

NGHIÊN CỨU SỰ THAY ĐỔI HÌNH THÁI TẾ BÀO, HÀM LƯỢNG SẮC TỐ VÀ PROTEIN NỘI BÀO TRONG VÒNG ĐỜI CỦA VI TẢO LỤC *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* NUÔI CẤY TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

ĐINH ĐỨC HOÀNG, LƯU THỊ TÂM,
NGUYỄN THỊ THU THỦY, ĐẶNG ĐIỂM HỒNG

Viện Công nghệ sinh học

Vi tảo lục nước ngọt *Haematococcus pluvialis* (thuộc ngành Chlorophyta, lớp Chlorophyceae, bộ Volvocales, họ Haematococcaceae, chi *Haematococcus*, loài *pluvialis*) [20] được biết đến rộng rãi như là một đối tượng tiềm năng để tổng hợp astaxanthin cao, đạt đến 5 - 6% trọng lượng khô [26], đặc biệt là khi tế bào tảo gặp điều kiện sống bất lợi. Astaxanthin là một loại carotenoit có tác dụng bảo vệ tế bào, giúp chúng chống chịu tốt hơn đối với các yếu tố môi trường bất lợi. Astaxanthin không chỉ là thành phần thức ăn không thể thiếu đối với một số đối tượng nuôi trồng thủy sản, trong đó có cá hồi mà còn là nguồn tiềm năng ứng dụng trong việc chữa trị một số bệnh do chúng có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn β -caroten và vitamin E rất nhiều [17]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, quá trình tổng hợp astaxanthin ở *H. pluvialis* là sự kết hợp giữa việc chuyển hình thái tế bào từ trạng thái sinh dưỡng có hai roi, chuyển động, màu xanh sang nang bào (cyst) không chuyển động, mất roi, có thành tế bào dày, màu đỏ đậm ở giai đoạn nghỉ trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng [2] và tạp dưỡng [11]. Hiện nay, có 2 qui trình công nghệ nuôi trồng được áp dụng để sản xuất astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis*: 1. Qui trình nuôi cấy một pha sử dụng môi trường tối ưu cho tạo sinh khối và tổng hợp astaxanthin. Khi đó, astaxanthin tích lũy ngay bên trong tế bào đang sinh trưởng; 2. Qui trình nuôi cấy 2 pha gồm 2 bước liên tiếp, bước thứ nhất là tạo điều kiện tối ưu cho sinh trưởng sinh dưỡng và bước thứ 2 - cho tích lũy astaxanthin trong tế bào không sinh trưởng [1]. Đây là phương pháp nuôi cấy có hiệu quả cao để sản xuất astaxanthin ở qui mô thương mại.

Astaxanthin là một dạng carotenoit có giá trị

thương mại lớn do các ứng dụng đa dạng và có giá thành cao (khoảng 2.500-3.000 đôla/kg) [15]. Hiện nay, astaxanthin có thể được sản xuất bằng cả 2 phương pháp hóa học và sinh học. Tuy nhiên, sinh tổng hợp nhân tạo astaxanthin là một quá trình phức tạp làm cho giá thành của nó cao. Ngoài ra, astaxanthin tổng hợp hóa học còn lẫn nhiều tạp chất, những chất này sẽ ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm. Tất cả các yếu tố này đã làm cho việc sử dụng các astaxanthin có nguồn gốc tự nhiên có những lợi thế và tiềm năng to lớn [5, 9].

Ngày nay, tất cả astaxanthin thương mại phục vụ cho nuôi trồng thủy sản được sản xuất từ các chất có nguồn gốc dầu mỏ (petrochemical sources) với doanh thu trên 200 triệu đôla và giá bán là 2.000 đôla/kg astaxanthin tinh khiết. Công nghệ sản xuất astaxanthin nhân tạo là bí quyết công nghệ. Trên thế giới chỉ có công ty DSM (Thụy Sĩ) với sản phẩm là Carophyll Pink 10% CWS (có bán tại thị trường Việt Nam) và BASF (Đức) với sản phẩm là Lucantin Pink. Trong khi đó, mặc dù astaxanthin tự nhiên có chất lượng tốt hơn nhưng chỉ chiếm 5% thị trường vì khó khăn về công nghệ. Hiện nay, trên thế giới có một số công ty sản xuất astaxanthin từ *H. pluvialis* như Fuji Health Science Inc (Nhật Bản); Alga Tech (Israel); Cynotech (Mỹ); Mera Pharmaceuticals (Mỹ); Parry Nutraceuticals (Ấn Độ); Yunnan Green A Biological Project Co., LTD (Trung Quốc). Từ nấm men (*Phaffia rhodozyma*) có công ty Acher Daniel Midland (Mỹ). Từ vỏ tôm (*Pandalus borealis*) có công ty BioPrawns (Norway) [8, 15].

Hình thái tế bào vi tảo *H. pluvialis* có sự biến đổi khác nhau trong chu trình sống của chúng. Các tế bào sinh dưỡng màu xanh với hai

roi, có khả năng chuyển động, sinh trưởng dưới điều kiện quang tự dưỡng [3] và dị dưỡng trong tối [12]. Khi gặp điều kiện bất lợi (như đói dinh dưỡng, cường độ ánh sáng, nhiệt độ cao, nồng độ muối trong môi trường thay đổi lớn...) sẽ cảm ứng việc hình thành nang bào tử và tế bào chuyển từ trạng thái sinh dưỡng sang dạng bào tử bất động (tế bào cyst) [10] bắt đầu tích lũy astaxanthin. Thời gian chuyển pha này mất khoảng vài tuần trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng [7] hay trong môi trường nuôi có acetate nhưng thiếu nitơ [25] và photpho [23]. Một số công trình nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng khi nồng độ acetate trong môi trường cao sẽ rút ngắn thời gian chuyển giai đoạn của vi tảo *H. pluvialis* xuống còn khoảng vài ngày [10]. Đồng thời với sự thay đổi hình thái và kích thước của tế bào là quá trình thay đổi hàm lượng sắc tố và protein nội bào trong đó có diễn ra sự tích lũy astaxanthin cao. Theo một số công bố cho thấy hàm lượng chlorophyll không thay đổi trong suốt quá trình tích lũy astaxanthin [6], nhưng trong nghiên cứu của Sperry, 1970 [21] lại cho rằng hàm lượng này có xu hướng giảm đi.

Hiện nay, nuôi trồng loài vi tảo *H. pluvialis* đang gặp rất nhiều khó khăn. Nguyên nhân chính là do tảo này có tốc độ sinh trưởng chậm và chu kỳ sống phức tạp, được thể hiện tế bào có thể ở giai đoạn vận động và không hoặc giai đoạn tế bào tồn tại đơn độc hoặc theo nhóm trong palmella [14, 24], nhưng những giai đoạn nêu trên đều chưa được làm sáng tỏ. Ở Việt Nam, vi tảo lục *H. pluvialis* là đối tượng nghiên cứu hoàn toàn mới. Do đó, để triển khai nuôi trồng loài vi tảo này ở qui mô lớn, cần hiểu được các đặc điểm chính về chu trình sống cũng như một số đặc điểm sinh học của nó.

Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu về sự thay đổi hình thái tế bào và xác định sự biến đổi về hàm lượng sắc tố, protein nội bào ở tế bào vi tảo lục *H. pluvialis* ở cấp độ bình tam giác 250 và 500 ml trong điều kiện phòng thí nghiệm nhằm tìm hiểu vòng đời tự nhiên của tảo trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau làm cơ sở khoa học cho qui trình nuôi cấy 2 pha để sản xuất astaxanthin ở vi tảo này đạt 4-6% trọng lượng khô.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Chủng tảo và điều kiện nuôi cấy: Chủng *Haematococcus pluvialis* Flotow sử dụng trong thí nghiệm do phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Tảo được lưu giữ và nhân giống sơ cấp trong môi trường C, ở 25°C, dưới cường độ chiếu sáng 2 klux, với chu kỳ sáng tối là 12: 12 giờ.

2. Phương pháp

Chủng tảo *Haematococcus pluvialis* Flotow được nuôi trong môi trường C khoảng 2-3 ngày, khi đó các tế bào chủ yếu ở trạng thái sinh dưỡng (chiếm 80-90% so với tổng số tế bào). Dịch tảo nuôi cấy này được ly tâm ở 6000 vòng/5 phút. Loại bỏ phần dịch trên, thu cặn tế bào và bổ sung môi trường RM và C mới. Lắc đều và chia dịch tảo vào các bình tam giác 250 và 500 mL có chứa 150 và 350 mL dịch tảo/bình, tương ứng để tiến hành thí nghiệm.

Thí nghiệm vòng đời được tiến hành trong 2 môi trường RM và C ở cấp độ bình tam giác 250 và 500 mL. Thành phần môi trường RM và C sử dụng theo công bố của Rudic, 2005 [19]. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Mật độ tế bào tảo ban đầu trong các công thức thí nghiệm là 6×10^4 tế bào (TB)/mL. Các bình tam giác chứa dịch tảo được nuôi đến khi màu sắc dịch tảo chuyển từ màu xanh sang màu đỏ đậm. Khi đó, dịch tảo nuôi cấy được ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút, thu lấy tế bào và chuyển sang môi trường RM và C mới để cho tế bào nảy mầm trở lại dưới điều kiện ở 25°C, cường độ ánh sáng 2 klux với chu kỳ sáng tối 12: 12 giờ.

Ở 24 giờ đầu tiên, lấy mẫu 2 giờ/lần để quan sát sự thay đổi về hình thái và kích thước tế bào. Sau 24 giờ, mẫu được lấy 2 ngày/lần để xác định hình thái, kích thước tế bào, hàm lượng sắc tố và protein nội bào.

Vòng đời tự nhiên của vi tảo *H. pluvialis* trong hai môi trường C và RM được xác định thông qua sự thay đổi hình thái, kích thước và mật độ tế bào; hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, astaxanthin) và protein nội bào qua các giai đoạn sinh trưởng khác nhau.

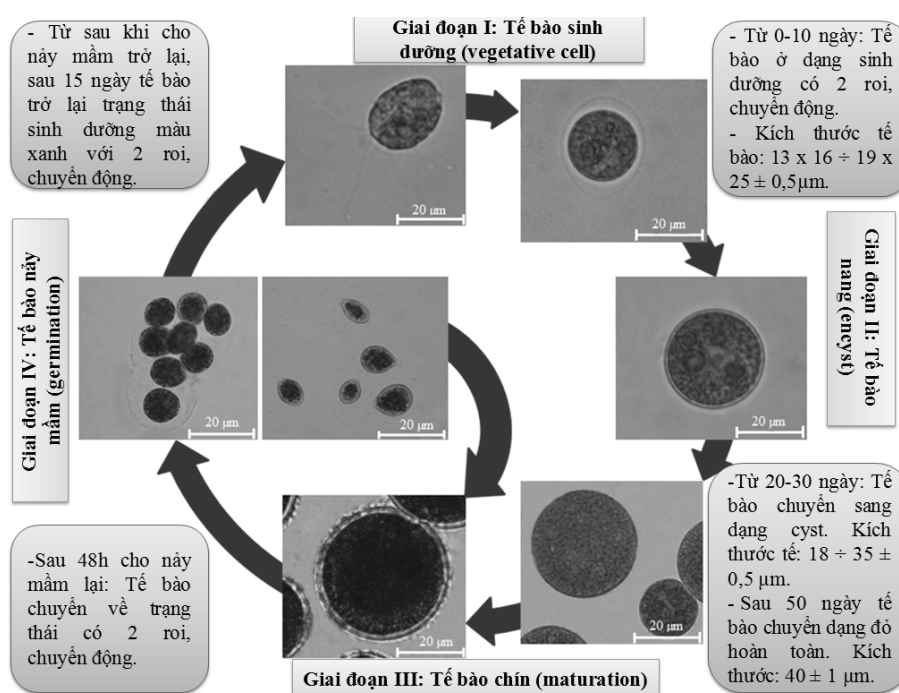
Hình thái tế bào vi tảo *H. pluvialis* được quan sát dưới kính hiển vi quang học OLYMPUS CX21 (Nhật Bản) ở độ phóng đại 400 lần; mật độ

tế bào tảo được đếm bằng buồng đếm hồng cầu Burker - Turk (Đức). Công thức tính mật độ tế bào theo công bố của Ngô Hoài Thu và cs., 2008 [18]; đo kích thước tế bào bằng phần mềm MapInfo professional (version 7.5 SCP, Mỹ); phân tích hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin theo Strickland & Person, 1977 [22]; hàm lượng protein được định lượng theo phương pháp Lowry [16]; các số liệu được xử lý bằng phần mềm excel và thống kê ANOVA một thành phần.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Vòng đời tự nhiên của vi tảo lục *H. pluvialis*

Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới về vòng đời của vi tảo *H. pluvialis* đã chứng minh rằng sinh trưởng của loài tảo này trải qua 4 giai đoạn với hình thái, kích thước tế bào, hàm lượng sắc tố và protein ở phần nội bào khác nhau. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng đã quan sát được 4 giai đoạn sinh trưởng cơ bản của tảo nói trên: giai đoạn I: tế bào sinh trưởng sinh dưỡng (vegetative cell growth); giai đoạn II: tế bào nang (encyst); giai đoạn III: tế bào chín (maturation); giai đoạn IV: tế bào nảy mầm (germination) trong hai môi trường C và RM ở hai cấp độ bình tam giác 250 và 500 ml. Sự thay đổi hình thái tế bào của vi tảo *H. pluvialis* ở các giai đoạn khác nhau được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Sự thay đổi hình thái và kích thước tế bào trong vòng đời của vi tảo *H. pluvialis* được quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần

Như vậy, đã quan sát được 4 dạng hình thái tế bào của vi tảo *H. pluvialis* trong vòng đời của chúng. Các tế bào sinh dưỡng hình elíp màu xanh, có hai roi, có khả năng chuyển động. Dạng tế bào này chiếm tới 90% so với tổng số tế bào trong 10 ngày nuôi trồng đầu tiên; kích thước tế bào dao động trong khoảng $13 \times 16 - 19 \times 25 \mu\text{m}$. Từ 10 đến 20 ngày nuôi trồng tiếp theo, số lượng tế bào sinh dưỡng giảm dần, số lượng tế bào dạng encyst tăng dần - đây là tế

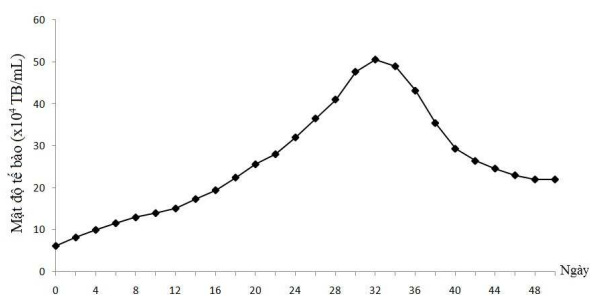
bào hình cầu, màu xanh, tế bào mất roi, không có khả năng chuyển động. Sau 20 ngày nuôi trồng, các tế bào chuyển hoàn toàn sang dạng encyst và kích thước tế bào tăng lên rõ rệt (đạt khoảng $40 \mu\text{m}$), nội chất trong tế bào chuyển sang màu nâu và bắt đầu tích lũy astaxanthin. Sau 50 ngày nuôi, các tế bào này hoàn toàn chuyển sang dạng cyst (nang bào tử hoàn chỉnh) có màu đỏ đậm, thành tế bào dày, sắc tố chủ yếu là astaxanthin.

Giai đoạn nảy mầm được tính từ khi chuyển các tế bào dạng cyst vào trong môi trường mới bằng cách ly tâm thu cận tế bào. Giai đoạn này kéo dài trong vòng 2 ngày. Trong giai đoạn này có 2 quá trình biến đổi rất quan trọng. Trong 24 giờ đầu tiên (ngay sau khi chuyển tế bào vào trong môi trường mới) có sự biến đổi màu sắc nội chất bên trong tế bào từ đỏ đậm sang nâu đỏ, đồng thời xuất hiện sắc tố xanh. 24 giờ tiếp theo là giai đoạn nảy mầm thực sự. Có 2 cách thức nảy mầm ở vi tảo *H. pluvialis* đã quan sát được: 1. nảy mầm trực tiếp từ 1 nang bào tử hình cầu, không di động thành 1 tế bào sinh dưỡng hình elíp, có 2 roi; và 2. nảy mầm gián tiếp thông qua pamella (cụm tế bào được bao bọc bằng một lớp

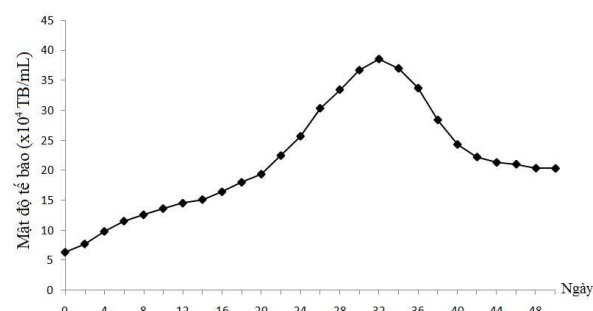
màng). Khi đó, màng bao bọc pamella bị vỡ ra, từ một tế bào nang tạo ra 8 tế bào sinh dưỡng. Tuy nhiên, khi đó các tế bào sinh dưỡng này vẫn chỉ chứa sắc tố màu đỏ trong nội chất tế bào. Chỉ sau 15 ngày nuôi cấy trong môi trường mới, các tế bào mới có màu xanh hoàn toàn.

a. *Nghiên cứu vòng đời của H. pluvialis trong bình tam giác 250 mL*

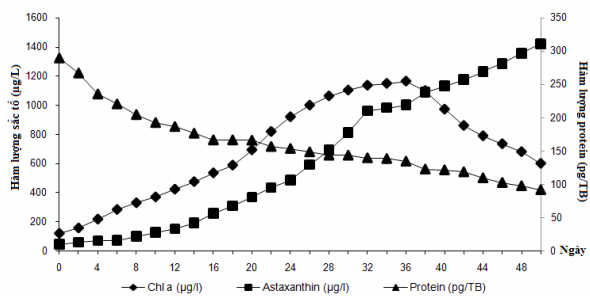
Nghiên cứu vòng đời *H. pluvialis* trong môi trường RM và C được đánh giá thông qua sự thay đổi của mật độ và hình thái tế bào; hàm lượng sắc tố (chlorophyll a và astaxanthin) và protein nội bào. Kết quả được trình bày ở hình 2, 3, 4 và 5.



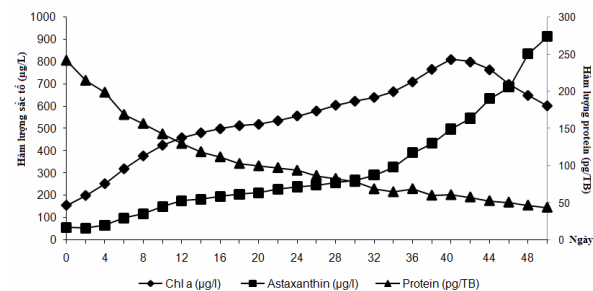
Hình 2. Mật độ tế bào của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 250ml trong môi trường RM



Hình 4. Mật độ tế bào của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 250ml trong môi trường C



Hình 3: Sự thay đổi của hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, astaxanthin) và protein của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 250ml trong môi trường RM



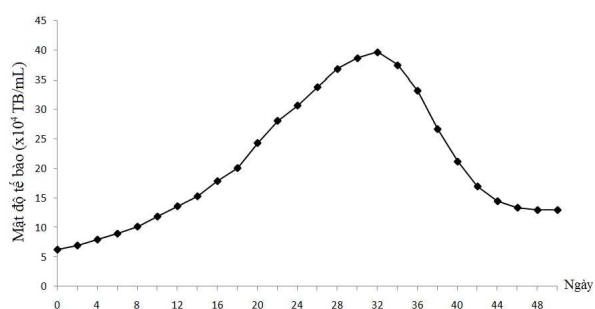
Hình 5. Sự thay đổi của hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, astaxanthin) và protein của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 250mL trong môi trường C

Kết quả được trình bày ở hình 2 và 3 đã cho thấy, vi tảo *H. pluvialis* sinh trưởng ở bình tam giác 250 mL trong môi trường RM đạt mật độ tế bào cao nhất là $50,00 \times 10^4$ TB/ml sau 32 ngày nuôi cấy. Hàm lượng sắc tố và protein nội bào có sự thay đổi rất rõ nét và theo hướng ngược chiều nhau trong thời gian từ 0 - 36 ngày. Hàm lượng chlorophyll a trong tế bào có xu hướng

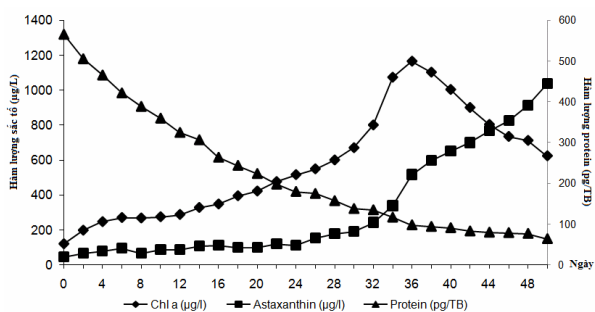
tăng dần và đạt cực đại với giá trị 1164,79 µg/L ở thời điểm 36 ngày. Sau đó hàm lượng này giảm dần ở các ngày nuôi tiếp theo. Kết quả thu được phù hợp với kết quả công bố của Sperry, 1970 [21] đã phát hiện thấy hàm lượng chlorophyll có xu hướng giảm đi trong quá trình tích lũy astaxanthin. Tuy nhiên, kết quả này lại trái ngược với công trình của Zlotnik và cs.,

1993 [25] đã công bố hàm lượng chlorophyll không thay đổi trong suốt quá trình tích lũy astaxanthin. Trong khi đó, hàm lượng astaxanthin trong 40 ngày đầu nuôi cấy tăng chậm trong khi tế bào chuyển từ dạng sinh dưỡng sang encyst và bắt đầu tích lũy dần astaxanthin. Tuy nhiên, hàm lượng sắc tố này tăng đột ngột ở giai đoạn từ 40 đến 50 ngày khi môi trường trở nên thiếu dinh dưỡng. Hàm lượng astaxanthin đạt giá trị cao nhất là 1424,23 $\mu\text{g/L}$. Ngoài ra, kích thước tế bào ở giai đoạn này tăng mạnh và đạt cực đại khoảng 40 μm . Hàm lượng protein nội bào có xu hướng giảm dần trong suốt quá trình nuôi cấy. Tại thời điểm tế bào chuyển hoàn toàn sang giai đoạn cyst có màu đỏ đậm, hàm lượng protein nội bào của tế bào *H. pluvialis* có giá trị nhỏ hơn 100 pg/TB .

Vòng đời của tế bào *H. pluvialis* trong môi



Hình 6. Mật độ tế bào của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 500 mL trong môi trường RM



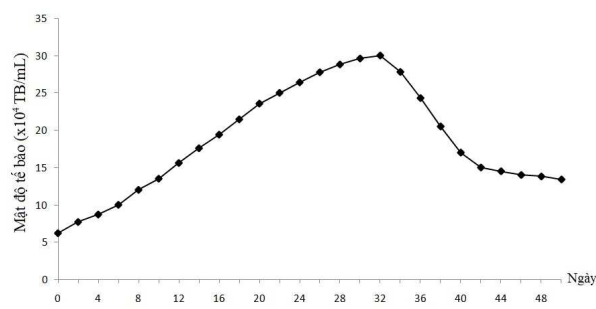
Hình 7. Sự thay đổi của hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, astaxanthin) và protein nội bào của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 500 mL trong môi trường RM

Kết quả trình bày trên hình 6 và 7 đã cho thấy, trong môi trường RM, mật độ tế bào đạt cực đại vào khoảng $40,20 \times 10^4$ TB/ml sau 32 ngày nuôi cấy. Hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin tăng dần trong 40 ngày đầu nuôi cấy. Hàm lượng protein nội bào ở giai đoạn sinh

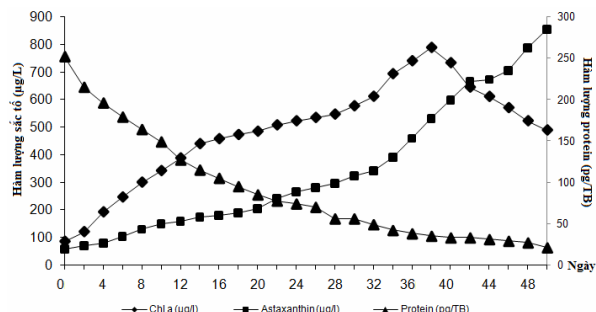
trường C ở bình tam giác 250 mL cũng xảy ra tương tự như trong môi trường RM (hình 4, 5). Nhưng có sự khác biệt là hàm lượng sắc tố cũng như hàm lượng protein nội bào đạt giá trị thấp hơn so với trong môi trường RM. Hàm lượng chlorophyll a cao nhất tại thời điểm 40 ngày đạt 811,45 $\mu\text{g/L}$, astaxanthin đạt giá trị cao nhất tại thời điểm khảo sát là 912,65 $\mu\text{g/L}$, hàm lượng protein nội bào giảm dần đến giá trị 44 pg/TB sau 50 ngày nuôi cấy.

b. *Nghiên cứu vòng đời của tế bào H. pluvialis trong bình tam giác 500 mL*

Nghiên cứu vòng đời của tế bào *H. pluvialis* trong môi trường RM và C ở cấp độ bình tam giác 500 mL cũng được tiến hành tương tự như ở bình 250 mL. Kết quả được trình bày ở hình 6, 7, 8 và 9.



Hình 8. Mật độ tế bào của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 500 mL trong môi trường C



Hình 9. Sự thay đổi của hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, astaxanthin) và protein nội bào của *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 500 mL trong môi trường C

dưỡng có giá trị là 1300 pg/TB . Khi tế bào chuyển sang giai đoạn cyst hàm lượng này giảm dần và chỉ còn khoảng 80 pg/TB sau 50 ngày nuôi, giảm khoảng 16,3 lần so với giai đoạn sinh dưỡng. Chlorophyll a được tổng hợp mạnh trong giai đoạn sinh dưỡng, tăng từ 100 $\mu\text{g/L}$ lên 1200

µg/L sau 36 ngày nuôi và sau đó lại giảm dần vào các ngày tiếp theo. Ở ngày thứ 50, khi tế bào đã chuyển sang giai đoạn chín hoàn toàn thì hàm lượng chlorophyll a chỉ còn dưới 300 µg/L, trong khi đó hàm lượng astaxanthin đạt trên 1100 µg/L. Ở trong môi trường C, mật độ tế bào và hàm lượng chlorophyll a đạt cực đại là $30,10 \times 10^4$ TB/ml và 800 µg/L sau 36 ngày nuôi. Còn hàm lượng astaxanthin đạt cực đại 800 µg/L và hàm lượng protein giảm xuống còn 20 pg/TB sau 50 ngày nuôi. Như vậy, cùng với sự chuyển hình thái tế bào từ trạng thái sinh dưỡng sang nang bào tử còn có quá trình tổng hợp, tích lũy carotenoid và phân giải protein nội bào.

Theo kết quả công bố của Kobayashi và cs. 1997 [12] về vòng đời của tảo *H. pluvialis*, tỷ lệ hàm lượng astaxanthin/ chlorophyll a là một thông số tốt nhất để xác định pha sinh trưởng của tế bào. Nếu tỷ lệ astaxanthin/ chlorophyll a $\leq 0,5$ thì tế bào được xem chủ yếu đang ở giai đoạn sinh dưỡng. Khi tỷ lệ astaxanthin/ chlorophyll a dao động từ 0,5 - 1, tế bào chủ yếu được xem đang ở giai đoạn encyst. Trong khi đó, nếu tỷ lệ này trong khoảng 2 - 7 thì tế bào chủ yếu ở giai đoạn cyst [13]. Kết quả thu được của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với những kết quả công bố ở trên, được trình bày chi tiết ở bảng 1.

Bảng 1

Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a của vi tảo *H. pluvialis* ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau

Giai đoạn	Sinh dưỡng	Encyst	Cyst	Nảy mầm
Trạng thái tế bào	Tế bào hình elip, màu xanh, có hai roi. Kích thước tế bào: $13 \times 16 - 19 \times 25 \pm 0,50 \mu\text{m}$	Tế bào hình cầu, màu xanh, không có roi. Kích thước tế bào: $14 - 30 \pm 0,50 \mu\text{m}$	Tế bào hình cầu, màu đỏ đậm, không có roi. Kích thước: $35 - 40 \pm 0,20 \mu\text{m}$	Tế bào hình elip, có hai roi, màu nâu đỏ đến xanh. Kích thước: $8 \times 11 - 10 \times 15 \pm 0,30 \mu\text{m}$
Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a	$0,30 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,20$	$2,40 \pm 0,10$	$0,60 \pm 0,20$

Trong 10 ngày đầu tiên các tế bào tảo chủ yếu ở dạng sinh dưỡng, tỷ lệ astaxanthin/ chlorophyll a đạt $0,30 \pm 0,05$. Ở 20 ngày nuôi trông tiếp theo, các tế bào tảo ở dạng nang non (encyst), có đặc trưng tỷ lệ astaxanthin/ chlorophyll a tăng từ $0,3 \pm 0,05$ đến giá trị $0,90 \pm 0,20$. Kéo dài thời gian nuôi trông lên đến 50 ngày, tảo chuyển sang giai đoạn cyst và có sự tích lũy astaxanthin bên trong tế bào, nội chất tế bào chuyển hoàn toàn sang màu đỏ đậm, tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a đạt giá trị $2,40 \pm 0,10$. Còn trong giai đoạn nảy mầm, cùng với sự chuyển hình thái tế bào từ hình cầu có màu đỏ đậm (cyst) sang dạng sinh dưỡng (hình elíp có hai roi, màu nâu đỏ) là quá trình biến đổi hàm lượng các sắc tố bên trong nội bào được đặc trưng ở tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a có xu hướng giảm và đạt giá trị $0,60 \pm 0,20$.

Quá trình chuyển giai đoạn của tế bào vi tảo *H. pluvialis* từ dạng sinh dưỡng sang dạng nang bào tử tổng hợp tích lũy astaxanthin cao có thể được thực hiện theo 2 con đường khác nhau: 1. nuôi tảo trong môi trường cho đến khi dịch tảo

tự chuyển sang màu đỏ do cạn kiệt nguồn dinh dưỡng. Theo phương thức này thể hiện vòng đời tự nhiên của tế bào tảo *H. pluvialis* với thời gian chuyển giai đoạn tương đối dài (hơn 50 ngày) và hàm lượng astaxanthin được tổng hợp là không cao; 2. điều khiển quá trình chuyển giai đoạn trong vòng đời của tế bào bằng nuôi cấy 2 pha. Trong đó, pha một nuôi cấy tảo dưới điều kiện tối ưu để tảo đạt mật độ tế bào cực đại, sau đó chuyển sinh khối tảo vào pha thứ hai có môi trường nuôi cấy bất lợi như: cường độ ánh sáng, nhiệt độ cao, thiếu nitơ, shock về muối... để kích thích nhanh chóng tế bào chuyển sang dạng nang bào tử có tích lũy cao astaxanthin [4].

III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu đã được trình bày ở trên, có thể rút ra một số kết luận như sau:

1. Vòng đời tự nhiên của vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường RM và C đều trải qua 4 giai đoạn tương ứng với 4 dạng hình thái tế bào có các đặc điểm khác nhau:

Giai đoạn sinh dưỡng: Tế bào sinh dưỡng có hình elip, màu xanh, có hai roi chuyển động, kích thước tế bào dao động từ 10 - 20 μm . Giai đoạn này kéo dài khoảng 10 ngày nuôi cấy; *giai đoạn tạo bào nang non (encyst)*: Kéo dài từ 10 đến 20 ngày nuôi cấy. Các tế bào có dạng hình cầu, mất roi, không có khả năng chuyển động. Kích thước tế bào tăng lên đáng kể, khoảng 40 μm . Ở giai đoạn này, nội chất tế bào có sự biến đổi màu sắc từ xanh sang nâu đậm; *giai đoạn tạo bào nang hoàn chỉnh (cyst)*: Sau 50 ngày nuôi cấy, các tế bào nang non chuyển thành nang hoàn chỉnh, tế bào có màu sắc đỏ đậm. Đây là giai đoạn tích lũy cao nhất astaxanthin; *giai đoạn nảy mầm*: Kéo dài trong vòng 2 ngày. Có 2 cách nảy mầm: 1. từ một tế bào nang hoàn chỉnh nảy mầm trực tiếp thành tế bào sinh dưỡng; và 2. nảy mầm gián tiếp thông qua dạng pameila.

2. Đồng thời với sự thay đổi hình thái, kích thước tế bào, có sự thay đổi về hàm lượng sắc tố và protein trong nội bào. Hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin có xu hướng tăng chậm ở 20 ngày đầu tiên khi tảo được nuôi trong cả 2 môi trường RM và C ở cả bình tam giác 250 và 500 mL. Tuy nhiên, sau 40 ngày nuôi cấy, hàm lượng astaxanthin tăng đột ngột, trong khi hàm lượng chlorophyll a lại bị giảm dần. Hàm lượng các sắc tố (chlorophyll a và astaxanthin) trong môi trường RM cao hơn trong môi trường C khi tảo được nuôi ở cả bình tam giác 250 và 500 ml. Ở bình 250 mL, hàm lượng astaxanthin đạt giá trị cực đại trong môi trường RM và C là 1424,23 và 912,65 $\mu\text{g/L}$, tương ứng, còn ở bình 500 ml các giá trị này là 1100 và 800 $\mu\text{g/L}$, tương ứng với môi trường RM và C. Trong cả 2 môi trường nuôi, hàm lượng protein giảm dần khi tăng thời gian nuôi cấy. Sau 50 ngày nuôi cấy, hàm lượng protein nội bào nhỏ hơn 100 pg/tế bào, giảm 20 - 40 lần so với khi tế bào ở giai đoạn sinh dưỡng.

3. Tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a là thông số rất tốt để xác định pha sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis*. Ở giai đoạn sinh dưỡng, encyst, cyst và nảy mầm, tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a đạt giá trị $0,30 \pm 0,05$, $0,90 \pm 0,20$, $2,4 \pm 0,10$ và $0,60 \pm 0,20$, tương ứng.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu công nghệ nuôi vi tảo

Haematococcus pluvialis và công nghệ chiết xuất astaxanthin” cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn thuộc chương trình công nghệ sinh học trong thủy sản năm 2010-2012.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ana S. Cifuentes et al.**, 2003: Biol Res, 36: 343-357.
2. **Borowitzka et al.**, 1991: J. Appl. Phycol., 3: 295-304.
3. **Boussiba S. and Vonshak A.**, 1991: Plant Cell Physiol., 32: 1077-1082.
4. **Esra Iamuglu et al.**, 2007: International J. of Natural and Engineering Sciences, 1(3): 5-9.
5. **Gong X. and Chen F.**, 1997: J. Appl Phycol., 9: 437-444.
6. **Hagen C. et al.**, 1993: J. Photochem Photobiol Biol., 20: 153-160.
7. **Harker M. et al.**, 1996: J. Ferment. Bioeng., 82: 113-118.
8. **Hussein G. et al.**, 2006: J Nat Prod., 69: 443-449.
9. **Johnson E. A. and An G. H.**, 1991: Crit Rev Biotechnol, 11: 297-326
10. **Kakizono T. et al.**, 1992: J. Ferment Bioeng, 74: 403-405.
11. **Kobayashi M. et al.**, 1991: J. Ferment. Bioeng., 71: 335-339.
12. **Kobayashi M. et al.**, 1992: J. Ferment. Bioeng., 74: 61-63.
13. **Kobayashi M. et al.**, 1997: J. Ferment. Bioeng., 84: 94-97.
14. **Lee Y. K., Ding S. Y.**, 1994: J. Phycol 30: 445-449.
15. **Lorenz R. T. and Cysewski G. R.**, 2000: Trends Biotechnol, 18: 160-167
16. **Lowry O. H. et al.**, 1991: J. Biol. Chem 193: 265-275.
17. **Miki W.**, 1991: Pure Appl. Chem., 63: 141-146.
18. **Ngô Hoài Thu và cs.**, 2008: Tạp chí Hóa học, 46(5A): 98-104.

19. **Rudic V., Dudnicenco T.**, 2000: MD Patent Nr. a 2000 0154.
20. **Smith G. M.**, 1950: Mcgraw Hill Book: 109-111.
21. **Sperry**, 1970: Psychological Review, 77(6): 585590.
22. **Strickland J. D. H. et al.**, 1977: Fish Res. Bd. Can. Bull., 167.
23. **Tan S. et al.**, 1995: J. Phycol., 31: 897-905.
24. **Triki A. et al.**, 1997: Phycologia, 36: 190-199.
25. **Zlotnik Shmerler I. et al.**, 1993: J. Phycol., 29: 463-469.
26. **Yuan and Chen**, 2000: Food Chem, 68: 443-448.

**A STUDY ON THE CHANGES OF THE CELL MORPHOLOGY,
CONTENTS OF PIGMENTS AND INTRACELLULAR PROTEIN
IN THE LIFE CYCLE OF THE GREEN MICROALGAL
HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS UNDER LABORATORY CONDITION**

**DINH DUC HOANG, LUU THI TAM,
NGUYEN THI THU THUY, DANG DIEM HONG**

SUMMARY

The green unicellular algal *Haematococcus pluvialis* is a potential producer of astaxanthin, because it is capable of accumulating the highest proportion of astaxanthin around 5% of dry cell weight. In this report, a 50 days of model life cycle of the green algal *H. pluvialis* was constructed, consisting of four cell stages: 1. vegetative cell growth (prolong from 0 to 10 days of cultivation); 2. encystment (10-40 days of cultivation); 3. Maturation (40-50 days of cultivation); and 4. germination (within 2 days). Each algal cell stage could be distinguished each another by the profile of pigments and the intracellular protein content. During the life cycle of the algae, vegetative cells contained high levels of chlorophyll a and protein but they had very low carotenoid contents, whereas maturation of cyst cells was accompanied by enhancing carotenoid biosynthesis (especially astaxanthin) and accelerating protein degradation. The contents of chlorophyll a and astaxanthin tend to rise slowly in the first 20 days of cultivation, and then increased rapidly. After 40 days of cultivation, chlorophyll a content decreased whereas the content of astaxanthin is still increasing and reached maximal after 50 days of cultivation. The maximum astaxanthin content were 1424.23, 912.65 µg/L and 1100, 800 µg/L in media RM and C when culturing *H. pluvialis* in 250 and 500 ml flask, respectively. The highest cell diameter is around 40 µm when cells of *H. pluvialis* were in maturation cell stage. Contrary to astaxanthin and chlorophyll a contents, the content of intracellular protein tends to reduce when the cell began to convert from vegetative to cyst stage and accumulate astaxanthin. After 50 days of cultivation, protein content is less than 100 pg/cell which is decreased in 20 times compared with vegetative cell stage. In this study, we have determined astaxanthin/chlorophyll a ratio in each cell algal stage for distinguishing among vegetative, encyst, cyst and germination cells. Our obtained results have indicated that the astaxanthin/chlorophyll ratios were about 0.3 ± 0.05 ; 0.9 ± 0.20 ; 2.4 ± 0.10 and 0.60 ± 0.20 in vegetative, encyst, cyst and germination cell stages, respectively.

Key words: Astaxanthin, cell morphology, cyst, germination, *Haematococcus pluvialis*, life cycle.

Ngày nhận bài: 14-9-2010