

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY HAI PHA CHO SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY CAO ASTAXANTHIN TỪ VI TẢO LỤC *Haematococcus pluvialis* HB THEO ĐỊNH HƯỚNG LÀM THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE CHO NGƯỜI

Nguyễn Cẩm Hà¹, Lê Thị Thơm¹, Nguyễn Mạnh Đạt^{1,3},
Lê Anh Huy¹, Ngô Thị Hoài Thu¹, Đặng Diễm Hồng^{1,2}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

²Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST

³Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

TÓM TẮT

Vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* là nguồn cung cấp astaxanthin tự nhiên có giá trị cao. Astaxanthin đang được sử dụng như một thành phần dinh dưỡng, phụ gia thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm trên toàn cầu. Việc nuôi trồng vi tảo lục *H. pluvialis* giàu astaxanthin được tiến hành theo quy trình nuôi cấy hai pha. Pha một, tảo được nuôi ở điều kiện thích hợp cho quá trình sinh trưởng và pha hai, tảo được chuyển vào nuôi ở các điều kiện bất lợi (thiếu về dinh dưỡng, ánh sáng cao, nhiệt độ cao v.v) để cho tích lũy astaxanthin. Trong bài báo này, kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố nuôi cấy khác nhau lên sinh trưởng của chủng *H. pluvialis* HB trong bình nhựa 10 L để đạt được mật độ tế bào cao nhất ở pha một, tích lũy astaxanthin cao ở pha hai và tách chiết astaxanthin bằng dầu thực vật sẽ được trình bày. Ở pha một, mật độ tế bào đạt cao nhất là $4,14 \times 10^6$ TB/mL ở ngày nuôi thứ 20 với điều kiện chiếu sáng là 16: 8 giờ (sáng: tối) với 10 giờ ở cường độ ánh sáng cao $85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ và 6 giờ kết hợp cường độ ánh sáng cao và tia cực tím ($30 \mu\text{mol} \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) cùng với phương thức nuôi cấy perfusion. Khi chuyển giai đoạn sang pha hai, dưới điều kiện bổ sung 100 mM bicarbonate, chủng HB chuyển giai đoạn từ tế bào sinh dưỡng sang tế bào cyst trong 5 ngày và hàm lượng astaxanthin tích lũy đạt 39,6 mg/g sinh khối khô. Ngoài ra, astaxanthin tách chiết từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB có hoạt tính chống oxy hóa cao với giá trị IC_{50} đạt 4,09 mg/ mL, đáp ứng tiêu chuẩn là nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

Từ khóa: Astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, hai giai đoạn, nuôi cấy perfusion, vi tảo lục.

MỞ ĐẦU

Astaxanthin là một xanthophyll có sắc tố màu đỏ cam có tính chất hóa học độc đáo dựa trên cấu trúc phân tử của nó với hai nhóm hydroxyl và 11 liên kết đôi liên hợp trong chuỗi polyene (An *et al.*, 2024). Thị trường astaxanthin trên toàn cầu là 1,0 tỷ USD vào năm 2019 và dự đoán sẽ tăng với tốc độ tăng trưởng kép lên 3,4 tỷ USD vào năm 2027. Astaxanthin tự nhiên có đặc tính chống oxy hóa rất mạnh và được ứng dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Khả năng chống oxy hóa của astaxanthin tự nhiên lần lượt lớn hơn 500 lần và 38 lần so với vitamin E và β -carotene (An *et al.*, 2024). Astaxanthin tự nhiên có nguồn gốc từ vi khuẩn biển, nấm men, thực vật bậc cao và vi tảo, trong đó vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* là nguồn astaxanthin tự nhiên dồi dào nhất. Tế bào *H. pluvialis* có dạng hình cầu, chứa lục lạp, có hai roi nên chúng có khả năng di chuyển trong giai đoạn tế bào sinh dưỡng (An *et al.*, 2024). Trong giai đoạn đầu tiên, các tế bào liên tục phân chia vì vậy cần nhiều dinh dưỡng, các tác nhân như cường độ ánh sáng, nhiệt độ và pH đều có ảnh hưởng tới sinh trưởng của tảo. Rizzo và đồng tác giả (2022) đã thông báo về quy trình nuôi cấy hai giai đoạn nhằm đạt được sinh trưởng cao nhất (pha 1) và tích lũy astaxanthin cao nhất (pha 2) đối với chủng *H. pluvialis* CCAP 34/1D. Ở pha 1, urê là nguồn nitơ cho chủng CCAP 34/1D sinh trưởng cao nhất đạt $4,98 \times 10^5$ TB/ mL. Ở pha 2, cảm ứng tích lũy astaxanthin đạt được cao nhất là $0,711 \pm 0,143$ mg/g sinh khối khô (SKK) dưới điều kiện bất lợi về ánh sáng cao, hạn chế nitơ và có mặt natri axetat với nồng độ 0,25% (Rizzo *et al.*, 2022). Pereira và Otero (2020) đã công bố sự tích lũy astaxanthin liên quan đến sự phá vỡ cân bằng nội môi, khiến các tế bào phải tự bảo vệ chống lại các điều kiện bất lợi do suy giảm khả năng quang hợp của tế bào.

Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để tìm ra phương pháp tối ưu cho nuôi trồng vi tảo *H. pluvialis* với hàm lượng astaxanthin cao như phương thức nuôi quang tự dưỡng và dị dưỡng. Kết quả cho thấy khi nuôi dị dưỡng (sử dụng acetate như nguồn C), hàm lượng astaxanthin thấp 3-4 lần khi so với nuôi cấy quang tự dưỡng trong môi trường thiếu nitơ được bổ sung bicarbonate (HCO_3^-) hoặc CO_2 liên tục và chiếu ánh sáng ở cường độ cao (Lưu Thị Tâm *et al.*, 2012). Hiện nay nuôi trồng *H. pluvialis* theo quy trình nuôi cấy 2 pha đã thu được nhiều kết quả nổi bật. Ở Việt Nam, một số công bố về *H. pluvialis* như tối ưu điều kiện nuôi trồng và tích lũy astaxanthin (ở môi trường có nồng độ nitrate cao và kết hợp với việc điều chỉnh chế độ chiếu sáng, làm mới môi trường đã được chứng minh là phương pháp hiệu quả cho mật độ tế bào (MĐTĐ) đạt cực đại là $3,2 \times 10^6$ TB/mL sau

22 ngày nuôi ở môi trường RM-4X (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2012). Trong hệ thống bể phản ứng quang sinh (Photobioreactors-PBRs), sinh trưởng *H. pluvialis* đạt tối đa 40,74 g/m² và hàm lượng astaxanthin đạt 1,3% (w/w) sau 10 ngày nuôi cấy với ánh sáng từ đèn LED đỏ hoặc xanh (Do *et al.*, 2021). Các hệ thống PBRs có gắn màng sinh học ở quy mô nhỏ (0,05 m²) và quy mô lớn (2 m²) đã được thiết kế thành công để nuôi cấy *H. pluvialis* với năng suất SKK đạt 12 g/m²/ngày (có hàm lượng 3% astaxanthin) và 11,25 g/m²/ ngày (2,8% astaxanthin) sau 10 ngày nuôi cấy (Tran *et al.*, 2019). Trong quy trình nuôi cấy hai pha, việc tăng MĐTB tảo ở pha 1 và tìm ra yếu tố chính gây tích lũy astaxanthin ở pha cảm ứng là rất quan trọng để nâng cao hiệu quả sản xuất astaxanthin trong thời gian ngắn ở *H. pluvialis*. Vì vậy, trong bài báo này, kết quả nghiên cứu tối ưu điều kiện nuôi cấy hai pha để tích lũy astaxanthin cao và bước đầu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin tách chiết từ sinh khối vi tảo lục *H. pluvialis* HB sẽ được trình bày.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu: Chủng *Haematococcus pluvialis* HB được phân lập từ các hồ nước ngọt của tỉnh Hoà Bình, Việt Nam năm 2008 và được lưu giữ tại phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng này được nuôi cấy trên môi trường C dưới điều kiện nhiệt độ 25 °C, cường độ chiếu sáng 40 μmol/m²s, quang chu kỳ sáng:tối là 12:12 giờ, lắc bằng tay 2 lần/ngày.

Phương pháp

Xác định sinh trưởng của tảo: Sinh trưởng của tảo được đánh giá thông qua MĐTB, SKK được xác định theo mô tả của Đặng Diễm Hồng (2019).

Phương pháp tách chiết astaxanthin: Sinh khối tảo khô được nghiền với cát thủy tinh nhằm phá vỡ tế bào theo phương pháp cơ học. Sau đó bột tảo được chiết với acetone 90% theo tỉ lệ 5 mg sinh khối: 10 mL dung môi, quá trình này được lặp lại 2 lần để chiết được astaxanthin lớn nhất, dịch chiết được đưa vào - 4°C hoặc giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, dịch chiết được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 5 phút bằng máy ly tâm Sorvall Legen RT 1900W (Kendro, Germany) và đo OD (mật độ quang) ở bước sóng 480 nm sau 24 hoặc 48 giờ tách chiết trên máy quang phổ UV-1601 (Shimadzu, Nhật Bản) để có hiệu suất tách chiết astaxanthin cao nhất. Hàm lượng sắc tố astaxanthin được xác định theo công bố của Strickland và Parson (1972).

Lựa chọn môi trường thích hợp cho sinh trưởng của *Haematococcus pluvialis*. Các môi trường được sử dụng trong thí nghiệm gồm RM, C, OHM, BG-11 cải tiến. **Thành phần môi trường RM** gồm (g/L): NaNO₃ - 300,0; K₂HPO₄ - 80,0; KH₂PO₄ - 20,0; MgSO₄.7H₂O - 10,0; CaCl₂. 2H₂O - 58,5; EDTA - 7,5; NaCl - 20; H₃BO₃ - 0,3; MnSO₄. H₂O - 1,5; ZnSO₄.7H₂O - 0,1; (NH₄)₆Mo₇O₂₄. 4H₂O - 0,3; CuSO₄. 5H₂O - 0,008; Co(NO₃)₂. 6H₂O - 0,26; FeCl₃. 6H₂O - 17. **Thành phần môi trường C** gồm (mg/L): Trisaminomethane - 500,0; Ca(NO₃)₂ - 150,0; KNO₃ - 100,0; β-Na₂glycerolphosphate - 50,0; MgSO₄.7H₂O - 40; EDTA-Na₂ - 2,71; MnCl₂. 4H₂O - 0,108; FeCl₃. 6H₂O - 5,888; Vitamin B₁₂ - 0,0001; Biotin - 0,0001; Thiamine-HCl - 0,01; ZnSO₄. 7H₂O - 0,066; Na₂MoO₄. 2H₂O - 0,0075; CoCl. 6H₂O - 0,012. **Thành phần môi trường OHM** (mg/L): KNO₃ - 410,0; Na₂HPO₄ - 30,0; MgSO₄. 7H₂O - 246,0; CaCl₂. 2H₂O - 110,0; Vitamin B₁₂ - 0,0150; Biotin - 0,025; Thiamine - 0,0175; MnCl₂. 4H₂O - 0,98; Na₂MoO₄. 2H₂O - 0,12; CuSO₄. 5H₂O - 0,012; CoCl. 6H₂O - 0,011; Fe (III)citrate H₂O - 2,62; Cr₂O₃ - 0,075; SeO₂ - 0,005. **Thành phần môi trường BG-11** gồm (mg/L): NaNO₃ - 1500,0; K₂HPO₄ - 320; MgSO₄. 7H₂O - 200,0; CaCl₂. 2H₂O - 36,0; axit citric - 6,0; ammonium ferric citrate - 6,0; EDTA-Na₂ - 1,0; Na₂CO₃ - 100; H₃BO₃ - 2,86; MnCl₂. 4H₂O - 1,81; ZnSO₄.7H₂O - 0,22; Na₂MoO₄. 2H₂O - 0,39; CuSO₄. 5H₂O - 0,08; Co(NO₃)₂. 6H₂O - 0,05. Nuôi cấy tảo ở các bình tam giác 250 mL có chứa 150 mL môi trường, chiếu sáng 40 μmol/m²s, quang chu kỳ sáng: tối là 12:12 giờ, ở 28 °C, không sục khí và lắc bằng tay 2 lần/ngày. MĐTB nuôi cấy ban đầu là 6 x 10⁴ TB/mL. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại ba lần. Lấy mẫu hai ngày một lần để xác định MĐTB và hàm lượng sắc tố.

Ảnh hưởng kết hợp của chế độ chiếu sáng, nồng độ nitrat lên sinh trưởng *H. pluvialis* HB ở pha 1: Thí nghiệm được thực hiện trong bình nhựa 10 L chứa 4 L môi trường RM. MĐTB ban đầu là 0,5 x 10⁶ TB/mL, sục khí liên tục, ở 25 ± 0,5 °C. Có 3 công thức thí nghiệm là: (1) Đối chứng: Vi tảo được nuôi cấy trên môi trường RM - 4X (chứa nồng độ nitrat cao gấp 4 lần môi trường cơ bản RM) chiếu ánh sáng 50 μmol/m²s có chu kỳ sáng: tối là 12:12 giờ; (2) Thí nghiệm 1 (TN): Nuôi cấy tảo trong môi trường RM - 4X chiếu ánh sáng 85 μmol/m²s có chu kỳ sáng: tối là 16:8 giờ; (3) Thí nghiệm 2 (TN + UV): Vi tảo được chiếu ánh sáng cao 85 μmol/m²s kết hợp với tia cực tím (UV; cường độ 30 μmol/m²s) với chu kỳ sáng: tối là 16: 8 giờ. Thứ tự chế độ chiếu sáng là 5 giờ ánh sáng trắng cao, 6 giờ ánh sáng trắng kết hợp tia UV và cuối cùng là 5 giờ ánh sáng trắng cao. Khi thể tích dịch nuôi đã đạt tối đa (5 L) so với bình nuôi, tiến hành kỹ thuật nuôi perfusion, trong điều kiện sục khí liên tục (tốc độ sục khí là 0,5 L/phút). Trong 7 ngày nuôi cấy đầu tiên, nuôi cấy perfusion được tiến hành như sau: 300 mL môi trường RM - 4X được bổ sung hàng ngày vào môi trường nuôi cấy ở tất cả các công thức. Sau đó, tế bào tảo của 300 mL dịch nuôi cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 5.000 vòng/ phút trong 5 phút. Sau đó, giữ lại tế bào và đưa chúng trở lại bình nhựa nuôi cấy bằng cách bổ sung 500 mL môi trường RM - 4X mới. Quá trình này được lặp lại cho đến khi MĐTB nuôi cấy không thay đổi (pha tĩnh trên đường cong sinh trưởng của vi tảo), nồng độ tế bào đạt cao mà không có sự thay đổi về hình thái, nhưng từ ngày nuôi thứ 16 tiến hành thu 1/3 thể tích môi trường nuôi cấy và ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, tế bào được giữ lại và sinh khối thu được hòa tan trở lại vào chai nhựa nuôi cấy. Để tiếp tục duy trì tế bào ở dạng sinh dưỡng với MĐTB cao và hình

thái tế bào không thay đổi, bổ sung 500 mL môi trường RM - 4X có nồng độ gấp 10 lần và hỗn hợp các vitamin như vitamin B1, vitamin H và vitamin B12 ở nồng độ 0,026; 1,0 và 0,02 mg/L, tương ứng, cho đến khi thể tích nuôi cấy cuối cùng bằng thể tích ban đầu.

Ảnh hưởng của nồng độ bicacbonat lên khả năng tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* HB ở pha 2: Các tế bào sinh dưỡng của *H. pluvialis* HB trong giai đoạn sinh trưởng được cô đặc bằng lắng tự nhiên nhằm tạo ra sự tích lũy astaxanthin. Sau khi kết thúc pha 1, MĐTB đạt được cao nhất, các tế bào được giữ trong điều kiện lạnh (5-10°C) trong 2-3 tuần nhằm làm cạn kiệt dinh dưỡng trước khi bắt đầu chế độ cảm ứng astaxanthin. Ở pha 2, dịch tảo được pha loãng bằng nước máy tỷ lệ 1:6 (v:v) và bổ sung dung dịch muối natribicarbonate để đạt được nồng độ cuối cùng trong môi trường nuôi là 60, 80, 100, 120 và 160 mM. Ở pha này, tảo được nuôi cấy trong điều kiện sục khí liên tục (0,5 L/ phút) và chiếu sáng cao (85 μmol/m²s), chu kỳ sáng: tối là 16: 8 giờ trong 5 ngày. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Lựa chọn dung môi thích hợp cho tách chiết astaxanthin từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB: Nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi đến quá trình tách chiết astaxanthin bao gồm: dầu neptune, oliu, palm (dầu cọ), soy bean (dầu đậu tương) và acetone 90%. Thí nghiệm được tiến hành tách chiết với 0,5 g sinh khối khô. Mỗi công việc lặp lại 3 lần. Hàm lượng astaxanthin được xác định theo phương pháp HPLC có dùng chất chuẩn tại Trung tâm Tiêu chuẩn đo lường chất lượng, Bộ Khoa học và công nghệ (Luu TT *et al.*, 2021).

Xác định hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin bằng phương pháp DPPH: Phân tích DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, purity 95%, Alfa Aesar, Japan) được thực hiện theo công bố của Dang và đồng tác giả (2023). Hỗn hợp phản ứng gồm 100 μL dung dịch DPPH 0,2 mM trong methanol và 100 μL astaxanthin (nồng độ 10-500 mg/L). Axit ascorbic (ở nồng độ 4, 20 và 100 μg/mL) được sử dụng làm đối chứng dương. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút; sau đó, độ hấp thụ của DPPH được đo ở bước sóng 517 nm để xác định khả năng khử gốc DPPH của chất chống oxy hóa. Mỗi thí nghiệm được tiến hành ba lần. Khả năng trung hoà gốc tự do (Scavenging – SA) sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\% SA = (OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) * 100 / OD_{\text{đối chứng}} (\%)$$

Trong đó: *OD*_{đối chứng}: Độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử; *OD*_{mẫu thử}: Độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử.

Giá trị IC₅₀ (Half maximal Inhibitory Concentration) được tính dựa vào đường chuẩn $y = ax + b$. Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu càng cao, thể hiện qua giá trị IC₅₀ loại bỏ gốc tự do càng nhỏ.

Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA một thành phần ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

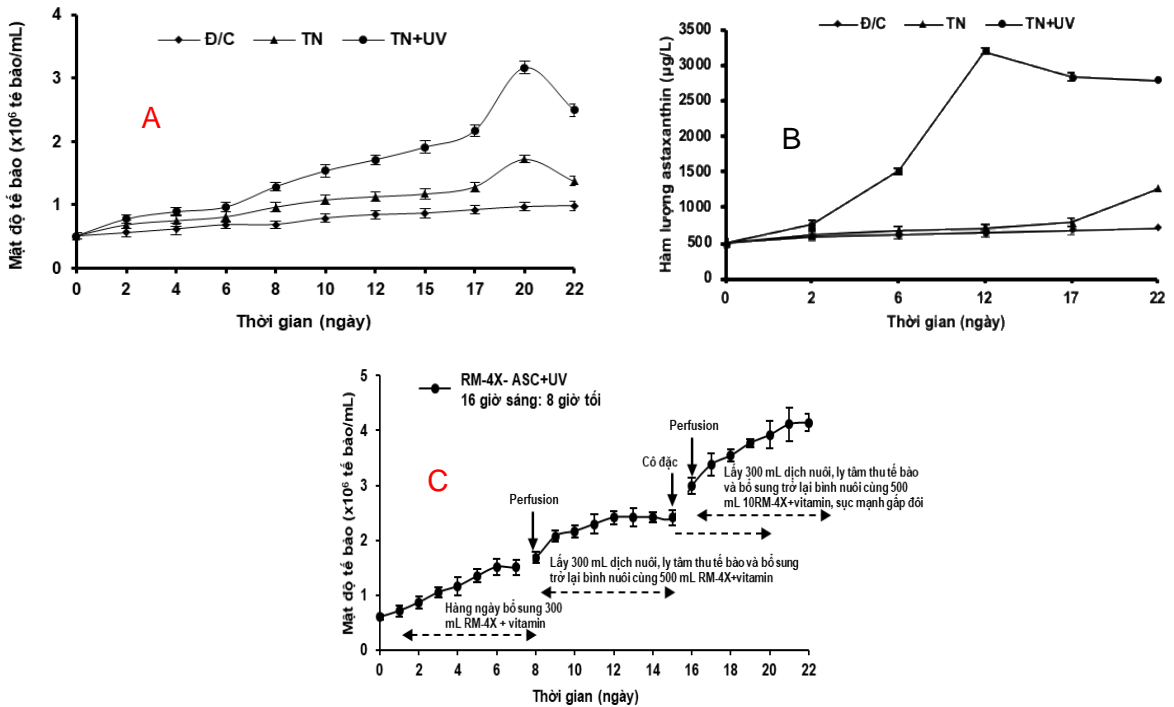
Lựa chọn môi trường tối ưu cho nuôi trồng chủng HB: Kế thừa các nghiên cứu trước về điều kiện nuôi trồng tối ưu của chủng HB là nhiệt độ 25°C, cường độ ánh sáng 2-5 klux và pH 7-9 (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2012; Lưu Thị Tâm *et al.*, 2012), chúng tôi tiếp tục khảo sát sinh trưởng của vi tảo ở 4 môi trường RM, C, OHM, BG-11 cho thấy chủng HB sinh trưởng tốt trong môi trường RM và C (Bảng 1). Kết quả Bảng 1 cho thấy sau 30 ngày nuôi cấy MĐTB, SKK, tốc độ sinh trưởng đặc trưng tối đa ở tảo đạt được là 51,286 x 10⁴ TB/mL; 0,581 g/L và 0,071 μ/ngày. Ngoài ra, quá trình nuôi cấy từ ống nghiệm vào bình tam giác 250 mL bằng cách bổ sung 50% thể tích môi trường nuôi mới với tần suất 2 - 4 ngày/lần là cần thiết để duy trì tế bào phát triển ở pha sinh dưỡng trong thời gian dài. Môi trường C cũng là môi trường nuôi tốt cho sinh trưởng của loài tảo này tuy nhiên trong môi trường C có chứa β-Na₂glycerolphosphate nên giá thành của môi trường này cao hơn khoảng 10 - 12 lần so với môi trường RM. Do vậy, khi tiến hành nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* HB trên các thể tích bình nuôi lớn hơn, môi trường RM vẫn là môi trường tối ưu nhằm giảm chi phí sản xuất sinh khối tảo giàu astaxanthin.

Bảng 1. Sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* HB trong các môi trường nuôi khác nhau

Môi trường	MĐTB (x10 ⁴ TB/mL)	SKK (g/L)	Tốc độ sinh trưởng đặc trưng (μ/ngày)
RM	51,286± 2,867 ^a	0,581±0,004 ^a	0,071± 0,004 ^a
C	40,165± 3,752 ^b	0,455±0,008 ^b	0,031± 0,005 ^b
OHM	22,150± 2,712 ^c	0,251±0,005 ^c	0,049± 0,004 ^c
BG11 cải tiến	14,771± 3,210 ^c	0,136±0,002 ^c	0,037± 0,001 ^c

Ghi chú: Chữ cái a, b, c chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học giữa các công thức thí nghiệm ($p < 0,05$). Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD (n = 3).

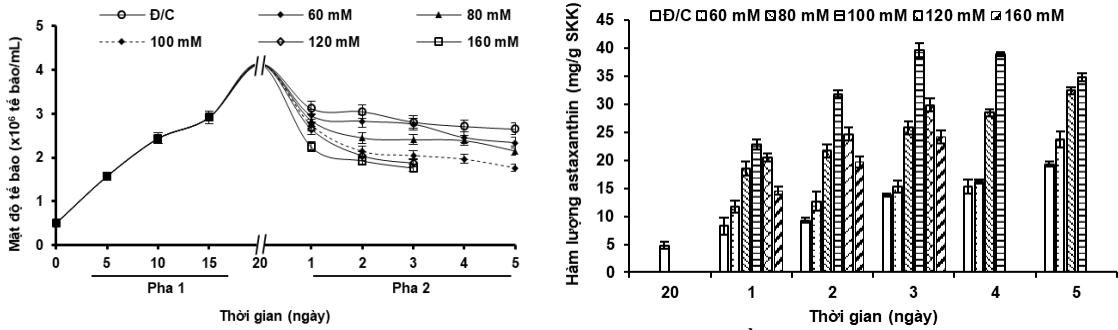
Ảnh hưởng kết hợp chế độ chiếu sáng, nồng độ nitrate lên sinh trưởng của *H. pluvialis*: Wong và đồng tác giả (2016) đã chỉ ra rằng chế độ và chất lượng chiếu sáng rất quan trọng cho sinh trưởng của tảo *H. pluvialis*. Kết quả ở Hình 1 chỉ ra rằng trong giai đoạn sinh trưởng, sự kết hợp thay đổi nồng độ nitrate và chế độ chiếu sáng được coi là hiệu quả, giúp tăng MĐTB của chủng HB ở giai đoạn sinh dưỡng. MĐTB cao nhất đạt $3,16 \times 10^6$ TB/mL ở ngày nuôi thứ 20 dưới điều kiện chiếu sáng với chu kỳ sáng: tối 16: 8 giờ trong đó thời gian sáng là 10 giờ đối với cường độ ánh sáng cao ($85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) và 6 giờ cường độ ánh sáng cao kết hợp với chiếu tia UV ($30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Ở điều kiện này, hàm lượng astaxanthin cao nhất đạt $3.201 \mu\text{g}/\text{L}$ ở ngày nuôi thứ 12. Để tăng MĐTB tảo ở giai đoạn sinh dưỡng, môi trường RM - 4X được bổ sung bằng phương pháp nuôi cấy perfusion sau ngày nuôi thứ 16. Kết quả cho thấy, MĐTB sinh dưỡng của chủng HB tăng lên đáng kể khi nuôi ở công thức thí nghiệm (TN + UV) so với đối chứng (môi trường RM - 4X) có nồng độ cao gấp 10 lần, trong đó có bổ sung hỗn hợp vitamin theo phương thức "perfusion" với MĐTB cao nhất đạt $4,14 \times 10^6$ TB/mL sau 22 ngày nuôi cấy. Viñegla và đồng tác giả (2006) đã công bố sinh trưởng tảo bị ảnh hưởng đáng kể bởi tia UV, đặc biệt là UV-A (320-400 nm) và UV-B (280-315 nm). UV-A cần thiết để điều hoà quá trình quang hợp và các enzyme chính tham gia vào quá trình chuyển hóa C và N ở *Fucus spiralis* và *Ulva olivascens* như carbonic anhydrase và nitrat reductase ngay cả khi có mặt ánh sáng và tia UV-B. Do đó bức xạ tia cực tím có thể hỗ trợ thúc đẩy sự phát triển của tảo (Viñegla *et al.*, 2006). Tuy nhiên, theo báo cáo của Cabello-Pasini và đồng tác giả, nồng độ nitrat cao làm giảm tác động bất lợi của bức xạ tia cực tím và tăng khả năng phục hồi của các enzyme chuyển hóa quan trọng (Cabello-Pasini *et al.*, 2011). Như vậy, việc kết hợp nhiều yếu tố bao gồm việc tăng hàm lượng nitrate trong môi trường nuôi, thay đổi quang chu kì của tảo trong đó bao gồm cả cường độ chiếu sáng, chất lượng ánh sáng và áp dụng kĩ thuật làm mới một phần môi trường trong quá trình nuôi trồng đã làm tăng MĐTB tảo, góp phần quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả sản xuất astaxanthin trong quy trình nuôi cấy hai pha loài vi tảo *H.pluvialis* HB.



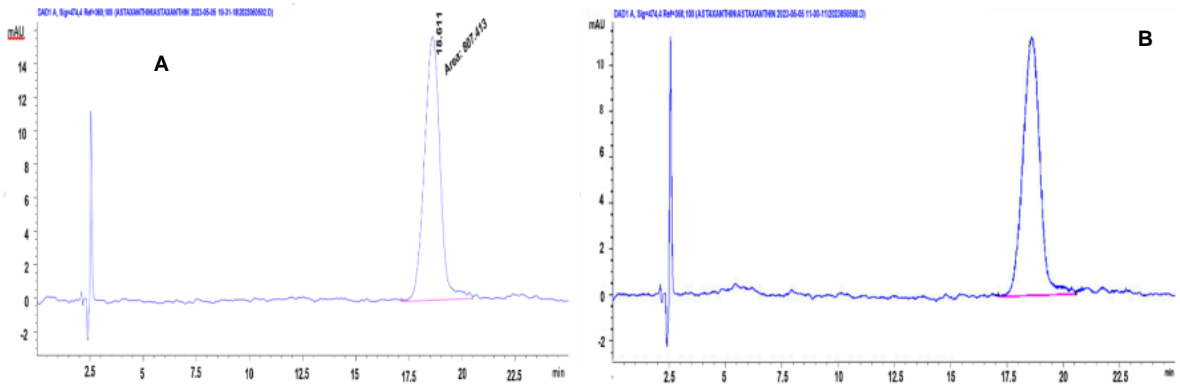
Hình 1. Mật độ tế bào (A), hàm lượng astaxanthin (B) và mô hình nuôi cấy hai pha của *H. pluvialis* (C) dưới điều kiện kết hợp chế độ chiếu sáng, nồng độ nitrate và phương thức nuôi cấy perfusion

Ghi chú: Đối chứng: *H. pluvialis* HB được nuôi cấy trong môi trường RM - 4X dưới ánh sáng $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ sáng: tối là 12:12 giờ; Thí nghiệm (TN): Nuôi cấy vi tảo trong môi trường RM - 4X dưới ánh sáng $85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ có chu kỳ sáng: tối là 16: 8 giờ; (TN + UV): điều kiện chiếu sáng có cường độ $85 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ kết hợp tia cực tím (UV) ở cường độ $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ với chu kỳ sáng: tối là 16:8 giờ.

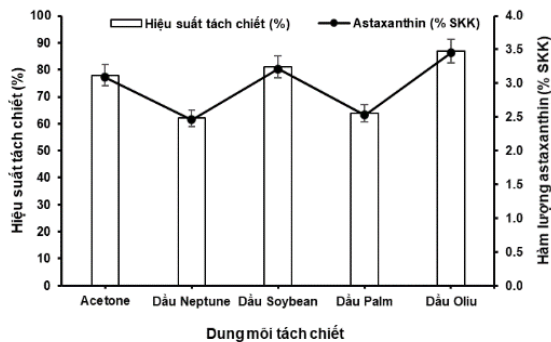
Ảnh hưởng của nồng độ HCO_3^- đến sự tích lũy astaxanthin: Tỷ lệ cacbon/nitơ (C/N) là một yếu tố quan trọng trong quá trình tích lũy astaxanthin ở *H. pluvialis*. Theo Erturk B và đồng tác giả (2019) chỉ ra rằng tăng tỷ lệ C/N bằng cách bổ sung bicarbonate vào môi trường nuôi giúp đẩy nhanh quá trình và tăng hiệu suất tích lũy astaxanthin. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm dùng bicarbonate (HCO_3^-) để cảm ứng mạnh sản xuất astaxanthin ở *H. pluvialis* HB kết hợp thiếu hụt chất dinh dưỡng. Ảnh hưởng của nồng độ bicarbonate trong môi trường nuôi cho thấy, tế bào tảo chủ yếu ở dạng cyst và tích lũy astaxanthin bên trong tế bào. Khi nồng độ bicarbonate tăng từ 0 lên 80 mM, hàm lượng astaxanthin trong tế bào cảm ứng tăng từ 4,76 lên 32,41 mg/g SKK và thời gian cảm ứng kéo dài là 5 ngày. Hàm lượng astaxanthin tối đa đạt được là 39,6 mg/g SKK khi bổ sung bicarbonate 100 mM. Khả năng tích lũy astaxanthin bị ức chế khi nồng độ bicarbonate lớn hơn 160 mM do dư thừa bicarbonate, độ kiềm của môi trường nuôi cao dẫn đến giảm sự phát triển của tảo cũng như sự tích lũy astaxanthin.



Hình 2. Sinh trưởng và tích lũy astaxanthin ở *H. pluvialis* HB dưới các nồng độ bicarbonate (HCO_3^-) khác nhau. Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình \pm SD ($n = 3$).



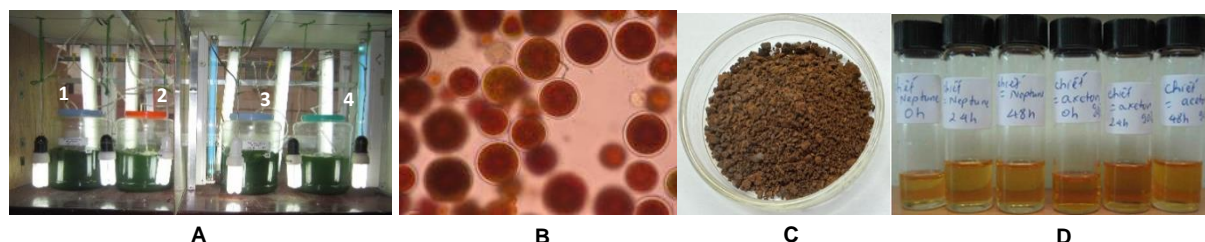
Hình 3. Sắc ký đồ astaxanthin chuẩn (A) và astaxanthin được tách từ sinh khối *H. pluvialis* HB (B)



Hình 4. Hiệu suất tách chiết và hàm lượng astaxanthin thu được từ sinh khối *H. pluvialis* HB ở các dung môi khác nhau

Phân tích hàm lượng astaxanthin trong mẫu sinh khối *H. pluvialis* HB sau khi kết thúc pha hai: Mẫu sinh khối chủng HB đã chuyển đồ được thu sinh khối và xác định hàm lượng astaxanthin đạt 3,96% SKK bằng phương pháp HPLC (Hình 3) có sử dụng astaxanthin chuẩn.

Lựa chọn dung môi thích hợp cho tách chiết astaxanthin từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB: Ảnh hưởng của các dung môi khác nhau (dầu neptune, oliu, palm (dầu cọ), soy bean (dầu đậu tương) và acetone 90%) đến quá trình tách chiết astaxanthin (Hình 4) đã cho thấy dầu oliu có hiệu suất tách astaxanthin là cao nhất (87%), tiếp đến là soy bean- dầu đậu tương (81%), acetone 90% (78%), palm- dầu cọ (64%) và cuối cùng là neptune (62%). Mẫu tảo có hàm lượng astaxanthin 3,96% SKK được xác định là 100%. Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Cũng theo công bố của Kang và Sim (2007) thì sử dụng các loại dầu thực vật thông thường thì astaxanthin tích lũy trong các tế bào nang hóa được chiết với hiệu suất thu hồi đạt trên 87,5 % (Kang và Sim, 2008). Đây được đánh giá là quy trình tối ưu để tách chiết astaxanthin trong ngành công nghiệp thực phẩm do sử dụng quy trình sinh học dung môi đơn giản do giảm bớt được giai đoạn thu hoạch tế bào. Tuy nhiên, giá thành của các loại dầu soy bean, dầu palm và dầu oliu cao hơn dầu neptune từ 1,2; 1,9 và 4,8 lần, tương ứng, và chúng thường khó mua tại thị trường Việt Nam. Chính vì vậy, sử dụng dầu neptune để tách chiết astaxanthin từ sinh khối chủng *H. pluvialis* HB sẽ có hiệu quả kinh tế hơn về giá thành khi tách chiết ở quy mô lớn.



Hình 5. Ảnh minh họa nhân nuôi và tách chiết astaxanthin từ *H. pluvialis* HB

Nhân nuôi tảo *H. pluvialis* HB ở pha 1 (A) (1 và 2: Bình thí nghiệm được chiếu ánh sáng cao, chu kì sáng: tối là 16: 8 giờ; 3 và 4: Bình thí nghiệm được chiếu ánh sáng cao và tia UV, chu kì sáng: tối là 16:8 giờ); Nhân nuôi chủng HB ở pha 2 (B); Sinh khối tảo chủng HB ở pha 2 (C); Astaxanthin tách chiết bằng dầu thực vật từ sinh khối chủng HB (D).

Hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin: Việc sản xuất quá nhiều gốc tự do và giảm lượng chất chống oxy hóa trong cơ thể dẫn đến tăng nguy cơ tổn thương tế bào và là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh. Các hợp chất chống oxy hóa có trong vi tảo có thể ngăn chặn những tác dụng này (Dang *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này, astaxanthin được tách chiết từ sinh khối tảo chủng HB có hoạt tính chống oxy hóa cao, với giá trị IC_{50} đạt 4,09 mg/mL (Bảng 2). Theo AL-Tarifi và đồng tác giả, (2020) đã thông báo, astaxanthin tách từ *H. pluvialis* có khả năng chống oxy hóa thông qua phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH với IC_{50} đạt 12,9 mg/mL và hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin tách chiết phụ thuộc vào phương pháp tách chiết và dung môi tách. Kết quả thu được của chúng tôi cho thấy astaxanthin được tách chiết từ sinh khối chủng HB có hoạt tính chống oxy hóa tốt có thể là nguồn nguyên liệu làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

Bảng 2. Hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin tách chiết từ sinh khối chủng *H.pluvialis* HB

Astaxanthin		Ascorbic acid	
Nồng độ (mg/L)	Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH (%)	Nồng độ (µg/L)	Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH (%)
0,1	6,59 ± 0,23 ^a	4	33,49 ± 0,57 ^a
0,4	11,73 ± 0,05 ^b	20	62,24 ± 1,10 ^b
2	27,56 ± 0,44 ^c	100	92,41 ± 1,52 ^c
IC_{50} (mg/ mL)	4,09 ± 0,25	IC_{50} (µg/ mL)	17,68 ± 0,84

Ghi chú: Ascorbic acid: Đối chứng dương, Astaxanthin tách chiết từ sinh khối chủng *H. pluvialis* HB. Hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin được xác định bằng phương pháp DPPH. Chữ cái a, b, c chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học giữa các công thức thí nghiệm ($p < 0,05$). Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD ($n = 3$).

KẾT LUẬN

Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy hai pha của vi tảo lục *H. pluvialis* HB gồm pha một là môi trường RM có hàm lượng nitrate cao gấp 4 lần ($NaNO_3$ là 1200 mg/L), quang chu kỳ chiếu sáng 16: 8 giờ (sáng: tối) với 10 giờ chiếu cường độ ánh sáng cao 85 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ và 6 giờ kết hợp cường độ ánh sáng cao và tia cực tím (30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) cùng với phương thức nuôi cấy perfusion, mật độ tế bào đạt cao nhất là $4,16 \times 10^6$ TB/mL ở ngày nuôi thứ 20; ở pha hai có bổ sung 100 mM bicarbonate, chủng HB chuyển giai đoạn từ tế bào sinh dưỡng sang tế bào cyst trong 5 ngày và hàm lượng astaxanthin tích lũy đạt 39,60 mg/g SKK. Ngoài ra, astaxanthin tách chiết từ sinh khối tảo *H. pluvialis* HB thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao với giá trị IC_{50} đạt 4,09 mg/mL có thể là nguồn nguyên liệu để sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ bởi đề tài “Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ thần kinh của astaxanthin được tách chiết từ sinh khối vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin trên dòng tế bào thần kinh đệm C6” mã số CSCLO8.07/23-24 (do TS. Nguyễn Cẩm Hà làm chủ nhiệm đề tài).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Tarifi BY, Mahmood A, Assaw S, Sheikh HI (2020). Comparison of Different Organic Solvents on Antioxidant Activity of Astaxanthin Extracted from *Hematococcus pluvialis* Using Colorimetric and Non-colorimetric Methods. *Oriental Journal of Chemistry* 36(3).
- An Y, Kim T, Byon H, Rayamajhi, Lee J (2024). Improved production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using a hybrid open – closed cultivation system. *Applied Sciences* 14(3): 1104.
- Cabello-Pasini A, Macías-Carranza V, Abdala R, Korbee N and Figueroa FL (2011). Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 23:363-369.
- Đặng Diễm Hồng (2019). *Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 749 trang.
- Dang DH, Le TT, Nguyen CH, Ngo THT, Hoang TMH, Luu TT, Nguyen MD, Tran MD, Nguyen VT, Nguyen TMH, Ambati RR

- (2023). Isolation of fucoxanthin from *Sarrgassum oligocystum* Montagne, 1845 seaweed in Vietnam and its Neuroprotective activity. *Biomedicines* 11 (8): 2310.
- Hồng DD, Mai ĐTN, Lâm BD, Tâm LT, Thủy NTT, Hà NC, Thơm LT, Hoàng ĐĐ, Anh HTL, Thu (2012). Ảnh hưởng kết hợp của nồng độ nitrate và chế độ chiếu sáng lên sinh trưởng của vi tảo *Haematococcus pluvialis*. *Tạp chí Sinh học*. 34 (4): 493-499
- Do TT, Tran TBT, Ong NB, Le TL, Nguyen TC, Dang QQ, Le CT, Tran DL, Melkonian M, Tran HD (2021). Effects of red and blue light emitting diodes on biomass and astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* in pilot scale angled twin-layer porous substrate photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Tehcnology and Engineering. Life Sciences/Biotechnology* 63(2): 81-8
- Erturk B (2019). Sodium bicarbonate amendment for enhanced astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis*. *Montana State University - Bozeman, College of Engineering*.
- Luu TT, Dang DH, Ravishankar GA, Rao AR (2021). Chapter 29: Astaxanthin Production and Technology in Vietnam and other Asian countries. In book "Global Perspectives on astaxanthin from Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications". Edited by Golare A Ravishankar, Ambati Ranga Rao. *Elsevier*: 594-633.
- Tran HD, Do TT, Le TL, Nguyen TML, Pham CH, Melkonian M (2019). Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production on angled bench-scale and large-scale biofilm-based photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering* 61(3): 61-70.
- Kang CD, Sim SJ (2008). Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnology Letter* 30(3): 441-444.
- Pereira S, Otero A (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Resesearch* 51: 102027.
- Rizzo A, Ross ME, Norici A, Jesus (2022). A two-step process for improved biomass production and non-destructive astaxanthin and carotenoids accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Applied Sciences* 12(3): 1261.
- Strickland JDH, Parsons TR (1972). A manual of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada* 125: 310.
- Viñebla B, Segovia M and Figueroa FL (2006). Effect of Artificial UV Radiation on Carbon and Nitrogen Metabolism in the Macroalgae *Fucus spiralis* L. and *Ulva olivascens* Dangeard. *Hydrobiologia* 560:31-42
- Wong YK, Ho YH, Ho KC, Lai YT (2016). Effects of light intensity, illumination cycles on microalgae *Haematococcus pluvialis* for production of Astaxanthin. *Journal of Marine Biology and Aquaculture* 2 (2): 1-7.

RESEARCH ON TWO-PHASE CULTIVATION FOR ENHANCING HIGH GROWTH AND ASTAXANTHIN ACCUMULATION FROM GREEN MICROALGAE *Haematococcus pluvialis* HB ORIENTED FOR MAKING THE HEALTH HUMAN PROTECTIVE FOOD

**Nguyen Cam Ha¹, Le Thi Thom¹, Nguyen Manh Dat^{1,3},
Le Anh Huy¹, Ngo Thi Hoai Thu^{1*}, Dang Diem Hong^{1,2}**

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Tachnology (VAST)*

³*University of Science and Technology of Hanoi*

SUMMARY

The green microalga *Haematococcus pluvialis* is widely known as a high-value natural source of astaxanthin. Potential applications of astaxanthin in nutritional ingredient, food color additive, cosmetic, and pharmaceutical is spreading globally. The cultivation of *H. pluvialis* is performed through a two-phase cultivation process. The first phase is dedicated to biomass accumulation under favorable growth conditions, and the second phase is for astaxanthin accumulation under various stress conditions (lack of nutrients, high light, high temperature, etc.). This paper investigated the effect of different culture conditions on the growth of *H. pluvialis* HB in 10 L plastic bottles to achieve the highest cell density in the first stage and high astaxanthin accumulation in the second stage and extraction of astaxanthin using vegetable oil is presented in this study. In the first phase, the highest cell density reached 4.14×10^6 TB/mL on the 20th under a photoperiod of 16: 8 h (light: dark) with 10 h for high light intensity of 85 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ and 6 h for combination of high light intensity and UV (30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) with a perfusion culture process. When transitioning to the second phase, under 100 mM bicarbonate supplementation conditions, the HB strain transitioned from vegetative cells to cyst cells within just 5 days and accumulated a significant amount of astaxanthin, reaching 39.60 mg/g of dry cell weight. Furthermore, the extracted astaxanthin demonstrated considerable antioxidant activity with IC₅₀ value of 4.09 mg/mL, meeting standards as a raw material for health human protective food production.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, astxanthin, two-phase, perfusion culture, green microalgae.

* Author for correspondence: Tel: 02437911059; nhthu@ibt.ac.vn (Dr. Ngo Thi Hoai Thu)