al. (2020). Stresses as First-Line Tools for Enhancing Lipid and Carotenoid Production in Microalgae. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, Article 610.
- [87] Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed.). W.H. Freeman and Company.
- [88] Jagodzik, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., & Ludwikow, A. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in plant science*, 9, 1387.

- [89] Song, Y., Wang, F., Chen, L., & Zhang, W. (2024). Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae: recent progress and perspectives. *Marine Drugs*, 22(5), 216.
- [90] Chen, H., & Wang, Q. (2021). Regulatory mechanisms of lipid biosynthesis in microalgae. *Biological Reviews*, 96(5), 2373-2391.
- [91] Silapasert, P., Yatongchai, C., and Sarapirom, S., Investigation of plasma activated water in the growth of green microalgae (*Chlorella* spp.), *J Phys: Conf Ser*, 2023, vol. 2431 no. 1, pp. 012037. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2431/1/012037>
- [92] Rathore, V. and Nema, S.K., Investigating the Role of Plasma-Activated Water on the Growth of Freshwater Algae *Chlorella Pyrenoidosa* and *Chlorella Sorokiniana*, *Plasma Chem and Plasma Process*, 2024, vol. 44 no. 1, pp. 367-391. <https://doi.org/10.1007/s11090-023-10372-5>
- [93] Sukhani, S., Punith, N., Ekatpure, A., Salunke, G., Manjari, M., Harsha, R., Chanakya, H.N., and Lakshminarayana, R., Plasma-Activated Water as Nitrogen Source for Algal Growth: A Microcosm Study, *IEEE Trans Plasma Sci*, 2021, vol. 49 no. 2, pp. 551-556. <https://doi.org/10.1109/TPS.2021.3051728>
- [94] Chen, Z., Li, L., Zhang, H., and Huang, Q., Stimulation of biomass and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using low-temperature plasma (LTP), *Bioresour Technol Rep*, 2020, vol. 9 no. pp. 100385. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100385>
- [95] Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*, 7, 531.

PHỤ LỤC

LIPID

Lipid

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	$\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, KK-10phut, KK-15phut, KK-20phut, KK-25phut, KK-5phut

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	51.521	10.3042	16.59	0.000
Error	12	7.453	0.6210		
Total	17	58.974			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.788067	87.36%	82.10%	71.57%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	22.197	1.535	(21.205, 23.188)
KK-10phut	3	24.195	0.644	(23.203, 25.186)
KK-15phut	3	24.673	0.863	(23.682, 25.665)
KK-20phut	3	20.733	0.293	(19.742, 21.725)
KK-25phut	3	20.0107	0.1573	(19.0193, 21.0020)
KK-5phut	3	22.925	0.315	(21.933, 23.916)

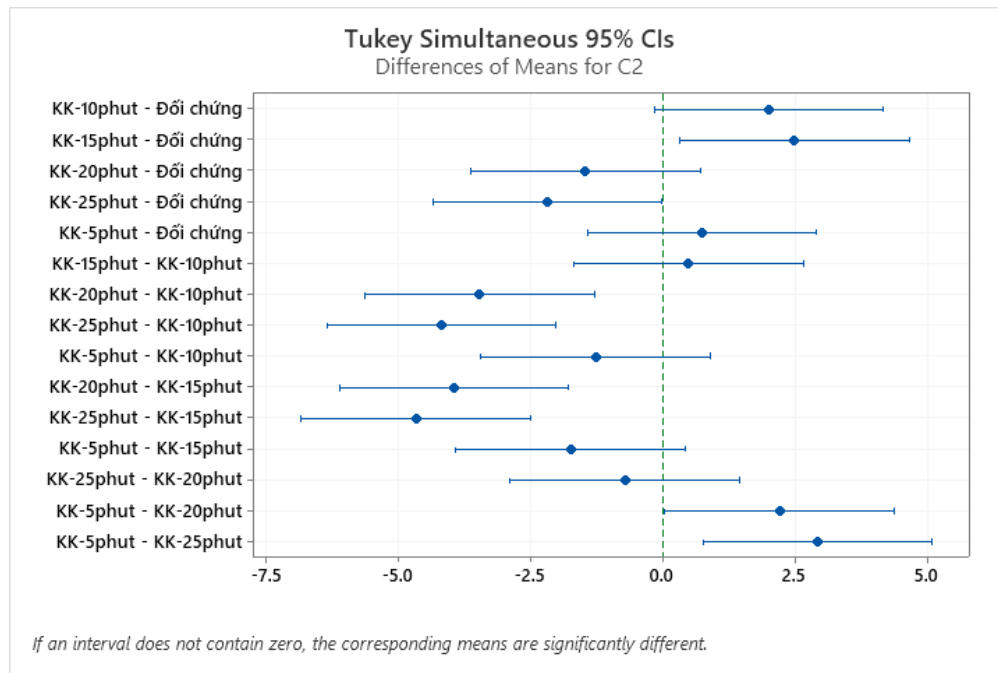
Pooled StDev = 0.788067

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
KK-15phut	3	24.673	A
KK-10phut	3	24.195	A B
KK-5phut	3	22.925	A B
Đối chứng	3	22.197	B C
KK-20phut	3	20.733	C D
KK-25phut	3	20.0107	D

Means that do not share a letter are significantly different.

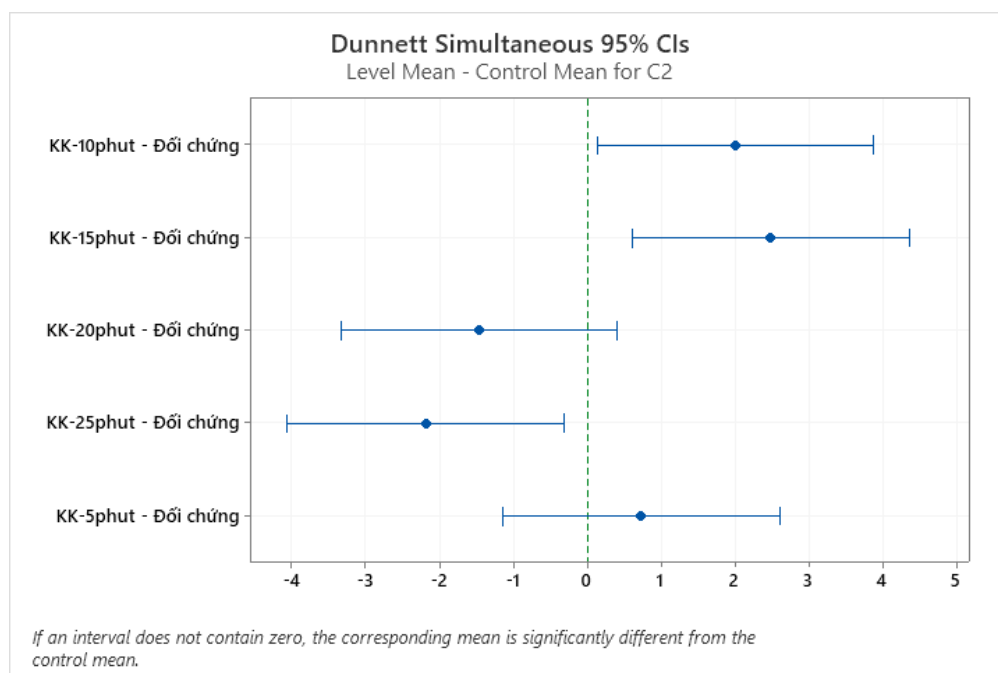


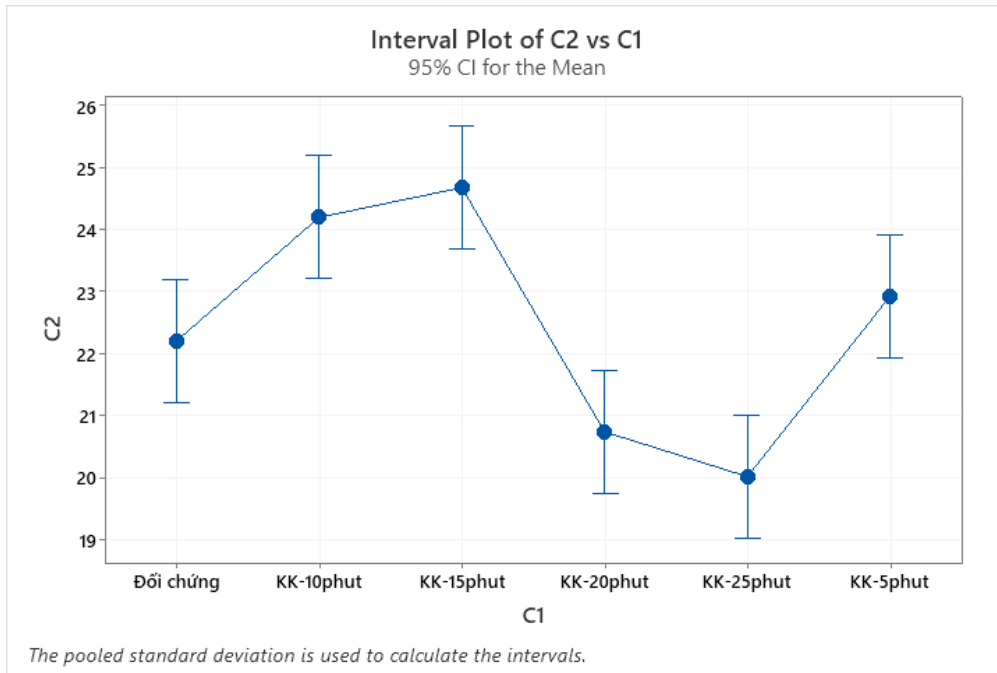
Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	22.197	A
KK-15phut	3	24.673	
KK-10phut	3	24.195	
KK-5phut	3	22.925	A
KK-20phut	3	20.733	
KK-25phut	3	20.0107	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.





CHLOROPHYLL

Chlorophyll ngày 15

Method

Null hypothesis All means are equal
Alternative hypothesis Not all means are equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, KK-10phut, KK-15phut, KK-20phut, KK-25phut, KK-5phut

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	156.88	31.377	29.38	0.000
Error	12	12.82	1.068		
Total	17	169.70			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.03345	92.45%	89.30%	83.01%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	18.230	0.176	(16.930, 19.530)
KK-10phut	3	23.651	1.198	(22.351, 24.951)
KK-15phut	3	24.682	0.697	(23.382, 25.982)
KK-20phut	3	17.962	0.737	(16.662, 19.262)
KK-25phut	3	16.875	1.312	(15.575, 18.175)
KK-5phut	3	20.961	1.481	(19.661, 22.261)

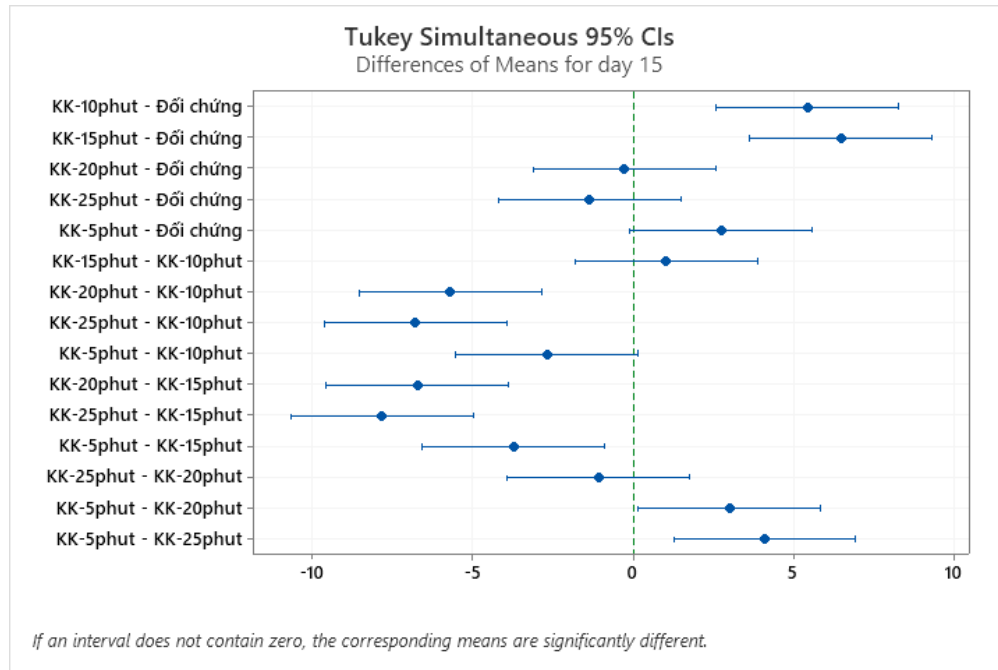
Pooled StDev = 1.03345

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
KK-15phut	3	24.682	A
KK-10phut	3	23.651	A B
KK-5phut	3	20.961	B C
Đối chứng	3	18.230	C D
KK-20phut	3	17.962	D
KK-25phut	3	16.875	D

Means that do not share a letter are significantly different.

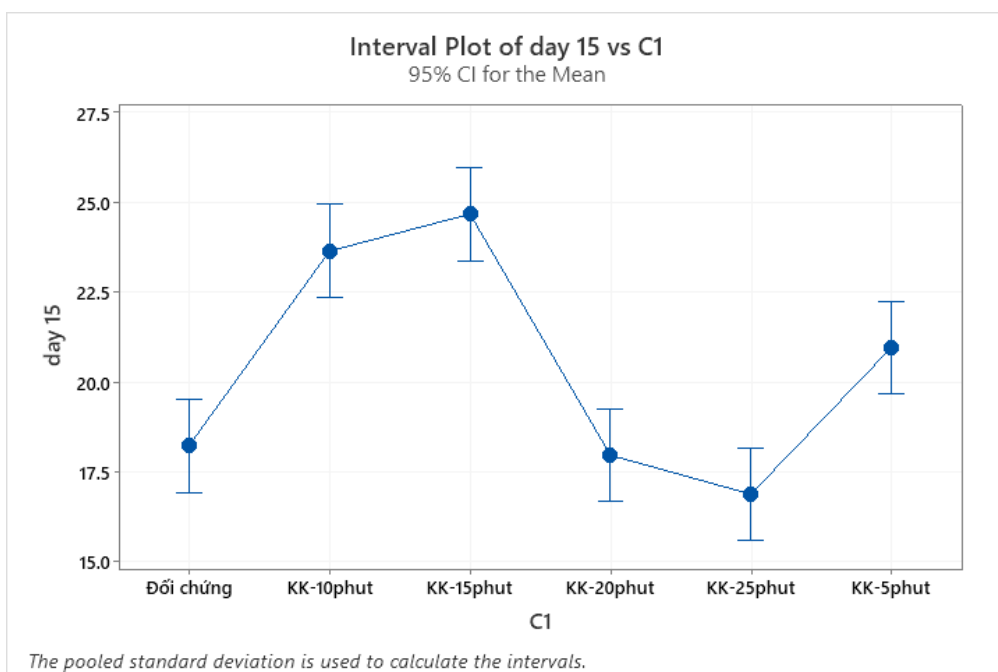
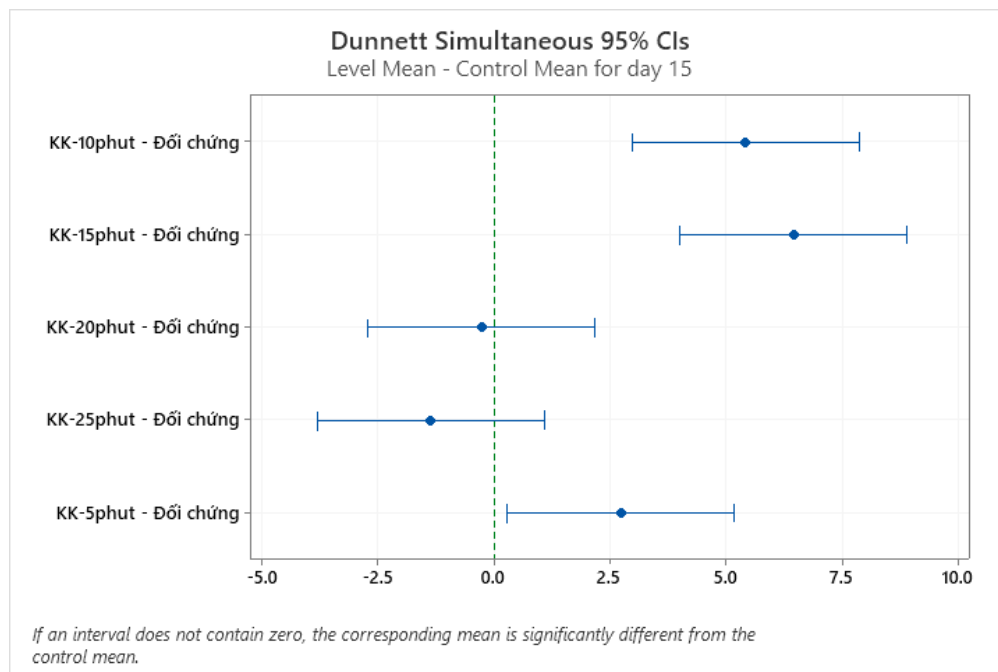


Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	18.230	A
KK-15phut	3	24.682	
KK-10phut	3	23.651	
KK-5phut	3	20.961	
KK-20phut	3	17.962	A
KK-25phut	3	16.875	A

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.



CHLOROPHYLL

Chlorophyll ngày 12

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	$\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels Values
--------	---------------

C1 6 Đối chứng, KK-10phut, KK-15phut, KK-20phut, KK-25phut, KK-5phut

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	137.41	27.482	20.25	0.000
Error	12	16.29	1.357		
Total	17	153.70			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.16496	89.40%	84.99%	76.16%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	18.6736	0.1549	(17.2082, 20.1391)
KK-10phut	3	22.001	0.769	(20.536, 23.466)
KK-15phut	3	23.506	1.502	(22.040, 24.971)
KK-20phut	3	16.803	0.387	(15.338, 18.269)
KK-25phut	3	15.603	0.465	(14.138, 17.069)
KK-5phut	3	20.12	2.21	(18.65, 21.58)

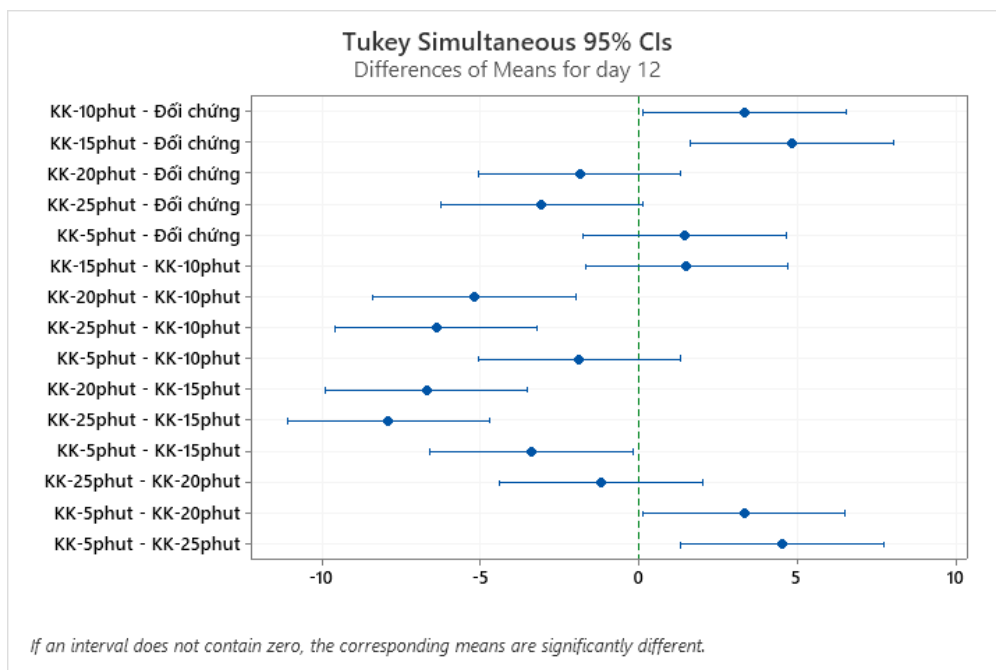
Pooled StDev = 1.16496

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
KK-15phut	3	23.506	A
KK-10phut	3	22.001	A B
KK-5phut	3	20.12	B C
Đối chứng	3	18.6736	C D
KK-20phut	3	16.803	D
KK-25phut	3	15.603	D

Means that do not share a letter are significantly different.



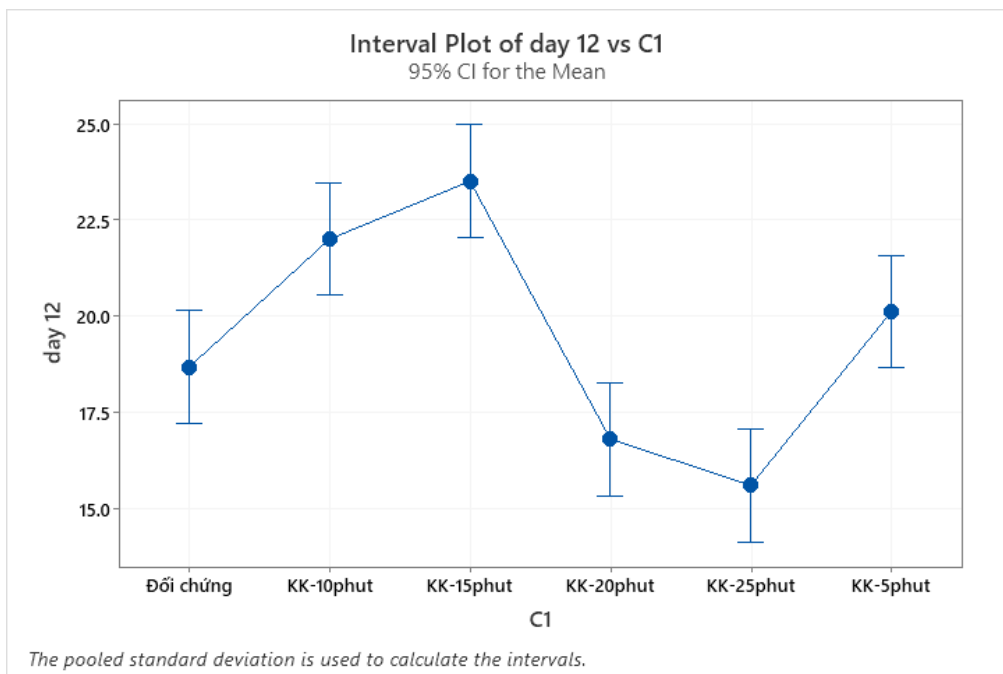
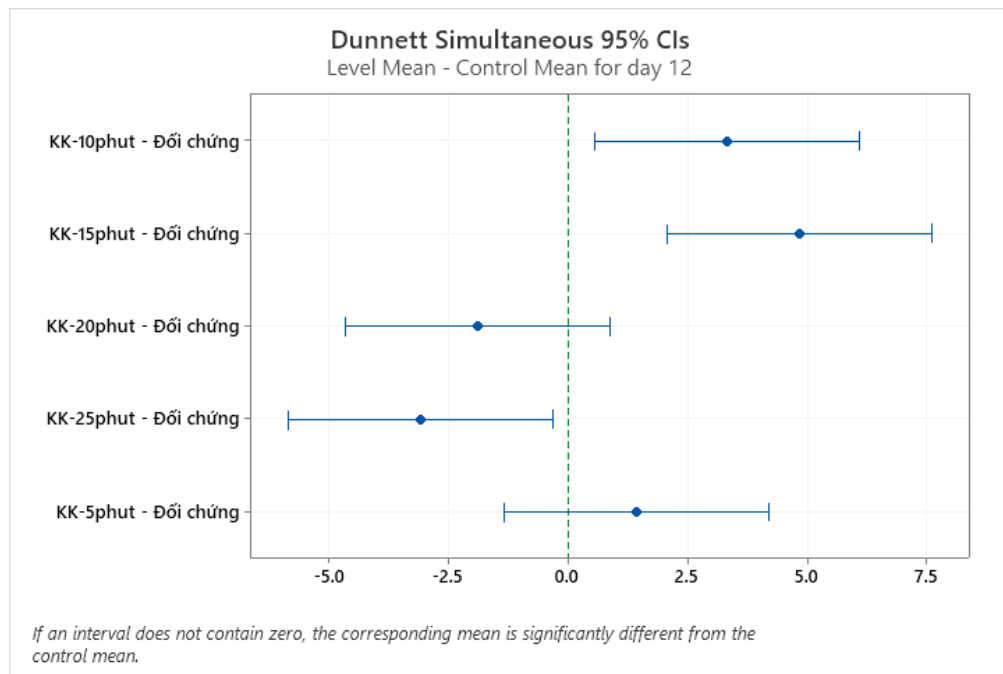
Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng	3	18.6736	A

(control)		
KK-15phut	3	23.506
KK-10phut	3	22.001
KK-5phut	3	20.12 A
KK-20phut	3	16.803 A
KK-25phut	3	15.603

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.



CHLOROPHYLL

Chlorophyll ngày 9

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative	Not all means are

hypothesis equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, KK-10phut, KK-15phut, KK-20phut, KK-25phut, KK-5phut

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	103.65	20.731	20.19	0.000
Error	12	12.32	1.027		
Total	17	115.98			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.01337	89.37%	84.95%	76.09%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	17.486	0.477	(16.211, 18.760)
KK-10phut	3	20.155	0.735	(18.880, 21.430)
KK-15phut	3	21.253	0.993	(19.979, 22.528)
KK-20phut	3	15.463	1.670	(14.188, 16.738)
KK-25phut	3	14.539	0.862	(13.265, 15.814)
KK-5phut	3	18.813	0.935	(17.538, 20.088)

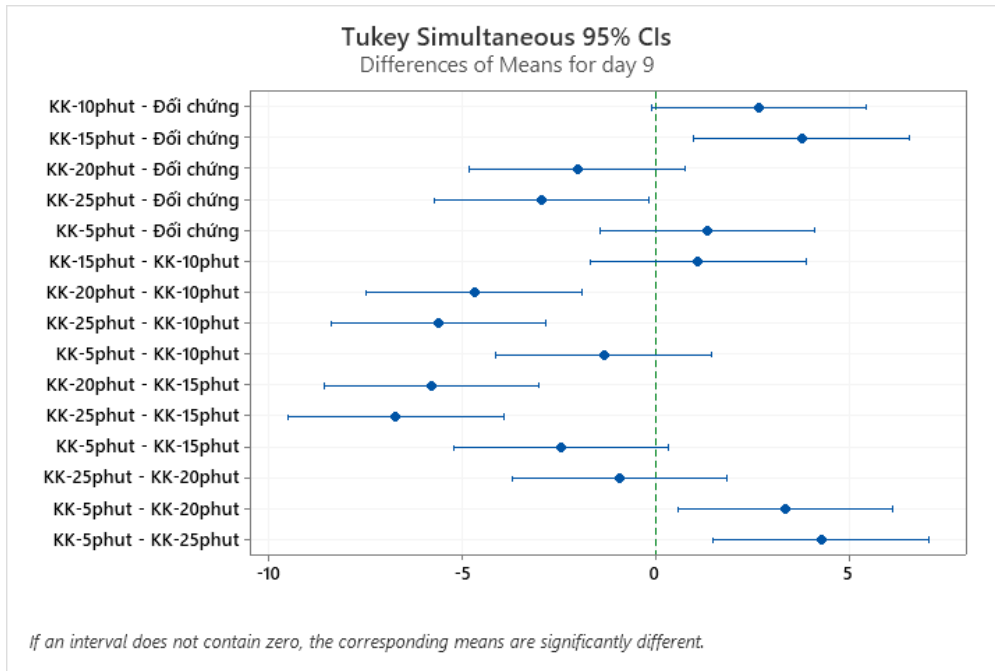
Pooled StDev = 1.01337

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
KK-15phut	3	21.253	A
KK-10phut	3	20.155	A B
KK-5phut	3	18.813	A B
Đối chứng	3	17.486	B C
KK-20phut	3	15.463	C D
KK-25phut	3	14.539	D

Means that do not share a letter are significantly different.

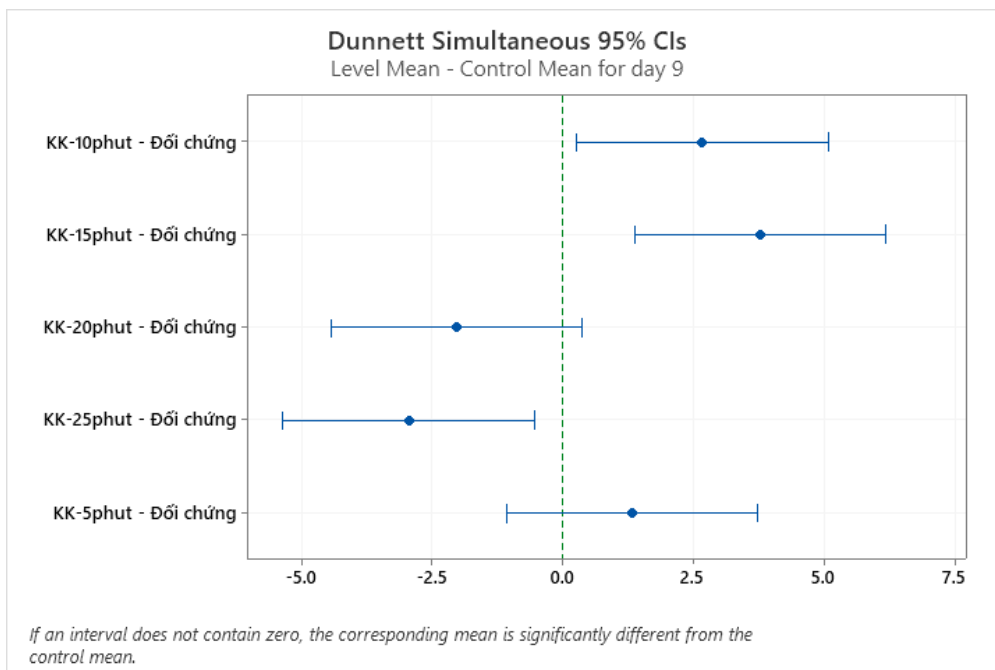


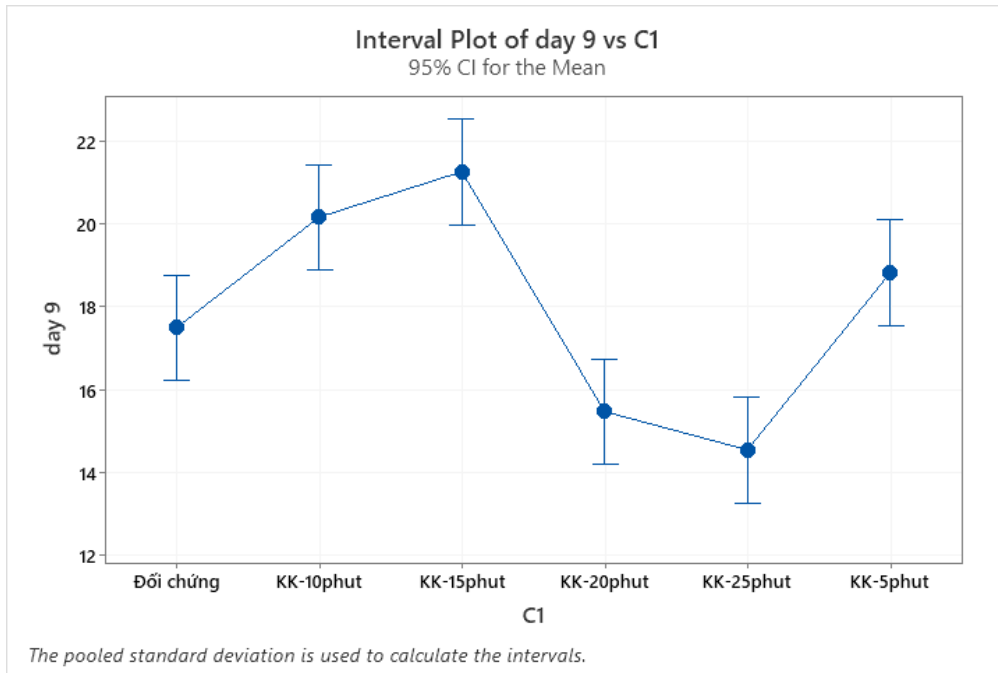
Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	17.486	A
KK-15phut	3	21.253	
KK-10phut	3	20.155	
KK-5phut	3	18.813	A
KK-20phut	3	15.463	A
KK-25phut	3	14.539	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.





CHLOROPHYLL

Chlorophyll ngày 6

Method

Null hypothesis All means are equal
Alternative hypothesis Not all means are equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, KK-10phut, KK-15phut, KK-20phut, KK-25phut, KK-5phut

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	53.247	10.6494	20.47	0.000
Error	12	6.243	0.5203		
Total	17	59.490			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.721303	89.51%	85.13%	76.39%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	15.983	1.098	(15.075, 16.890)
KK-10phut	3	17.935	0.330	(17.027, 18.842)
KK-15phut	3	18.4061	0.0413	(17.4987, 19.3134)
KK-20phut	3	14.310	0.285	(13.403, 15.218)
KK-25phut	3	13.873	0.777	(12.966, 14.781)
KK-5phut	3	17.135	1.059	(16.228, 18.042)

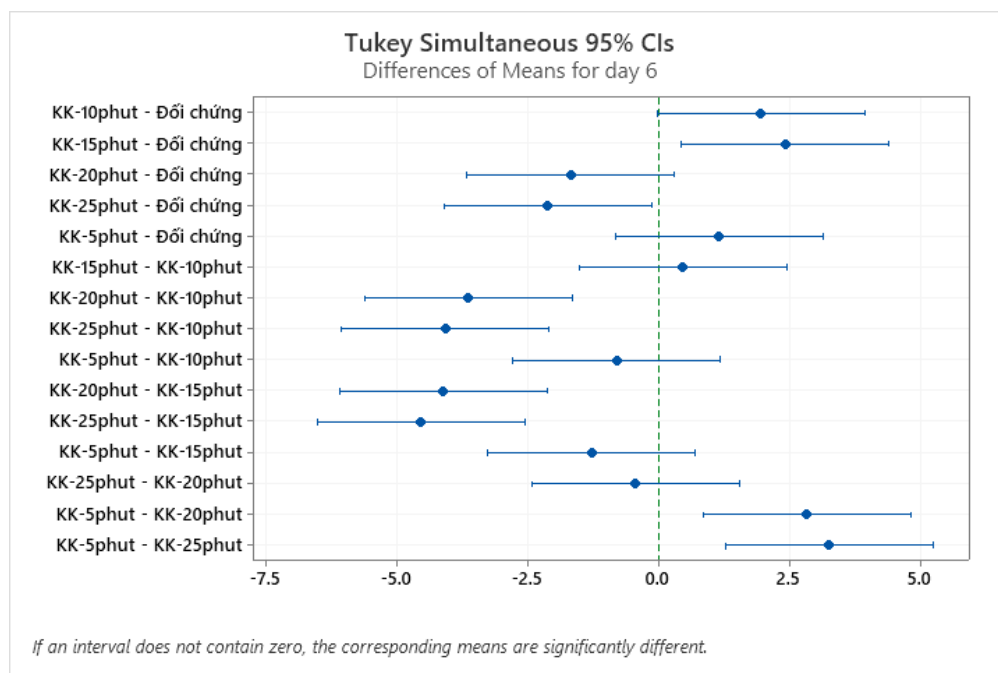
Pooled StDev = 0.721303

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
KK-15phut	3	18.4061	A
KK-10phut	3	17.935	B
KK-5phut	3	17.135	A B
Đối chứng	3	15.983	B C
KK-20phut	3	14.310	C D
KK-25phut	3	13.873	D

Means that do not share a letter are significantly different.

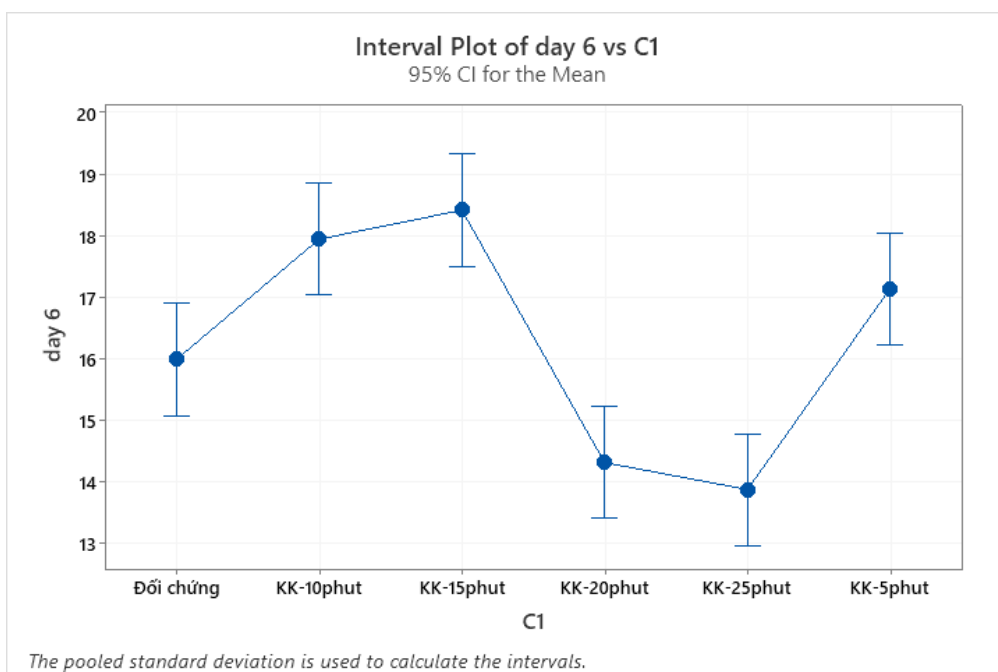
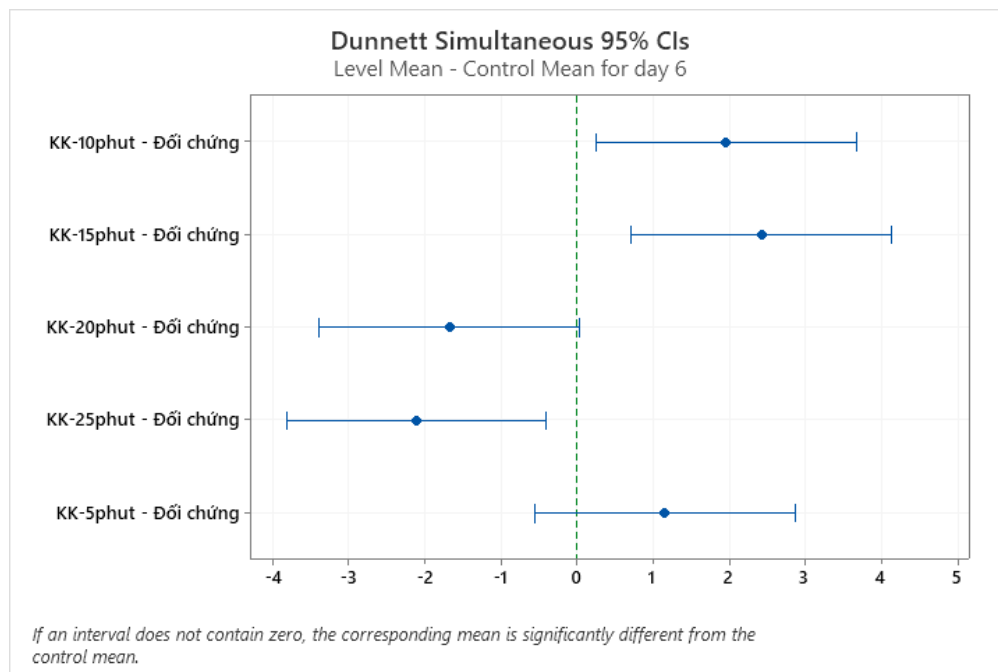


Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	15.983	A
KK-15phut	3	18.4061	
KK-10phut	3	17.935	
KK-5phut	3	17.135	A
KK-20phut	3	14.310	A
KK-25phut	3	13.873	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.



CHLOROPHYLL

Chlorophyll ngày 3

Method

Null hypothesis All means are equal
Alternative hypothesis Not all means are equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels Values
C1	6 Đối chứng, KK-10phut, KK-15phut, KK-20phut, KK-25phut, KK-5phut

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	21.747	4.3494	5.59	0.007
Error	12	9.340	0.7783		
Total	17	31.087			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.882235	69.96%	57.44%	32.40%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	14.358	0.952	(13.248, 15.468)
KK-10phut	3	15.543	1.091	(14.433, 16.653)
KK-15phut	3	15.272	0.651	(14.162, 16.381)
KK-20phut	3	13.529	1.051	(12.420, 14.639)
KK-25phut	3	12.3783	0.0527	(11.2685, 13.4881)
KK-5phut	3	14.995	1.022	(13.885, 16.104)

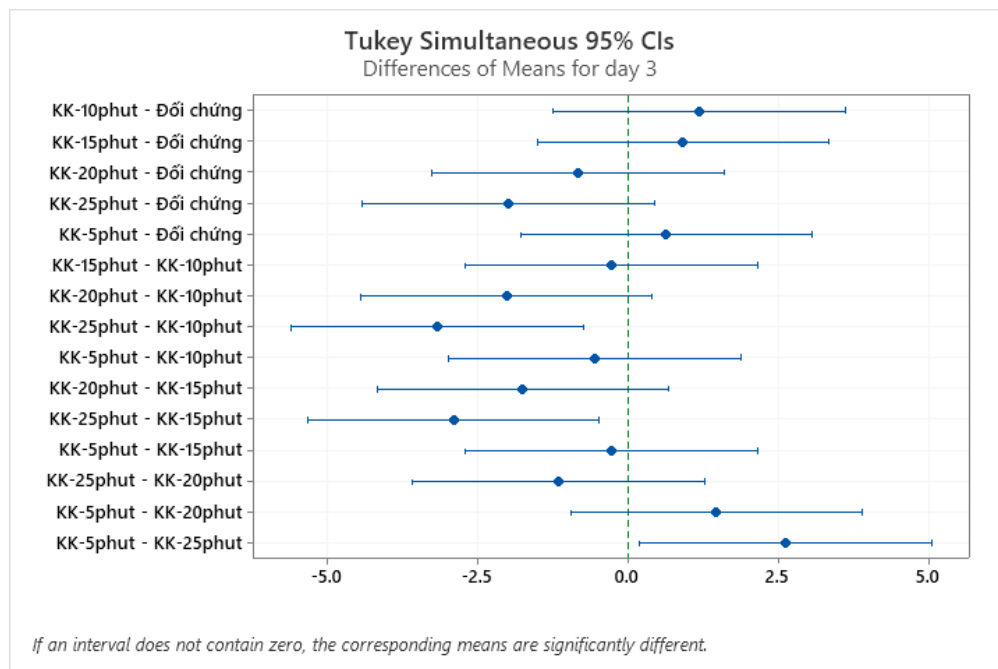
Pooled StDev = 0.882235

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
KK-10phut	3	15.543	A
KK-15phut	3	15.272	A
KK-5phut	3	14.995	A
Đối chứng	3	14.358	A B
KK-20phut	3	13.529	B
KK-25phut	3	12.3783	B

Means that do not share a letter are significantly different.



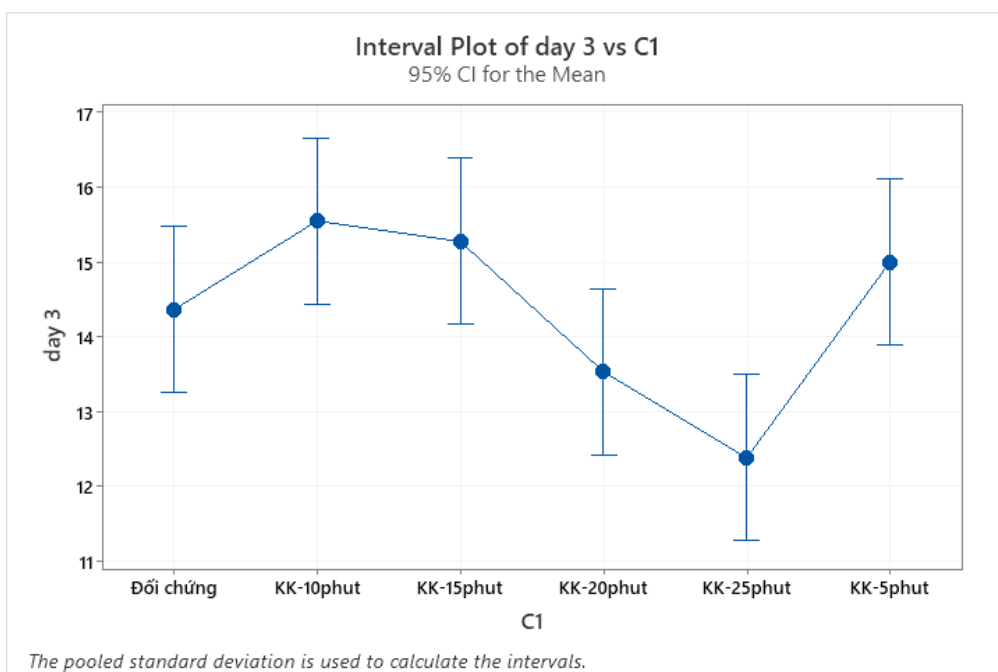
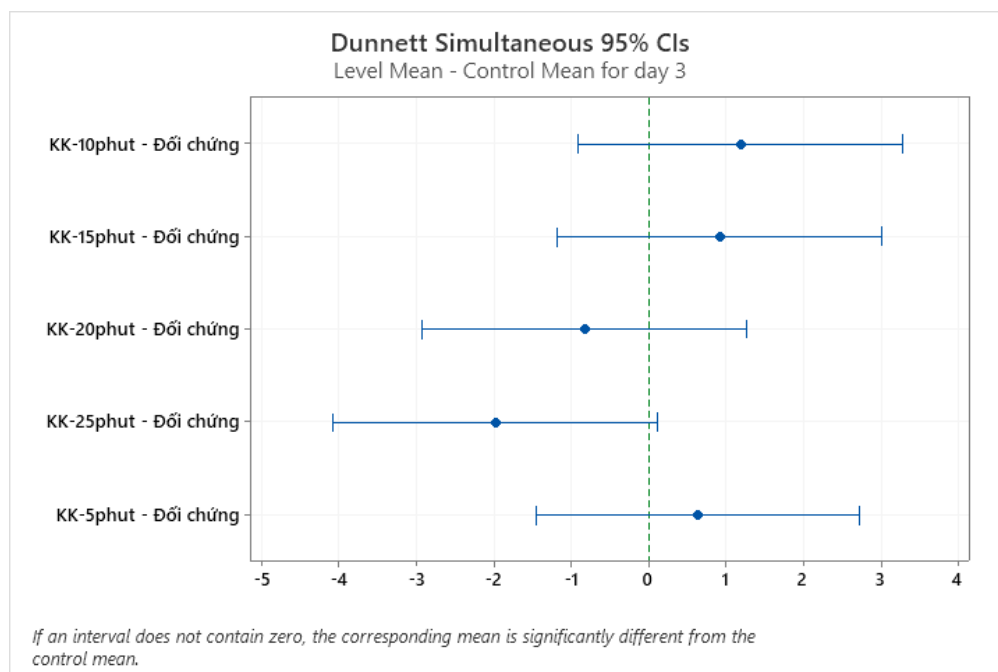
Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	14.358	A

KK-10phut	3	15.543	A
KK-15phut	3	15.272	A
KK-5phut	3	14.995	A
KK-20phut	3	13.529	A
KK-25phut	3	12.3783	A

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.



Carotenoid ngày 15

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	$\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, T10, T15, T20, T25, T5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	2.4081	0.48162	6.80	0.003
Error	12	0.8496	0.07080		
Total	17	3.2577			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.266086	73.92%	63.05%	41.32%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	3.691	0.236	(3.356, 4.025)
T10	3	4.0907	0.0220	(3.7559, 4.4254)
T15	3	4.3680	0.0451	(4.0333, 4.7027)
T20	3	3.751	0.313	(3.416, 4.085)
T25	3	3.185	0.258	(2.851, 3.520)
T5	3	3.893	0.449	(3.559, 4.228)

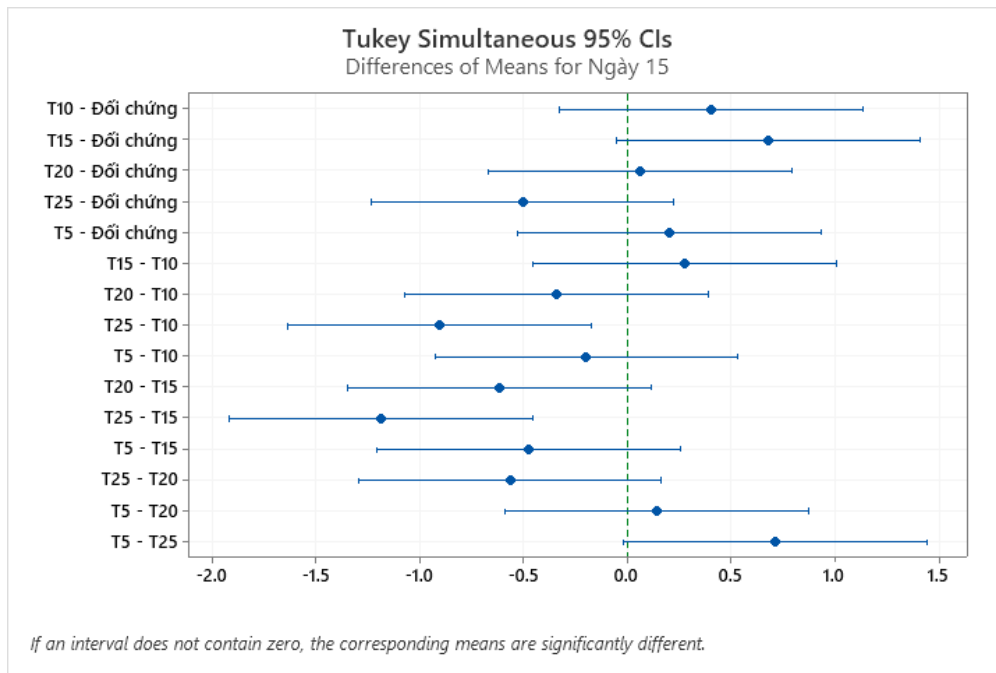
Pooled StDev = 0.266086

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
T15	3	4.3680	A
T10	3	4.0907	A
T5	3	3.893	A B
T20	3	3.751	A B
Đối chứng	3	3.691	A B
T25	3	3.185	B

Means that do not share a letter are significantly different.

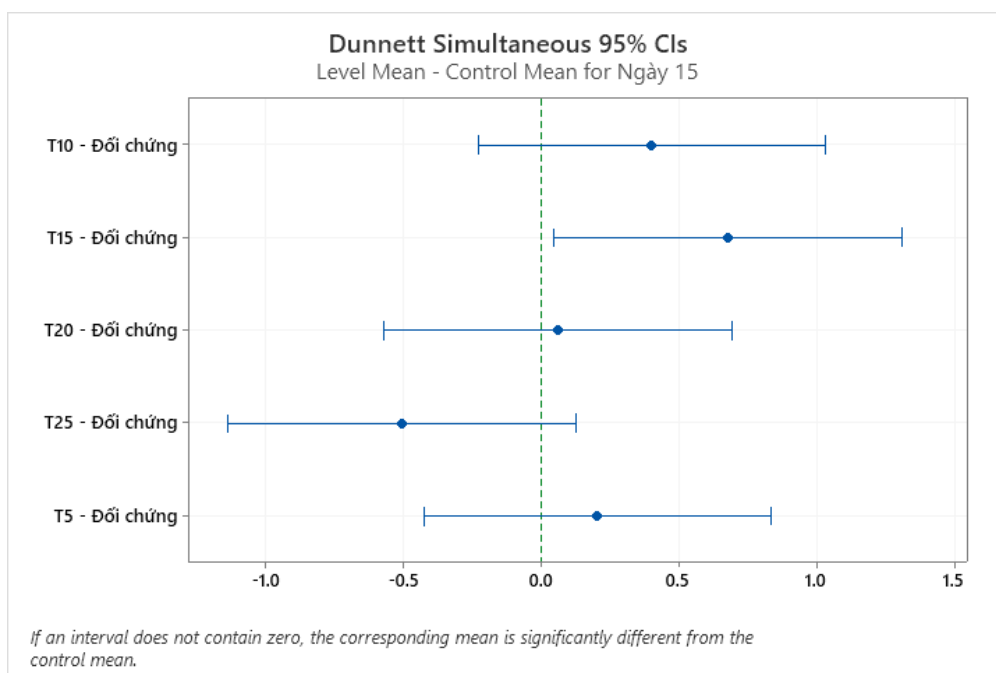


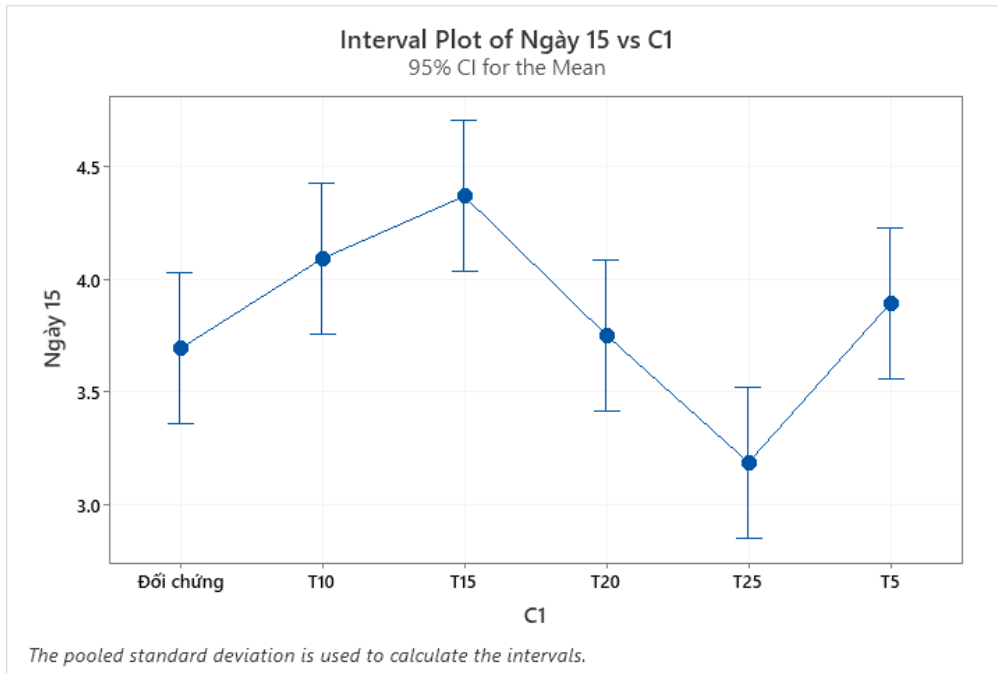
Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	3.691	A
T15	3	4.3680	
T10	3	4.0907	A
T5	3	3.893	A
T20	3	3.751	A
T25	3	3.185	A

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.





CAROTENOID

Carotenoid ngày 12

Method

Null hypothesis All means are equal
Alternative hypothesis Not all means are equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, T10, T15, T20, T25, T5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	1.7516	0.35033	18.21	0.000
Error	12	0.2308	0.01924		
Total	17	1.9825			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.138692	88.36%	83.51%	73.80%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	3.5653	0.0450	(3.3909, 3.7398)
T10	3	3.8480	0.1646	(3.6735, 4.0225)
T15	3	4.0693	0.0428	(3.8949, 4.2438)
T20	3	3.480	0.220	(3.306, 3.654)
T25	3	3.0747	0.1056	(2.9002, 3.2491)
T5	3	3.7213	0.1582	(3.5469, 3.8958)

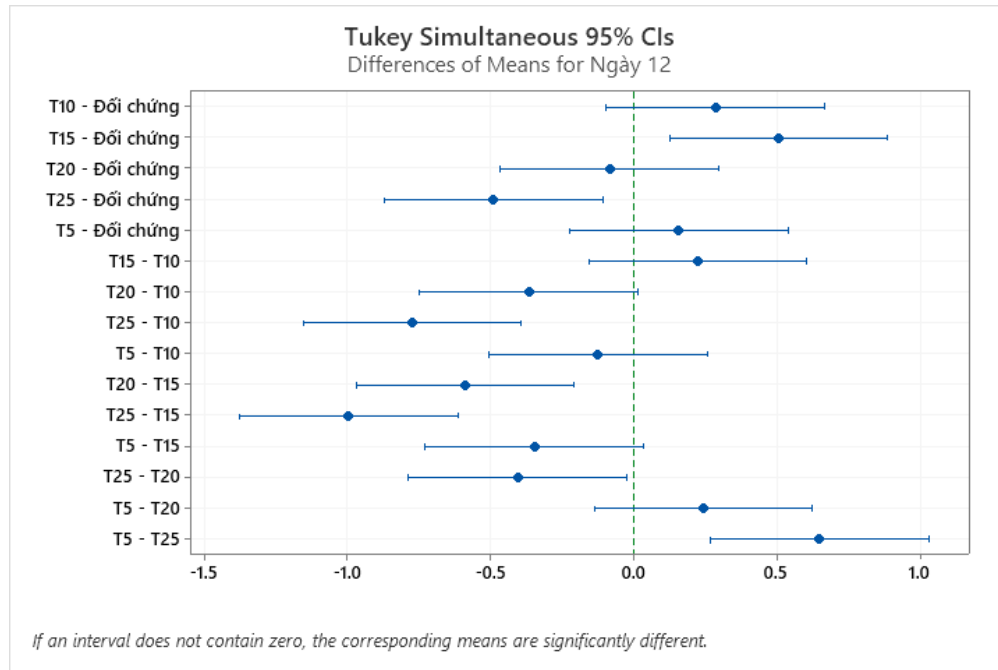
Pooled StDev = 0.138692

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
T15	3	4.0693	A
T10	3	3.8480	A B
T5	3	3.7213	A B
Đối chứng	3	3.5653	B
T20	3	3.480	B
T25	3	3.0747	C

Means that do not share a letter are significantly different.

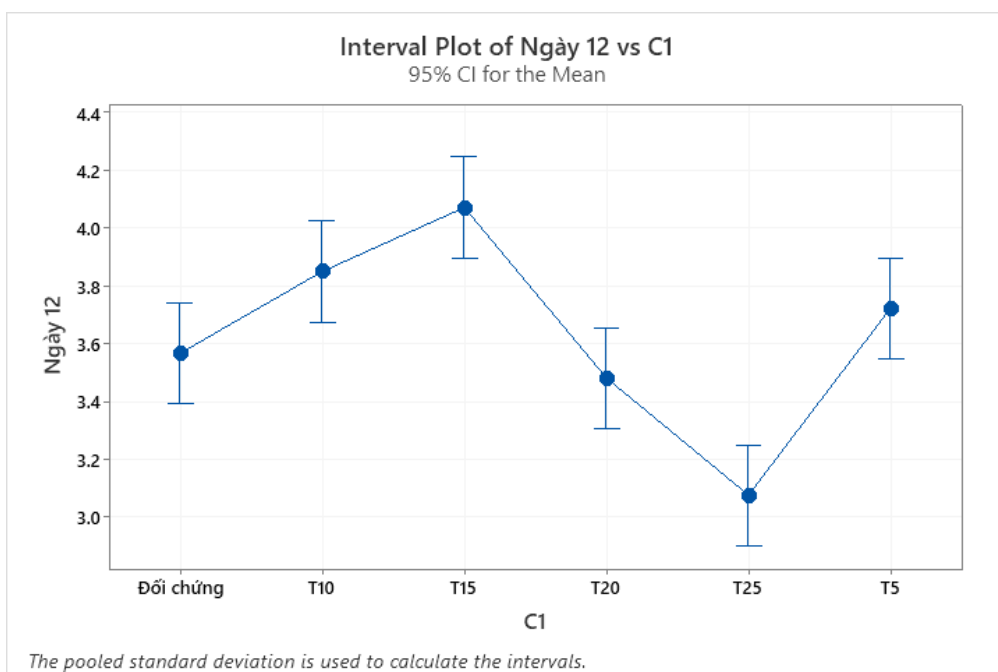
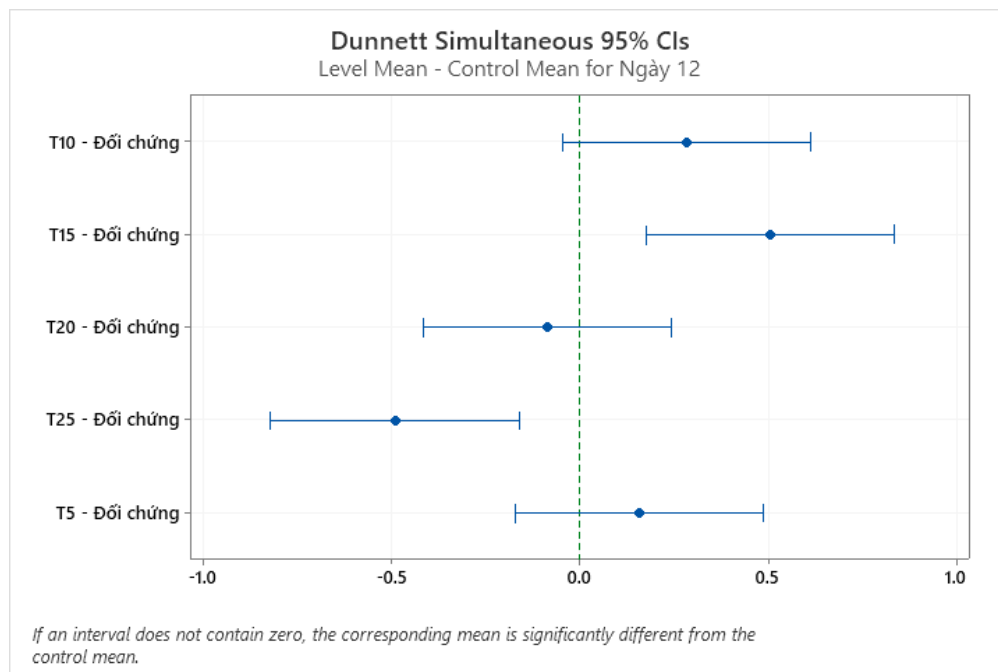


Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	3.5653	A
T15	3	4.0693	
T10	3	3.8480	A
T5	3	3.7213	A
T20	3	3.480	A
T25	3	3.0747	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.



CAROTENOID

Carotenoid ngày 9

Method

Null hypothesis All means are equal
Alternative hypothesis Not all means are equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels Values
C1	6 Đối chứng, T10, T15, T20, T25, T5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	1.32087	0.264174	93.37	0.000
Error	12	0.03395	0.002829		
Total	17	1.35482			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0531915	97.49%	96.45%	94.36%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	3.3293	0.0395	(3.2624, 3.3962)
T10	3	3.7053	0.0757	(3.6384, 3.7722)
T15	3	3.83200	0.00400	(3.76509, 3.89891)
T20	3	3.19067	0.00611	(3.12376, 3.25758)
T25	3	3.0720	0.0760	(3.0051, 3.1389)
T5	3	3.5200	0.0621	(3.4531, 3.5869)

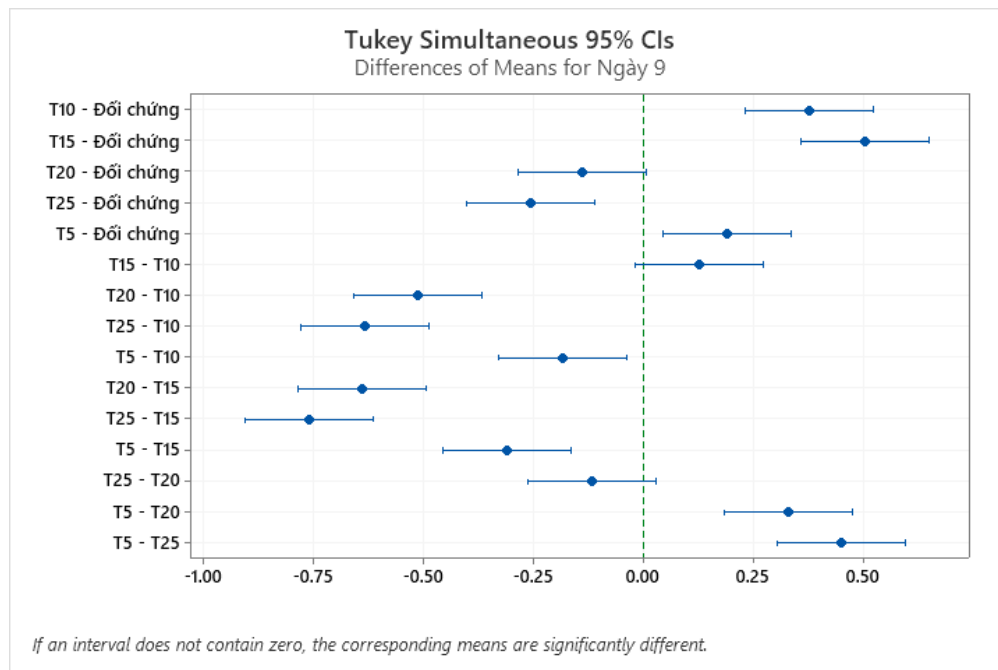
Pooled StDev = 0.0531915

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
T15	3	3.83200	A
T10	3	3.7053	A
T5	3	3.5200	B
Đối chứng	3	3.3293	C
T20	3	3.19067	C D
T25	3	3.0720	D

Means that do not share a letter are significantly different.



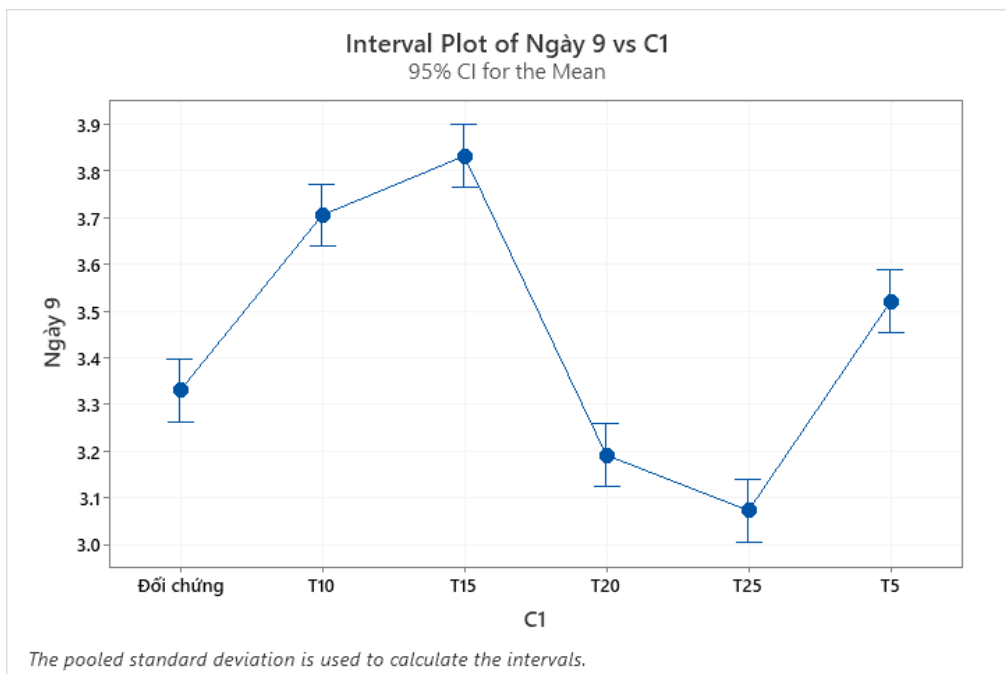
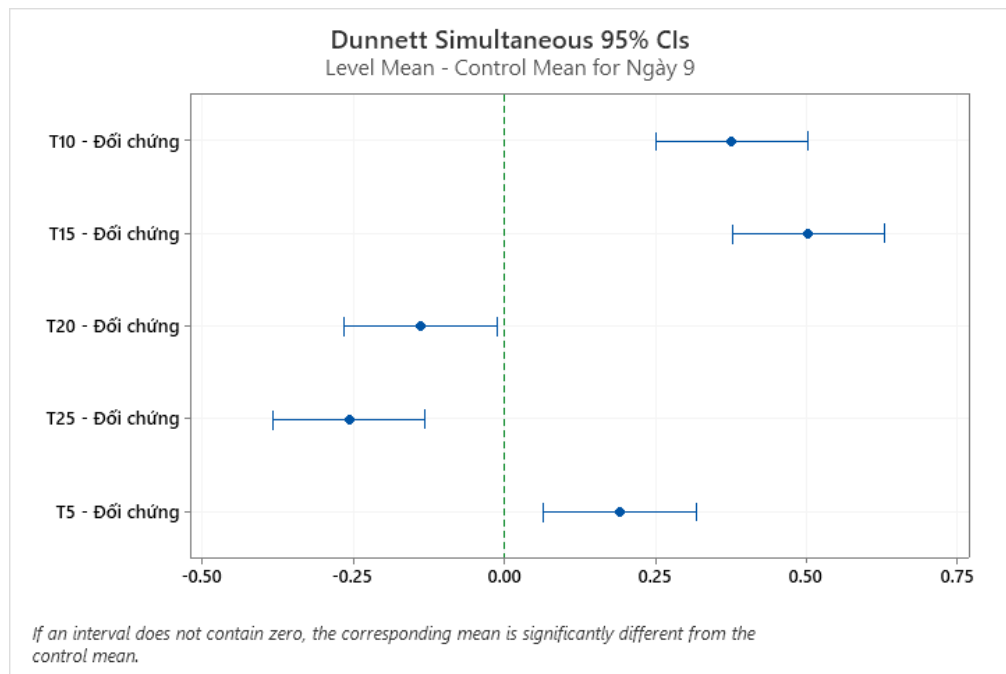
Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng	3	3.3293	A

(control)	
T15	3 3.83200
T10	3 3.7053
T5	3 3.5200
T20	3 3.19067
T25	3 3.0720

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.



CAROTENOID

Carotenoid ngày 6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative	Not all means are

hypothesis equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, T10, T15, T20, T25, T5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	2.2390	0.44780	42.57	0.000
Error	12	0.1262	0.01052		
Total	17	2.3652			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.102567	94.66%	92.44%	87.99%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	3.15467	0.01617	(3.02564, 3.28369)
T10	3	3.4973	0.0830	(3.3683, 3.6264)
T15	3	3.523	0.220	(3.394, 3.652)
T20	3	2.74133	0.01617	(2.61231, 2.87036)
T25	3	2.6107	0.0738	(2.4816, 2.7397)
T5	3	3.3213	0.0455	(3.1923, 3.4504)

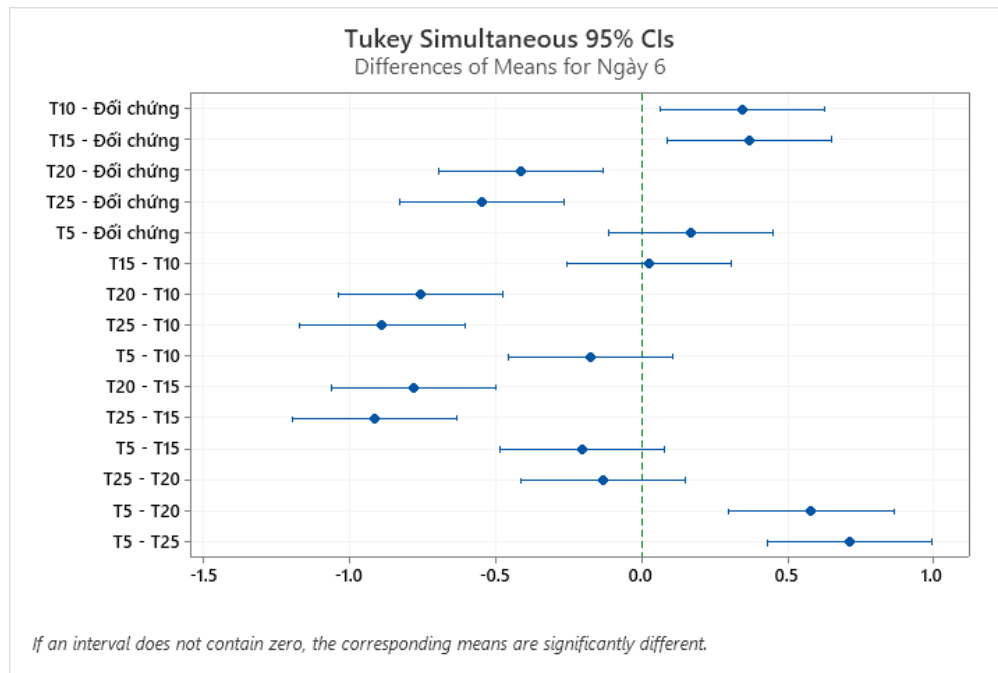
Pooled StDev = 0.102567

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
T15	3	3.523	A
T10	3	3.4973	A
T5	3	3.3213	A B
Đối chứng	3	3.15467	B
T20	3	2.74133	C
T25	3	2.6107	C

Means that do not share a letter are significantly different.

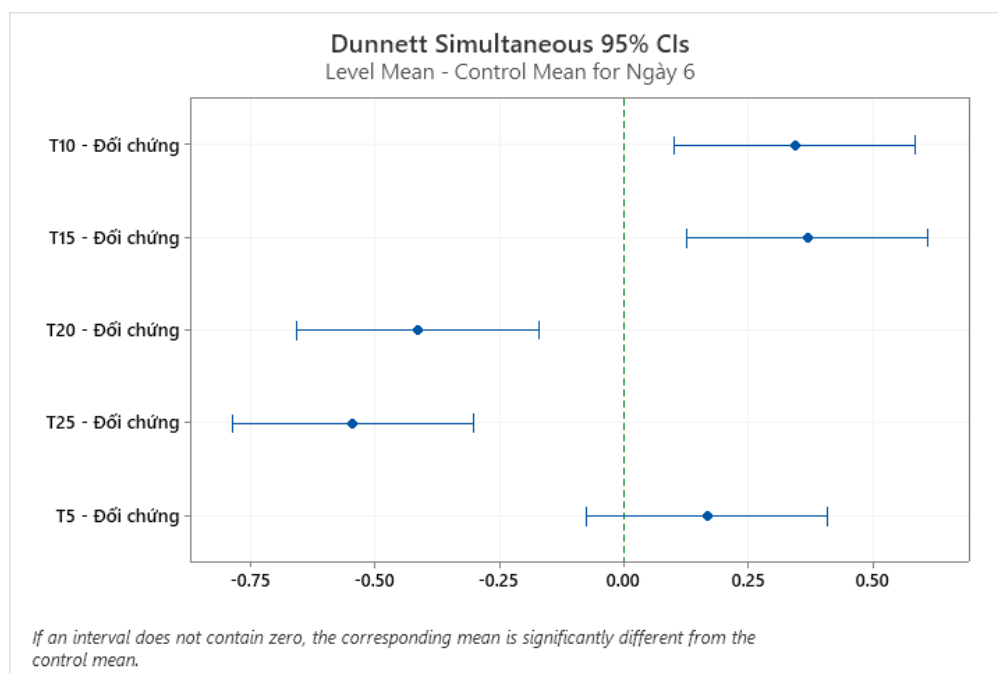


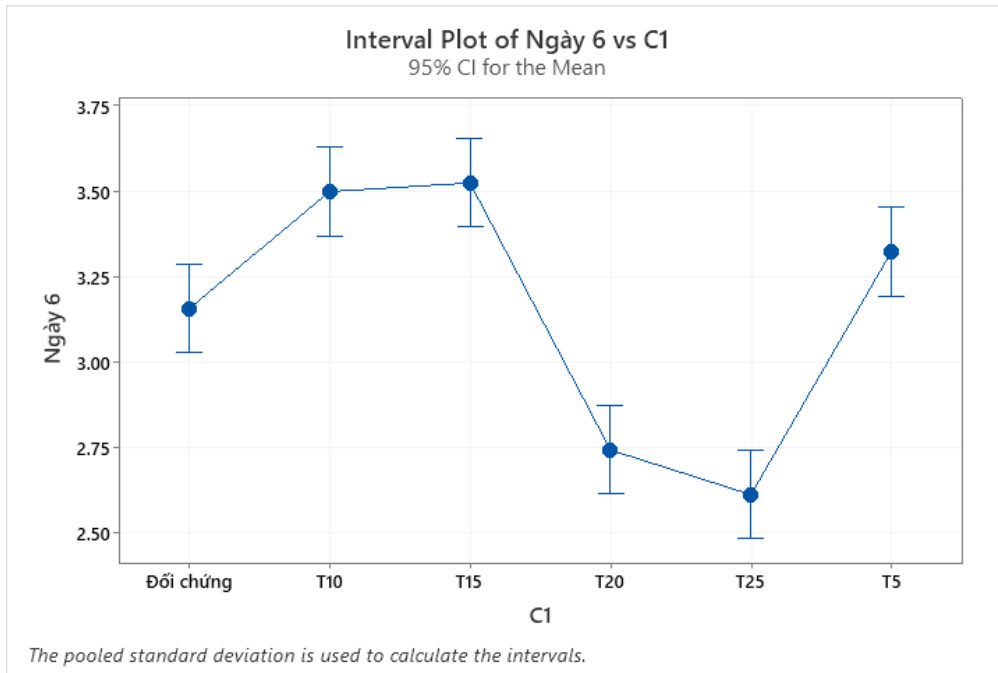
Dunnnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	3.15467	A
T15	3	3.523	
T10	3	3.4973	
T5	3	3.3213	A
T20	3	2.74133	
T25	3	2.6107	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.





CAROTENOID

Carotenoid ngày 3

Method

Null hypothesis All means are equal
Alternative hypothesis Not all means are equal
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	Đối chứng, T10, T15, T20, T25, T5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	0.7382	0.14763	7.83	0.002
Error	12	0.2263	0.01885		
Total	17	0.9644			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.137311	76.54%	66.77%	47.22%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	2.8907	0.1280	(2.7179, 3.0634)
T10	3	3.0400	0.0223	(2.8673, 3.2127)
T15	3	2.9400	0.0560	(2.7673, 3.1127)
T20	3	2.535	0.228	(2.362, 2.707)
T25	3	2.5213	0.0784	(2.3486, 2.6941)
T5	3	2.913	0.187	(2.741, 3.086)

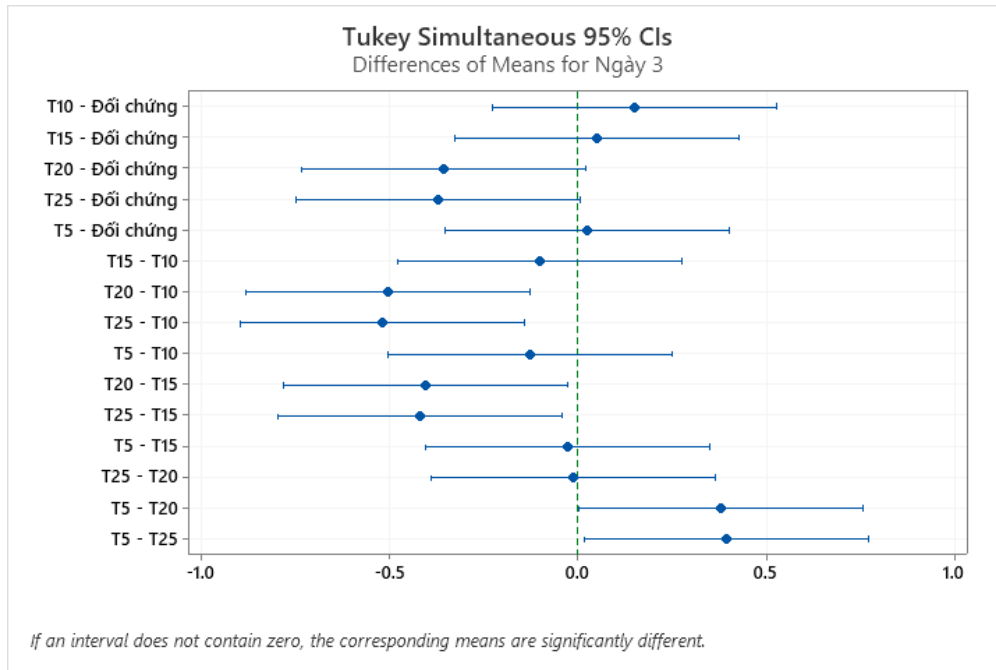
Pooled StDev = 0.137311

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
T10	3	3.0400	A
T15	3	2.9400	A
T5	3	2.913	A
Đối chứng	3	2.8907	A B
T20	3	2.535	B
T25	3	2.5213	B

Means that do not share a letter are significantly different.

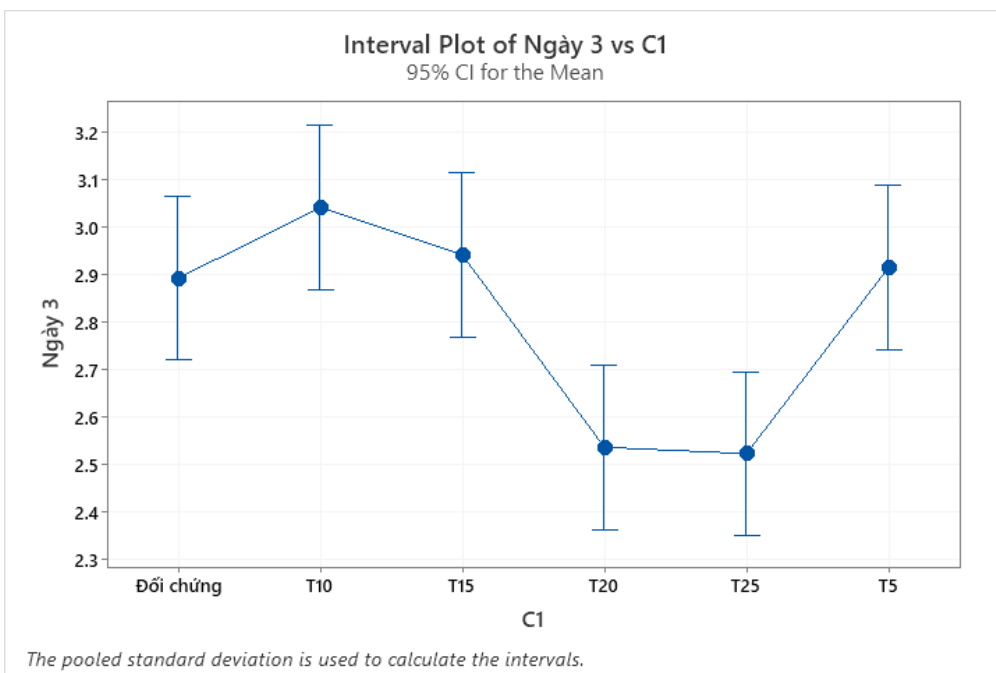
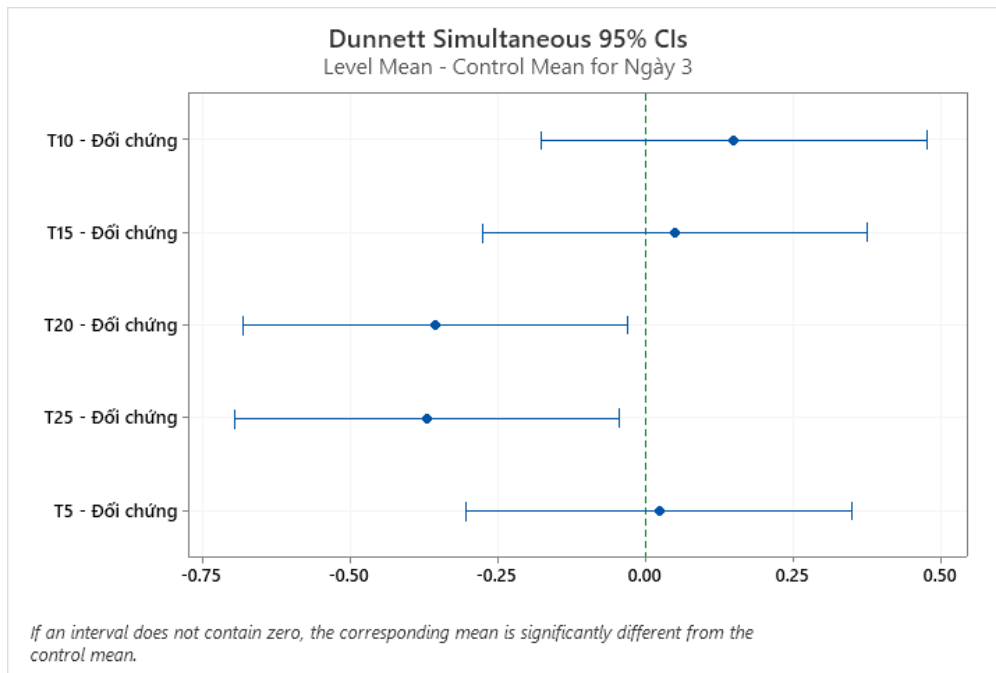


Dunnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
Đối chứng (control)	3	2.8907	A
T10	3	3.0400	A
T15	3	2.9400	A
T5	3	2.913	A
T20	3	2.535	
T25	3	2.5213	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.



AST

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	$\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels Values
C1	6 Đối chứng, T10, T15, T20, T25, T5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	6.6245	1.32490	51.74	0.000
Error	12	0.3073	0.02561		
Total	17	6.9318			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.160023	95.57%	93.72%	90.03%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
Đối chứng	3	2.6103	0.0712	(2.4090, 2.8116)
T10	3	3.5657	0.0672	(3.3644, 3.7670)
T15	3	3.820	0.333	(3.619, 4.022)
T20	3	2.6270	0.0865	(2.4257, 2.8283)
T25	3	2.1350	0.1157	(1.9337, 2.3363)
T5	3	3.4263	0.1122	(3.2250, 3.6276)

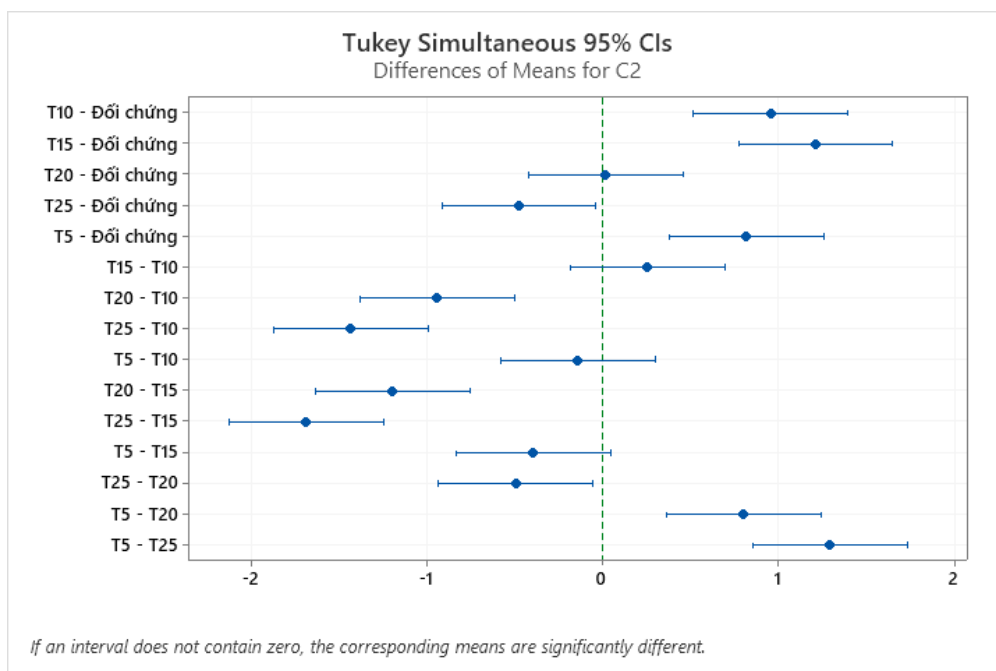
Pooled StDev = 0.160023

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
T15	3	3.820	A
T10	3	3.5657	A
T5	3	3.4263	A
T20	3	2.6270	B
Đối chứng	3	2.6103	B
T25	3	2.1350	C

Means that do not share a letter are significantly different.



Dunnnett Multiple Comparisons with a Control

Grouping Information Using the Dunnnett Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
----	---	------	----------

Đối chứng (control)	3	2.6103	A
T15	3	3.820	
T10	3	3.5657	
T5	3	3.4263	
T20	3	2.6270	A
T25	3	2.1350	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.

