

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG SẮC TỐ A-XTA-XAN-TIN TRONG TẾ BÀO CỦA CHŨNG NẤM MEN *PHAFFIA RHODOZYMA* NT5 ĐƯỢC SỬ DỤNG LÀM THỨC ĂN BỔ SUNG TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

TỔNG KIM THUẬN, TRẦN THANH THỦY

Viện Công nghệ sinh học

A-xta-xan-tin có rất nhiều chức năng sinh học đối với sinh vật: khả năng chống oxy hóa, chống ung thư... Ngoài ra, hợp chất này còn có vai trò rất quan trọng trong ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản. Nếu thiếu a-xta-xan-tin, sản lượng và độ sống sót của cá và các động vật giáp xác nuôi trong trang trại có thể giảm đáng kể. Hơn nữa, đặc tính tạo màu của a-xta-xan-tin còn làm cho thịt cá hồi và vỏ động vật giáp xác có màu đỏ hồng. Màu đỏ hồng này là một thuộc tính cảm quan, liên quan chặt chẽ tới chất lượng và giá trị của sản phẩm. Cá hồi và các động vật giáp xác không tự tổng hợp được a-xta-xan-tin mà chúng phải lấy a-xta-xan-tin từ các nguồn thức ăn [1].

Hiện nay, *Phaffia rhodozyma* là loài nấm men duy nhất được biết đến là có khả năng sinh chất màu a-xta-xan-tin [2]. Theo lý thuyết, loài nấm men *P. rhodozyma* sinh ra một số các carotenoit, trong đó a-xta-xan-tin chiếm tới 83-87%, β -caroten 2-2,5%, echinenon 2-4% và phoenicoxanthin 5-7%. Tuy nhiên, trong thực tế tỷ lệ a-xta-xan-tin chỉ chiếm khoảng 50-80% tổng số lượng carotenoit trong tế bào. A-xta-xan-tin được tổng hợp bên trong tế bào nấm men. Vì vậy, để tách chiết a-xta-xan-tin cần phải phá vỡ tế bào, sau đó dùng các dung môi hữu cơ khác nhau để tách chiết. A-xta-xan-tin phân cực nên kém tan trong nước, nhưng dễ tan trong các dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp hay trung bình như: clô-rô-phoóc, a-xê-tôn, mê-ta-nol, ê-tyl a-xê-tát, ê-ta-nol, đi-ê-tyl ê-te, he-xan, ê-te dầu mỏ... Để tách chiết a-xta-xan-tin từ các mẫu sinh khối tươi, người ta thường dùng các dung môi có khả năng trộn lẫn với nước như: a-xê-tôn, mê-ta-nol và ê-ta-nol ... Các dung môi này vừa có tác dụng làm khan mẫu, vừa hòa tan a-xta-xan-tin. Dịch chiết sau đó được chuyển sang một dung môi không trộn lẫn với nước như

he-xan hoặc ê-te dầu mỏ để loại bỏ các tạp chất tan trong nước. Sau đó, cho bay hơi dung môi để cô đặc dịch chiết và xác định hàm lượng a-xta-xan-tin có trong mẫu [3, 4]. Hàm lượng a-xta-xan-tin của các chủng nấm men *P. rhodozyma* khác nhau là rất khác nhau; nó phụ thuộc vào chủng giống, điều kiện nuôi cấy, phương pháp tách chiết và dung môi sử dụng. Để xác định được chính xác hàm lượng a-xta-xan-tin trong sinh khối của nấm men *P. rhodozyma* chúng tôi tiến hành nghiên cứu lựa chọn các dung môi và các phương pháp tách chiết a-xta-xan-tin phù hợp với điều kiện của Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5 được phân lập ở Việt Nam, đang được lưu giữ trong Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Phòng Các chất hoạt tính sinh học từ vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học.

2. Phương pháp

a. Môi trường nuôi cấy

Chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5 được nuôi cấy trên môi trường Phaffia [2, 5] cải tiến bao gồm (g/l): đường kính: 20; cao nấm men: 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2; KH_2PO_4 : 1; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,1; nước cất: 1000 ml; pH = 5 chỉnh bằng H_2SO_4 và NH_4OH , dịch giống ban đầu là 4%.

b. Nuôi cấy

Nuôi cấy lắc 200 vòng/phút trong bình tam giác ở 22°C. Sau 5 ngày, ly tâm dịch nuôi cấy 5000 vòng/phút trong 10 phút. Sinh khối được sử dụng để xác định hàm lượng a-xta-xan-tin.

c. *Xác định trọng lượng khô*

Bằng phương pháp sấy ở 105°C đến trọng lượng không đổi.

d. *Tách chiết và phân tích hàm lượng a-xta-xan-tin*

- **Phá vỡ tế bào:**

+ Phá vỡ tế bào bằng cát thủy tinh: cân 0,1 g sinh khối khô hoặc 0,7 g sinh khối tươi + 1 g cát thủy tinh. Trộn đều và nghiền bằng cối sứ. Cứ sau mỗi 5 phút lại lấy mẫu ra soi kính và quan sát số lượng tế bào bị phá vỡ.

+ Phá vỡ tế bào bằng bi thủy tinh: cân 0,1 g sinh khối khô hoặc 0,7 g sinh khối tươi + 3 g bi thủy tinh có đường kính 0,2 cm. Trộn đều và lắc trên máy Vortex. Cứ sau mỗi 5 phút lại lấy mẫu ra soi dưới kính hiển vi và quan sát số tế bào bị phá vỡ.

+ Phá vỡ tế bào bằng áp lực: tế bào nấm men được phá vỡ bằng áp lực ở 30.000 psi trên máy phá tế bào. Cứ sau mỗi 5 phút lại lấy mẫu ra soi dưới kính hiển vi và quan sát số tế bào bị phá vỡ.

- **Tách chiết a-xta-xan-tin:** A-xta-xan-tin được tách chiết trực tiếp từ 0,7 g sinh khối tươi

của nấm men đã được phá vỡ thành tế bào bằng các dung môi khác nhau: a-xê-tôn, cồn tuyệt đối, cồn 90° + n: he-xan, a-xê-tôn + ê-te dầu mỏ (PE) theo các phương pháp đã được cấp bằng phát minh sáng chế (patent) về công nghệ sinh học (1994) [4], phương pháp của Johnson M. J. (1979) [5] và của Kelly C. E - Harmon A. W. (1972) [8].

- **Xác định hàm lượng a-xta-xan-tin:** bằng phương pháp đo độ hấp thụ A trên máy quang phổ UV-VIS (Spectrophotometer) [7,8] và hàm lượng a-xta-xan-tin được tính theo công thức của Kelly-Harmon 1972 [8].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. **Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp a-xta-xan-tin của chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5**

Chủng nấm men NT5 được nuôi cấy trong bình tam giác 500 ml có chứa 100 ml môi trường, lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 22°C. Tỷ lệ tiếp giống ban đầu là 4%. Lấy mẫu để xác định khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp a-xta-xan-tin sau 0, 16, 24, 42, 72, 96 và 120 giờ nuôi cấy.

Bảng 1

Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp a-xta-xan-tin của chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5

Thời gian (h)	Sinh khối tươi (g/l)	Sinh khối khô (g/l)	Độ hấp thụ a-xta-xan-tin (467 nm)	Hàm lượng a-xta-xan-tin (µg/g SKK)
0	KXĐ	KXĐ	KXĐ	KXĐ
16	26,2	6,55	KXĐ	KXĐ
24	41,6	10,37	0,082	33,32
42	42,6	10,4	0,139	125,2
72	43,6	10,9	0,182	172,3
96	44,6	11,15	0,244	225,8
120	45,7	11,42	0,386	296,4

Ghi chú: tách chiết a-xta-xan-tin bằng dung môi a-xê-tôn; KXĐ. không xác định; SKK. sinh khối khô.

Từ bảng 1 cho thấy sinh khối nấm men tăng mạnh từ 0 đến 24 giờ nuôi cấy, sau đó tăng chậm dần từ 42 đến 96 giờ và đạt cực đại sau 120 giờ (11,42 g/l). Hàm lượng a-xta-xan-tin cũng tăng theo thời gian và đạt cực đại sau 120 giờ nuôi cấy (296,4 µg/g sinh khối khô).

2. **Nghiên cứu khả năng phá vỡ tế bào của chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5**

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp phá vỡ

tế bào như: phương pháp cơ học, phương pháp hóa học và phương pháp xử lý bằng enzym...[4]. Trong thí nghiệm này, chúng tôi trình bày kết quả phá vỡ tế bào bằng phương pháp cơ học. Cụ thể ở đây tế bào nấm men khô được phá vỡ bằng cát thủy tinh, bi thủy tinh và kết quả được so sánh với phương pháp phá vỡ tế bào bằng máy phá áp lực cao. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2

**Khả năng phá vỡ tế bào khô của chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5
bằng phương pháp cơ học**

Thời gian phá vỡ tế bào (phút)	Số tế bào bị phá vỡ (%)		
	Cát thủy tinh	Bi thủy tinh	Máy phá áp lực
0	0	0	0
5	15	20	28
10	20	27	35
15	35	50	80
20	50	70	100
25	60	83	100
30	75	92	100
35	78	93	100
40	84	95	100
45	85	100	100

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: phá vỡ tế bào bằng máy áp lực cao cho kết quả tốt nhất. Chỉ sau 20 phút, số lượng tế bào bị phá vỡ hoàn toàn đạt tới 100%. Trong khi đó, nếu phá vỡ tế bào bằng bi thủy tinh, thì kết quả này chỉ đạt được sau 45 phút. Phá vỡ tế bào bằng cát thủy tinh cho kết quả thấp nhất (sau 45 phút, chỉ có 85% tế bào bị phá vỡ). Dùng phương pháp phá vỡ tế bào bằng máy phá áp lực cho kết quả cao, tốn ít thời gian hơn 2 phương pháp còn lại nhưng chúng tôi không thể chọn phương pháp này cho các thí nghiệm tiếp sau được vì phương pháp phá vỡ tế bào bằng áp lực thao tác khá phức tạp và không thể phá vỡ lượng sinh khối nấm men lớn. Do đó, trong các thí nghiệm tiếp theo chúng

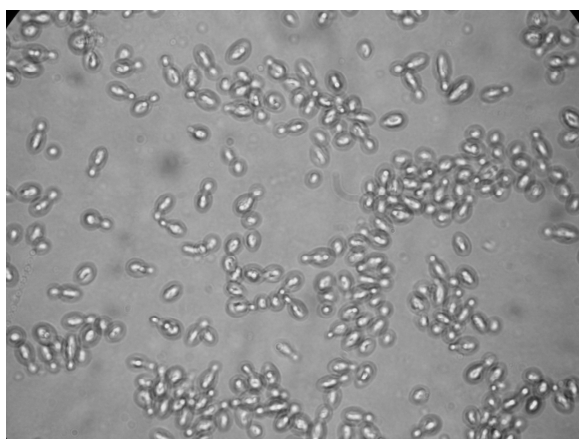
tôi sẽ sử dụng phương pháp phá tế bào bằng bi thủy tinh. Phương pháp này tiến hành vừa đơn giản lại cho hiệu quả cũng không kém hơn so với phương pháp phá vỡ tế bào bằng máy phá áp lực. Nhưng phương pháp phá tế bào bằng bi thủy tinh lại mất nhiều thời gian. Do đó, chúng tôi cần phải nghiên cứu để rút ngắn thời gian đó lại.

Để rút ngắn thời gian phá vỡ thành tế bào và nâng cao hiệu suất tế bào bị phá vỡ từ cùng một lượng sinh khối như nhau, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng phá vỡ tế bào từ nguồn nguyên liệu sinh khối nấm men khô và sinh khối tươi bằng bi thủy tinh. Kết quả thể hiện ở bảng 3 và được minh họa trên hình 1, 2.

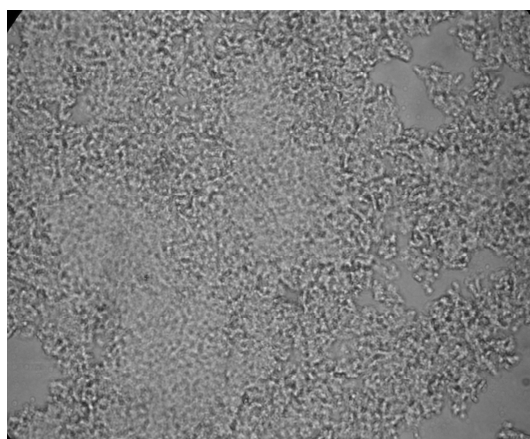
Bảng 3

**Khả năng phá vỡ tế bào nấm men *P. rhodozyma* NT5 từ sinh khối khô và tươi
bằng phương pháp nghiền với bi thủy tinh**

Thời gian phá vỡ tế bào (phút)	Số tế bào bị phá vỡ (%)	
	Sinh khối khô	Sinh khối tươi
0	0	0
5	20	26
10	27	50
15	50	67
20	70	80
25	83	93
30	92	100
40	95	100
45	100	100



Hình 1. Tế bào *P. rhodozyma* NT5 trước khi bị phá vỡ bằng bi thủy tinh



Hình 2. Tế bào *P. rhodozyma* NT5 sau 30 phút bị phá vỡ bằng bi thủy tinh

Từ kết quả ở bảng 3 và các hình 1, 2 cho thấy: hiệu quả phá vỡ tế bào từ sinh khối tươi của nấm men tốt hơn sinh khối khô rất nhiều. Chỉ sau 30 phút, toàn bộ tế bào từ sinh khối tươi hầu như đã bị phá vỡ hoàn toàn. Trong khi đó, chỉ có 92% tế bào từ sinh khối khô bị phá vỡ. Từ các kết quả nghiên cứu này, trong các thí nghiệm sau, chúng tôi sẽ sử dụng bi thủy tinh để phá vỡ tế bào từ sinh khối tươi.

3. Nghiên cứu ảnh hưởng của các dung môi tới quá trình tách chiết a-xta-xan-tin

A-xta-xan-tin là một hợp chất rất dễ bị oxy hoá và bị phá huỷ ở nhiệt độ cao. Bên cạnh đó,

hợp chất này cũng rất nhạy cảm với axit và bazơ. Vì vậy, để ngăn ngừa các tác nhân trên ảnh hưởng đến a-xta-xan-tin, quá trình tách chiết phải được thực hiện ở nhiệt độ thấp và nhất thiết phải bổ sung vào dung môi tách chiết các chất chống oxi hoá như: butyl hydroxytoluen (BHT), butyl hydroxyanisol (BHA)....

Trong thí nghiệm này, quá trình tách chiết a-xta-xan-tin được thực hiện ở 20°C. A-xta-xan-tin được tách chiết trực tiếp bằng các dung môi: cồn tuyệt đối, cồn 90° + n: he-xan, a-xê-tôn, a-xê-tôn + ê-te dầu mỏ (PE) như đã nêu trong phần phương pháp 2. Kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Ảnh hưởng của các loại dung môi tới quá trình xác định hàm lượng a-xta-xan-tin từ sinh khối tươi của nấm men *P. rhodozyma* NT5

Dung môi	Hàm lượng a-xta-xan-tin (µg/g) tính theo TLT	Hàm lượng a-xta-xan-tin (µg/g) tính theo TLK
Cồn tuyệt đối	29,74	118,96
Cồn 90° + n: he-xan	72,5	290,00
A-xê-tôn	74,1	296,40
A-xê-tôn + PE	81,75	327,00

Ghi chú: TLT. trọng lượng tươi; TLK. trọng lượng khô.

Bảng 4 cho thấy: sử dụng dung môi là a-xê-tôn + PE cho hàm lượng a-xta-xan-tin cao nhất, đạt 327,0 µg/g trọng lượng khô. Sử dụng dung môi là a-xê-tôn, cồn 90° + n: hexane để tách chiết a-xta-xan-tin cho hàm lượng thấp hơn (290-296,4 µg/g). Hàm lượng a-xta-xan-tin trong sinh khối nấm men thấp nhất khi sử dụng dung môi

tách chiết là cồn tuyệt đối (118,96 µg/g). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với lý thuyết vì a-xê-tôn có độ phân cực thấp hơn ê-ta-nol. Do đó, a-xê-tôn thích hợp hơn cho việc chiết các phân tử a-xta-xan-tin kém phân cực [3].

Đồng thời, từ kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy hàm lượng a-xta-xan-tin của chủng nấm

men *P. rhodozyma* NT5 cũng gần bằng với hàm lượng a-xta-xan-tin (303,3 µg/g) của chủng nấm men hoang dại *P. rhodozyma* ATCC24202 khi lên men mẻ (Pulsed fed batch fermentation) trong nghiên cứu của Danilo Gomes Moriel et al., 2005 [9] và thấp hơn hàm lượng a-xta-xan-tin trong sinh khối chủng vi khuẩn cổ ưa mặn *Halobacterium* sp. BCC 12460 phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống Thái Lan (555 µg/g) [10]. Hàm lượng a-xta-xan-tin ở sinh khối của chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5 cao hơn rất nhiều so với hàm lượng a-xta-xan-tin (59,4 µg/g) tách chiết được từ phế liệu vỏ tôm tươi trong nghiên cứu của Hoàng Thị Huệ An (2002) [6].

4. Mô tả quy trình xác định hàm lượng a-xta-xan-tin từ chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5

Cân chính xác 0,7 g sinh khối tươi cho vào ống Hatch 10 ml. Thêm 2ml a-xê-tôn (có chứa 200 mg BHT/lít), đậy kín, lắc đều trong 30 phút. Tách lấy dịch chiết a-xê-tôn. Bã còn lại được chiết thêm 2 lần nữa với a-xê-tôn và sau đó chiết thêm 3 lần với ê-te dầu mỏ (PE). Bã chiết lúc này gần như không màu. Gộp tất cả dịch chiết a-xê-tôn và PE lại, cho vào ống ly tâm, thêm nước cất vào, lắc đều. Sau đó ly tâm 3000 vòng/phút

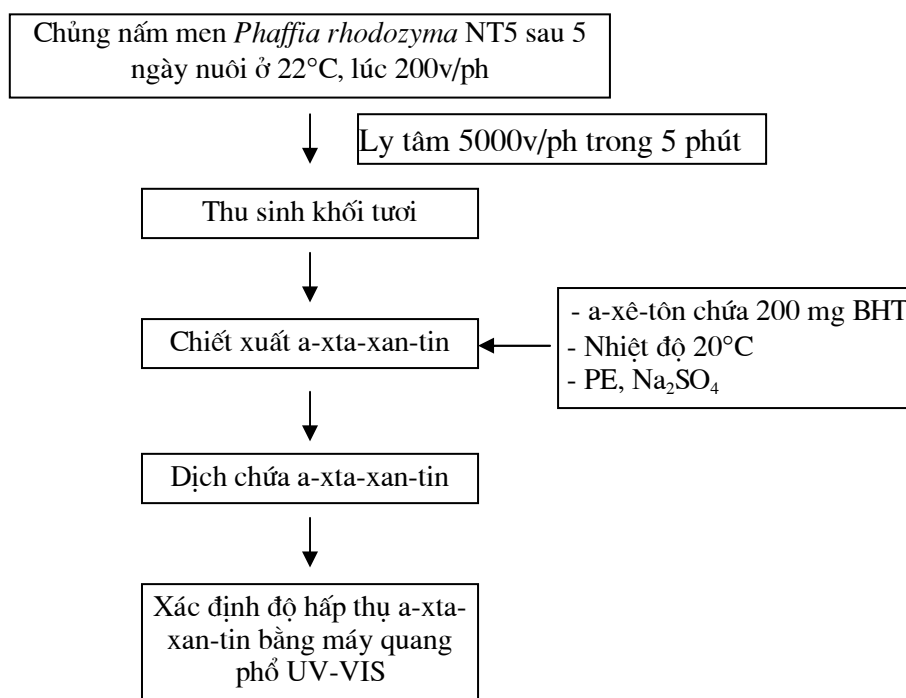
trong 3 phút ở 4°C. Tách lấy pha PE ở trên. Lớp a-xê-tôn ở dưới lại tiếp tục chiết 1-2 lần nữa bằng PE cho đến khi dịch chiết ở trên không màu. Gộp tất cả dịch chiết PE lại và rửa 2 lần bằng nước cất. Sau đó, dịch chiết PE được cho vào bình sẫm màu, lắc kỹ với Na₂SO₄ khan để hút hết nước còn lại. Thu toàn bộ dịch chiết a-xta-xan-tin đã được hoà tan trong PE và định lượng đến một thể tích chính xác (D ml).

- Đo độ hấp thụ (A) của dung dịch thu được trên máy quang phổ UV-VIS với bước sóng 467 nm, cuvette 1 cm (dung dịch đối chứng là ê-te dầu mỏ).

- Hàm lượng a-xta-xan-tin tổng số trong mẫu được tính theo công thức của Kelly-Harmon (1972) [7, 8]:

$$Y = \frac{A.D.10^4}{E_{1cm}^{1\%}.d.G}$$

Ghi chú: Y. µg/g a-xta-xan-tin/g trọng lượng tươi; A. độ hấp thụ của dung dịch ở 467 nm; D. thể tích pha loãng (ml); G. trọng lượng tươi của sinh khối nấm men (gram); d. bề dày cuvette (d = 1 cm); E. hệ số tắt của a-xta-xan-tin (tức độ hấp thụ của dung dịch a-xta-xan-tin 1% với cuvette 1 cm) trong dung môi PE.



Hình 3. Quy trình tách chiết a-xta-xan-tin từ sinh khối nấm men *P. rhodozyma* NT5

III. KẾT LUẬN

1. Nuôi cấy lắc chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5 trong môi trường dịch thể chứa 2% đường kính, pH = 5; tỷ lệ giống ban đầu 4%, nhiệt độ 22°C cho sinh khối khô và hàm lượng a-xta-xan-tin trong tế bào cao nhất sau 120 giờ nuôi cấy.

2. Phương pháp cơ học phá vỡ tế bào bằng nghiền với bi thủy tinh cho kết quả cao hơn so với phương pháp nghiền với cát thủy tinh. Phương pháp này đơn giản, dễ áp dụng.

3. Phương pháp phá vỡ tế bào của chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5 từ sinh khối tươi bằng bi thủy tinh cho hiệu suất cao hơn từ sinh khối khô.

4. Dung môi a-xê-tôn + ê-te dầu mỏ cho hàm lượng a-xta-xan-tin và hiệu quả tách chiết cao nhất.

5. Đã đưa ra qui trình tách chiết a-xta-xan-tin từ sinh khối chủng nấm men *P. rhodozyma* NT5 cho hiệu suất cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <http://aqsc.com/astax.html>.

2. **Andrewes A. G. and Starr M. P.**, 1976: *Phytochemistry*, No. 15: 1009-1012.
3. **Schiedt K. and Liaaen-Jensen S.**, 1995: *Carotenoids, Vol I A: Isolation and Analysis.*, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 81-108.
4. http://www.nal.usda.gov/bic/Biotech_Patents/1994patents/05356810.html.
5. **Johnson E. A. and Lewis M. J.**, 1979: *J. Gen. Microbiol.*, 115: 173-183.
6. **Hoàng Thị Huệ An**, 2002: Bước đầu nghiên cứu chiết xuất astaxanthin từ phế liệu vỏ tôm. Luận văn Thạc sỹ Hóa học.
7. **Meyers S. P. and Thibodeaux P.**, 1983: *J. Aquaculture & Aquatic Sciences*, Vol III, No 4, 64-70.
8. **Kelly C. E. and Harmon A. W.**, 1972: *Fish. Bull.*, 70: 111-113.
9. **Danilo Gomes Moriel et al.**, 2005: ISSN 1516-8913 printed in Brazil, 48(3): 397-401.
10. **Thithiwat B. May et al.**, 2004: *J. Aquaculture & Aquatic Sciences*, II 5: 45-52.

DETERMINATION OF THE PIGMENT CAROTENOID ASTAXANTHIN CONTENT IN THE CELLS OF THE YEAST STRAIN *PHAFFIA RHODOZYMA* NT5 USED AS ADDITIVE FOODS IN AQUACULTURE

TONG KIM THUAN, TRAN THANH THUY

SUMMARY

Astaxanthin is the main carotenoid pigment found in aquatic animals. salmonid, sea breams and shrimps cannot synthesize astaxanthin, therefore, dietary astaxanthin is the only source of body astaxanthin.

The yeast *P. rhodozyma* is one of the new natural astaxanthin sources of biomass product of the *Phaffia* yeast is used as a color additive in aquaculture feeds to increase pink color of salmonid flesh.

The culture conditions, the astaxanthin content of the yeast *P. rhodozyma* NT5 isolated from Vietnam and the influence of astaxanthin extracting methods were studied. The results showed that:

1. The growth of the yeast strain *P. rhodozyma* NT5 in shaken flasks under cultural conditions (concentration of sucrose 2%, pH = 5; temperature 22°C) reached its maximum value after 120 hours (11.42 g/l). The astaxanthin pigment formation began at 24 hours (33.32 µg/g) and the yield of the astaxanthin pigment reached its highest level (285.4 µg/g) after 120 hours. The cell mass were not significantly different from day 3 to day 5.

2. The mechanical method of the cell wall rupture with glass balls having a diameter of 2mm showed the best results. After 30 minutes, 92% of yeast cells were ruptured compared with 75% ones by glass powders. The rupture of the fresh cell walls gave better result (100% compared with 92% of dry cells).

3. The extract of the pigment astaxanthin from fresh yeast mass with acetone + petroleum ether (PE) gave the highest effect; the astaxanthin content reached 327 $\mu\text{g/g}$ dry mater. At the time, astaxanthin content extracted with acetone or ethanol reached only 296.4 $\mu\text{g/g}$ and 118.96 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Ngày nhận bài: 5-10-2006