

## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ MUỐI LÊN SINH TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG TÍCH LŨY ASTAXANTHIN CỦA VI TẢO *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* LÀM CƠ SỞ BƯỚC ĐẦU CHO QUI TRÌNH NUÔI CẤY 2 PHA

**Lưu Thị Tâm, Đinh Đức Hoàng, Đinh Thị Ngọc Mai,  
Ngô Thị Hoài Thu, Hoàng Thị Lan Anh, Đặng Diễm Hồng\***

Viện Công nghệ sinh học, (\*)ddhong60vn@yahoo.com

**TÓM TẮT:** Vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* là một nguồn cung cấp sắc tố astaxanthin tự nhiên - một loại sắc tố được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản, công nghiệp thực phẩm và dược phẩm. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl lên sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của loài vi tảo *H. pluvialis* Flotow phân lập tại tỉnh Hòa Bình. Thí nghiệm được tiến hành theo mô hình nuôi cấy hai pha, trong đó ở pha một tảo được nuôi cấy dưới điều kiện tối ưu để đạt mật độ tế bào cực đại, sau đó chuyển sinh khối tảo vào pha thứ hai sốc muối với nồng độ NaCl của môi trường là 0,8%, 1,5% và 2,5%. Kết quả cho thấy, nồng độ NaCl cao trong môi trường gây ra sự ức chế sinh trưởng và tăng cường sự tích lũy astaxanthin trong tế bào. Ở nồng độ NaCl 2,5%, tế bào tảo chuyển sang giai đoạn bào xác sớm nhất, với hàm lượng astaxanthin tăng nhanh từ 10 pg/tế bào lên 48 pg/tế bào sau khi chuyển sang pha hai 15 ngày. Ngoài ra, các kết quả xác định hàm lượng lipid tổng số cũng cho thấy, sự tích lũy astaxanthin và lipid trong tế bào *H. pluvialis* xảy ra đồng thời. Hàm lượng lipid đạt cao nhất là  $19 \pm 1,3\%$  và  $26 \pm 0,12\%$ , tương ứng ở công thức thí nghiệm sốc muối 1,5% và 2,5% sau khi chuyển sang pha hai 10 ngày.

Từ khóa: *Haematococcus pluvialis*, lipid tổng số, nuôi cấy 2 pha, sốc muối, tích lũy astaxanthin.

### MỞ ĐẦU

Astaxanthin (3, 3'- dihydroxy  $\beta$ ) là dẫn xuất của  $\beta$ -carotenoid được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản (thức ăn bổ sung cho cá hồi, cá cảnh), công nghiệp thực phẩm (chất màu tự nhiên), dược phẩm (chất chống oxy hóa, tăng cường khả năng miễn dịch, phòng chống ung thư) và thực phẩm chức năng [13, 17]. Astaxanthin có thể được tổng hợp ở thực vật, vi khuẩn, một vài loại nấm và tảo lục... Trong số đó, loài vi tảo lục nước ngọt *Haematococcus pluvialis* đang thu hút được sự quan tâm nghiên cứu bởi khả năng tích lũy astaxanthin cao, có thể lên tới 4-5% trọng lượng khô [24].

Astaxanthin được tích lũy ở tế bào tảo *H. pluvialis* trong suốt quá trình chuyển từ giai đoạn sinh dưỡng (tế bào chuyển động, có màu xanh) sang giai đoạn bào xác (tế bào hình cầu và không chuyển động). Ở điều kiện môi trường tối ưu, các tế bào tảo *H. pluvialis* duy trì ở trạng thái sinh dưỡng và astaxanthin được tích lũy ở mức độ thấp. Khi gặp các điều kiện môi trường bất lợi như: thiếu hụt nitơ, photpho, tỷ lệ C/N cao hoặc độ mặn, cường độ ánh sáng, nhiệt độ cao, quá trình tích lũy astaxanthin sẽ được tăng cường như một phản ứng bảo vệ của cơ thể [2, 12, 23].

Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm tìm ra phương pháp tối ưu cho nuôi trồng vi tảo *H. pluvialis* với hàm lượng cao astaxanthin. Kang et al. (2005) [11] đã so sánh khả năng tích lũy astaxanthin ở vi tảo lục này khi 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 hơn 3 - 4 lần khi nuôi cấy quang tự dưỡng trong môi trường thiếu nitơ được bổ sung bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) hoặc  $\text{CO}_2$  liên tục và chiếu sáng ở cường độ cao. Các kết quả nghiên cứu khác cũng cho thấy, khi một yếu tố môi trường có tác dụng làm tăng cường hoặc duy trì sinh trưởng sinh dưỡng của tế bào tảo *H. pluvialis*, sẽ không có vai trò kích thích tế bào tảo tích lũy astaxanthin và ngược lại, tác nhân có tác dụng kích thích quá trình sinh tổng hợp astaxanthin cao sẽ ức chế sinh trưởng của tảo. Vì vậy, quy trình nuôi cấy 2 pha, trong đó, pha đầu thiết lập các điều kiện tối ưu cho sinh trưởng của các tế bào sinh dưỡng nhằm đạt mật độ cao nhất và pha II, với các điều kiện thuận lợi cho việc tích lũy astaxanthin, được coi là hiệu quả và phù hợp cho việc sản xuất sinh khối tảo giàu astaxanthin [18].

Hiện nay, ở Việt Nam, nuôi trồng vi tảo

*H. pluvialis* mới đang bắt đầu với một số ít các nghiên cứu được công bố [9, 10]. Trong bài báo này, ảnh hưởng của nồng độ muối lên sinh trưởng và khả năng tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* đã được nghiên cứu. Các kết quả thu được sẽ là cơ sở bước đầu cho qui trình nuôi trồng 2 pha loài vi tảo này để có thể thu được sinh khối tảo giàu astaxanthin cho nhiều ứng dụng khác nhau trong tương lai.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Chủng vi tảo *H. pluvialis* Flotow phân lập tại tỉnh Hòa Bình (năm 2009) 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, cường độ chiếu sáng 1,5 klux với chu kỳ sáng tối là 12: 12 giờ. Thành phần môi trường C và RM theo công bố của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2010) [10].

### Phương pháp

Tảo *H. pluvialis* được nuôi trong môi trường C, dưới các điều kiện tối ưu cho sinh trưởng (25°C, cường độ ánh sáng 1,5 klux, chu kỳ sáng: tối là 12: 12 giờ). Sau 5 ngày nuôi (các tế bào chủ yếu ở trạng thái sinh dưỡng, chiếm 80-90% tổng số tế bào), dịch nuôi cấy được ly tâm ở 6000 vòng/5 phút. Loại bỏ phần dịch trên, thu cặn tế bào và bổ sung môi trường RM có chứa các nồng độ muối khác nhau để tiến hành thí nghiệm.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối lên sinh trưởng của tảo *H. pluvialis*: Thí nghiệm được tiến hành trong môi trường RM ở bình tam giác 250 mL với nồng độ NaCl khác nhau: 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6% và 0,8%. Mật độ tế bào tảo ban đầu trong các công thức thí nghiệm là  $6 \times 10^4$  tế bào (TB)/ml. Tảo được nuôi ở các điều kiện tối ưu cho sinh trưởng như mô tả ở trên. Mỗi công thức được lặp lại 3 lần.

Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ muối lên khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *H. pluvialis* (thí nghiệm nuôi cấy 2 pha sử dụng tác nhân sốc muối): Sau khi chọn ra được nồng độ NaCl thích hợp cho quá trình chuyển pha nhanh từ tế bào sinh dưỡng sang dạng bào xác và tích lũy astaxanthin, chúng tôi sử dụng nồng độ muối này để nghiên cứu tiếp ảnh hưởng của

chúng lên khả năng tích lũy astaxanthin ở tảo *H. pluvialis*. Thí nghiệm này được thực hiện theo quy trình nuôi cấy 2 pha: ở pha I tảo được nuôi ở điều kiện tối ưu, kích thích tảo sinh trưởng nhanh và đạt mật độ tế bào cao nhất trong 10 ngày. Sau đó, dịch tảo nuôi trong pha I sẽ được ly tâm và thu tế bào. Cặn tế bào được hòa trong môi trường RM mới có bổ sung NaCl ở nồng độ 0,8; 1,5 và 2,5% (pha II). Lắc đều và chia dịch tảo vào các bình tam giác 500 và 1000 ml tương ứng với 350 và 500 ml dịch tảo/bình. Các bình nuôi tảo được đặt trong điều kiện như mô tả ở trên. Pha II trong thí nghiệm nuôi cấy 2 pha sử dụng tác nhân sốc muối, trong 24 giờ đầu, tảo được lấy 8 giờ/lần để quan sát sự thay đổi hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học. Nhuộm tế bào bằng Nile Red để quan sát khả năng tích lũy lipid và soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Sinh trưởng của tảo được đánh giá thông qua mật độ tế bào, mật độ quang ở bước sóng 680 nm ( $OD_{680nm}$ ), hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, astaxanthin) và hàm lượng protein nội bào [14, 21, 22]. Hàm lượng chlorophyll a, astaxanthin và hàm lượng protein nội bào được xác định theo công bố của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2010) [10].

Nhuộm tế bào tảo bằng Nile Red theo quy trình của Doan & Obbard (2011) [6]: Bổ sung 5  $\mu$ l dung dịch Nile Red (9 - diethylamino - 5H benzo [ $\alpha$ ] phenoxazine-5-1) có nồng độ 0,1 mg/ml trong aceton vào 5 ml dịch tảo. Hỗn hợp được vortex nhẹ và ủ trong tối 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các tế bào tảo đã nhuộm bằng Nile Red sẽ được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang với bước sóng kích thích từ 450-490 nm.

Tách chiết lipid tổng số và xác định hàm lượng lipid tổng số theo phương pháp của Bligh & Dyer (1959) [1] với một số cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam: cân 0,1 g sinh khối tảo khô cho vào cối chày sứ, bổ sung thêm 0,2 g  $Na_2SO_4$  và nghiền hỗn hợp này thành bột mịn. Sau đó bổ sung thêm 10 ml hỗn hợp dung môi chloroform : methanol (tỷ lệ 2:1 (v/v)) và ngâm trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Lọc hỗn hợp qua giấy lọc Whatman số 1 và thu dịch trong. Bã sinh khối được tiếp tục chiết với chloroform từ 2 - 3 lần

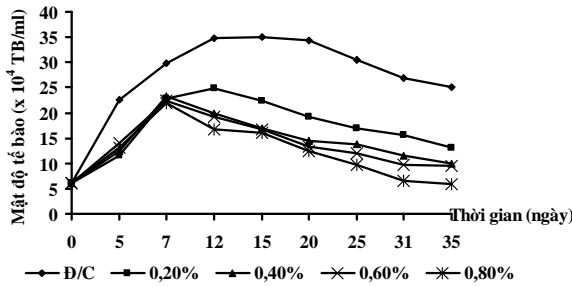
để thu tối đa lipid trong sinh khối tảo. Dịch chiết được trộn đều và chuyển sang phễu chiết. Sau đó, bổ sung thêm 10 ml dung dịch NaCl 0,9% và để tĩnh ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lớp dung môi hữu cơ phía dưới chứa các thành phần lipid được thu nhận. Sau đó, dung môi được bay hơi ở 60°C và làm khô trong desiccator. Sản phẩm được hòa tan trong n-hexan, lọc bỏ cặn và

làm bay hơi n-hexan để thu hồi lipid.

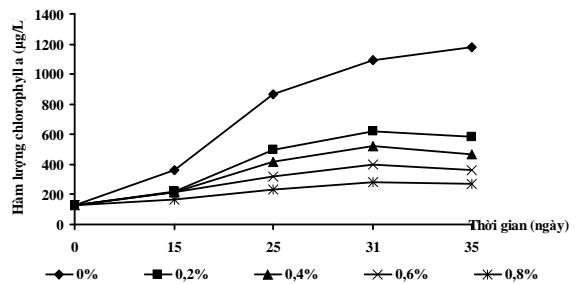
Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA ở mức ý nghĩa  $P \leq 0,05$ .

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

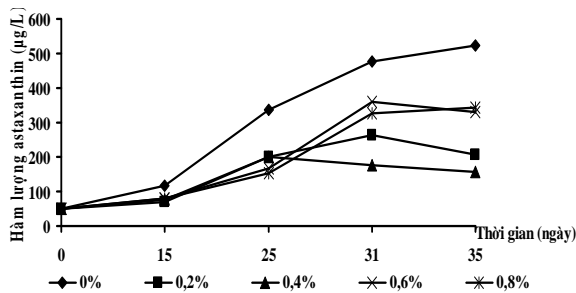
**Ảnh hưởng của nồng độ NaCl lên sinh trưởng của tảo *H. pluvialis***



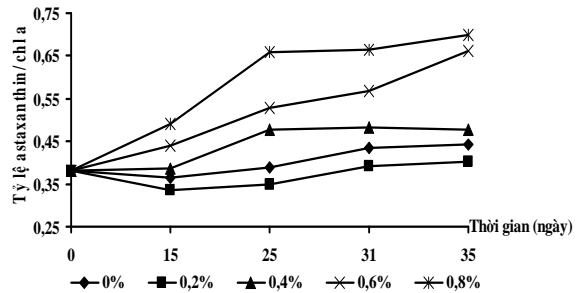
Hình 1. Mật độ tế bào của tảo *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau sau 35 ngày nuôi



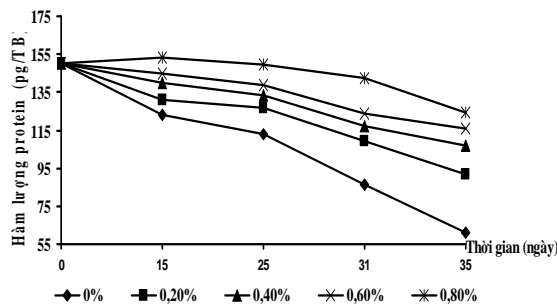
Hình 2. Sự thay đổi của hàm lượng chlorophyll a (chl a) của *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau



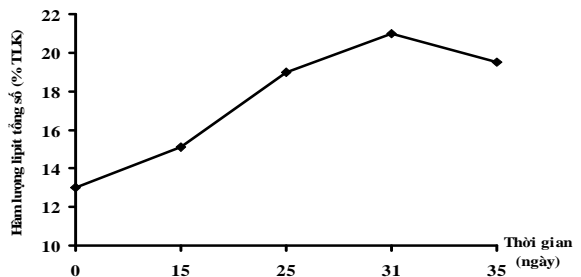
Hình 3. Sự thay đổi của hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau



Hình 4. Sự thay đổi của tỷ lệ astaxanthin /chl a của *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau



Hình 5. Sự thay đổi của hàm lượng protein nội bào của *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau



Hình 6. Sự thay đổi hàm lượng lipid tổng số của tảo *H. pluvialis* ở công thức nồng độ NaCl 0,8%

Ảnh hưởng của nồng độ NaCl lên sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* thông qua mật độ tế

bào (MĐTB) được trình bày ở hình 1. Kết quả cho thấy, nồng độ NaCl có ảnh hưởng rõ rệt lên

sinh trưởng của tảo *H. pluvialis*. Trong 7 ngày đầu tiên, ở các nồng độ muối khác nhau tảo vẫn sinh trưởng phát triển bình thường, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm. Sau 7 ngày nuôi, sinh trưởng của tảo bắt đầu có sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm có nồng độ muối khác nhau. Tảo sinh trưởng tốt nhất ở công thức đối chứng (không bổ sung muối) với mật độ tế bào đạt cực đại là  $35 \times 10^4$  TB/ml sau 12 ngày, tiếp đến là ở công thức 0,2%, 0,4%, 0,6% và 0,8% NaCl tương ứng với mật độ tế bào đạt cực đại là 24; 20; 19 và  $16 \times 10^4$  TB/ml. Ở công thức đối chứng, tảo duy trì chủ yếu ở dạng tế bào sinh dưỡng, có màu xanh, 2 roi. Chúng tôi đã không quan sát thấy có sự thay đổi hình thái tế bào từ dạng sinh dưỡng sang dạng bào xác. Ngược lại, ở công thức thí nghiệm với 0,8% NaCl, trạng thái tế bào tảo chủ yếu ở dạng bào xác và có tích lũy astaxanthin bên trong tế bào.

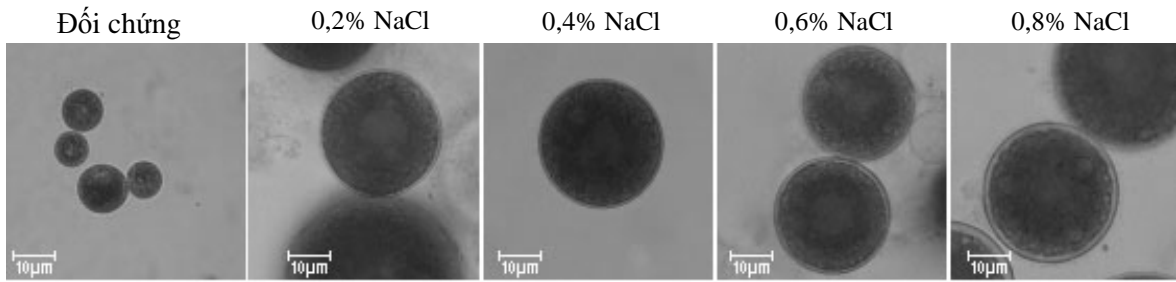
Tỷ lệ carotenoid/chlorophyll a là một chỉ số thể hiện trạng thái sinh lý của tế bào tảo và tỷ lệ này cũng là thông số tốt để đánh giá khả năng tích lũy astaxanthin của *Haematococcus pluvialis* [7, 15]. Vì vậy, mặc dù *H. pluvialis* có chứa cả chlorophyll a và b nhưng chúng tôi đã lựa chọn nghiên cứu sự thay đổi hàm lượng chlorophyll a và tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a là những thông số đặc trưng cho sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của loài vi tảo lục này. Hàm lượng chlorophyll a, astaxanthin, tỷ lệ astaxanthin/chl a và protein nội bào ở các công thức thí nghiệm có nồng độ muối khác nhau được chỉ ra ở hình 2, 3, 4 và 5. Từ các kết quả được chỉ ra ở hình 2, 3, 4 và 5 nhận thấy, hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin có xu hướng tăng và tăng mạnh sau 15 ngày nuôi cấy. Hàm lượng astaxanthin đạt cao nhất ở công thức đối chứng với giá trị là 1182  $\mu\text{g/l}$  sau 35 ngày nuôi, tiếp đó là 479, 448, 391 và 283  $\mu\text{g/l}$  tương ứng ở các công thức thí nghiệm có nồng độ NaCl là 0,2%, 0,4%, 0,6% và 0,8%. Điều này có thể giải thích là do tảo sinh trưởng mạnh ở công thức đối chứng, mật độ tế bào tăng cao dẫn đến hàm lượng astaxanthin tổng số trên đơn vị thể tích nuôi là cao. Tuy nhiên, tỷ lệ astaxanthin/chl a lại cho kết quả ngược lại. Ở công thức có nồng độ NaCl là 0,8%, tỷ lệ astaxanthin/chl a đạt giá trị cao hơn 0,5 sau 15 ngày, trong khi các công thức nồng độ NaCl

khác tỷ lệ này đều nhỏ hơn 0,5 (hình 4). Theo Kobayashi et al. (1997) [12] khi tỷ lệ astaxanthin/chl a > 0,5 cho thấy tế bào tảo chủ yếu ở trạng thái bào xác và có sự tích lũy astaxanthin. Như vậy, nồng độ 0,8% NaCl giúp tế bào tảo *H. pluvialis* chuyển giai đoạn từ các tế bào dạng sinh dưỡng sang dạng bào xác nhanh hơn. Điều này rất quan trọng khi áp dụng cho quy trình nuôi cấy 2 pha đối với loài vi tảo lục này.

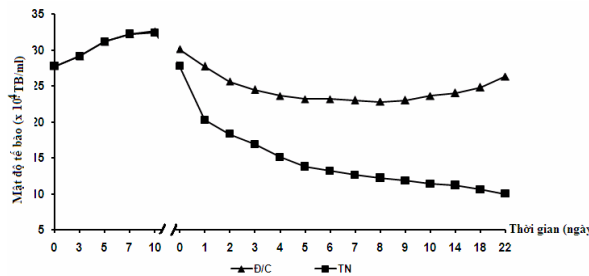
Hàm lượng protein nội bào có xu hướng giảm dần theo thời gian nuôi ở tất cả các công thức thí nghiệm. Kết quả sau 35 ngày nuôi, hàm lượng protein nội bào còn lại đều nhỏ hơn 100 pg/tế bào. Ở công thức đối chứng, hàm lượng protein nội bào giảm 1/2 lần so với giá trị ban đầu. Trong khi đó, hàm lượng này chỉ giảm 1/4 lần so với giá trị ban đầu ở các công thức có bổ sung NaCl (hình 5).

Cùng với sự thay đổi về hàm lượng sắc tố và protein nội bào thì hàm lượng lipid tổng số cũng có sự biến đổi trong quá trình nuôi. Sự thay đổi hàm lượng lipid tổng số của tảo *H. pluvialis* ở công thức thí nghiệm có bổ sung 0,8% NaCl được trình bày ở hình 6. Kết quả cho thấy, hàm lượng lipid tổng số có xu hướng tăng dần trong quá trình nuôi. Khi các tế bào chuyển sang giai đoạn bào xác và tích lũy astaxanthin thì đồng thời có sự tăng về hàm lượng lipid tổng số. Ở thời điểm ban đầu, hàm lượng lipid chiếm  $13,54 \pm 0,23\%$  trọng lượng khô-TLK và sau đó tăng dần lên  $21,34 \pm 0,35\%$  TLK ở ngày thứ 31. Kết quả này hoàn toàn tương tự với các kết quả của các tác giả khác đã công bố trên thế giới [4, 5, 16, 19].

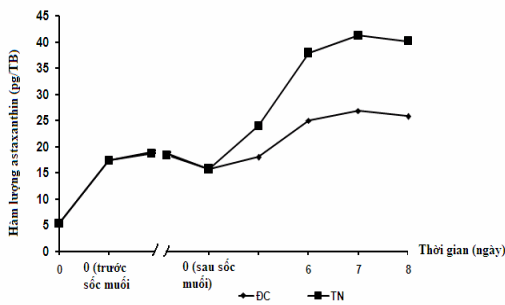
Như vậy, việc bổ sung NaCl với các nồng độ khác nhau đã ảnh hưởng lên sinh trưởng và khả năng tích lũy astaxanthin ở tảo *H. pluvialis*. Ở nồng độ NaCl thấp (0,2 và 0,4%), sự sinh trưởng của tảo chưa bị ảnh hưởng nhiều. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ muối lên 0,6 và 0,8%, sinh trưởng của tảo bị ức chế và quá trình chuyển pha từ tế bào sinh dưỡng sang dạng bào xác diễn ra nhanh hơn, đặc biệt là ở nồng độ NaCl 0,8% (hình 7). Vì vậy, chúng tôi chọn nồng độ muối này làm tác nhân cảm ứng để tiến hành thí nghiệm nuôi cấy 2 pha ở tảo *H. pluvialis*.



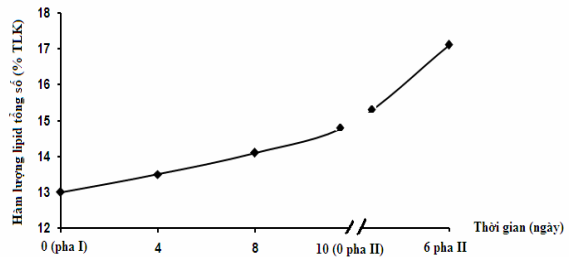
Hình 7. Hình thái tế bào *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau sau 35 ngày nuôi ở cấp độ bình tam giác 250 ml được chụp bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại x400



Hình 8. Mật độ tế bào của *H. pluvialis* trong thí nghiệm nuôi cấy 2 pha với pha II sử dụng tác nhân sốc muối ở nồng độ 0,8% NaCl



Hình 9. Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của tảo *H. pluvialis* trong thí nghiệm nuôi cấy 2 pha với pha II sốc muối



Hình 10. Sự thay đổi hàm lượng lipid tổng số của tảo *H. pluvialis* trong thí nghiệm nuôi cấy 2 pha với pha II sốc muối

### Thí nghiệm nuôi cấy 2 pha ở tảo *H. pluvialis* với pha II sốc muối

Quy trình nuôi cấy hai pha trong đó pha một nuôi cấy tảo dưới điều kiện tối ưu để đạt mật độ tế bào cực đại, sau đó chuyển sinh khối tảo vào pha thứ 2 với các điều kiện thuận lợi cho việc tích lũy astaxanthin đã được chứng minh là mô hình hiệu quả để thu được sinh khối *H. pluvialis* giàu astaxanthin [18]. Trong thí nghiệm nuôi cấy 2 pha với pha II sốc muối này, chúng tôi đã tiến hành theo đúng quy trình trên. Trước hết, tảo được nuôi cấy dưới điều kiện tối ưu cho đến khi tảo bắt đầu đi vào pha cân bằng với mật độ tế bào cực đại là  $28 \times 10^4$  TB/ml và hàm lượng

chlorophyll a đạt  $400 \pm 10 \mu\text{g/l}$  sau 10 ngày nuôi cấy. Tiếp theo, tảo được chuyển sang điều kiện sốc muối để kích thích tế bào chuyển sang giai đoạn bào xác có tích lũy cao astaxanthin. Theo công bố của Boussiba & Vonshak (1991) [3], khi tảo *H. pluvialis* gặp điều kiện bất lợi như nồng độ muối cao thì tế bào tảo sẽ có cơ chế tự bảo vệ bằng cách ngừng sinh trưởng hoàn toàn, tế bào chuyển từ trạng thái sinh dưỡng, có màu xanh, chuyển động sang dạng bào xác, màu đỏ và tích lũy lượng lớn astaxanthin trong tế bào. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng quan sát thấy sự thay đổi hình thái của tế bào tảo khi cảm ứng bằng nồng độ

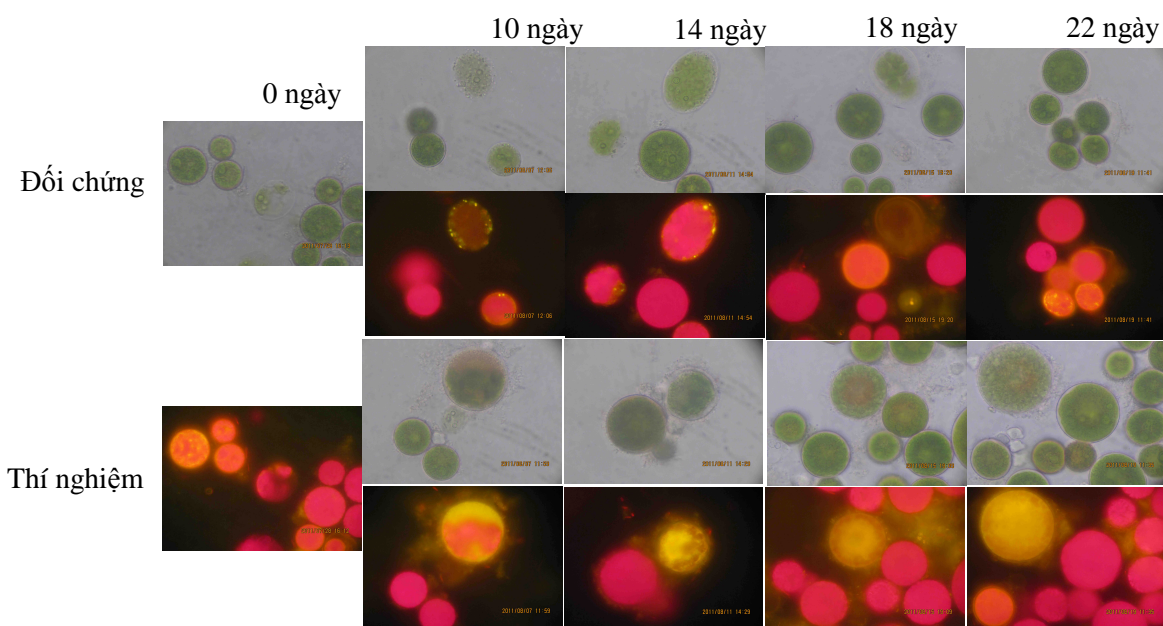
NaCl 0,8% (hình 7). Sự thay đổi về mật độ tế bào trong 2 pha của thí nghiệm được trình bày ở hình 8.

Kết quả chỉ ra ở hình 8 cho thấy, trong 10 ngày của pha I, mật độ tế bào có xu hướng tăng nhẹ và đạt giá trị cao nhất là  $31 \times 10^4$  TB/ml ở ngày thứ 5 sau nuôi. Sau 10 ngày nuôi, NaCl sẽ được bổ sung với nồng độ 0,8% vào môi trường nuôi để kích thích tế bào tích lũy astaxanthin. Lúc này, mật độ tế bào trong pha II có sự sai khác rõ rệt giữa công thức đối chứng và thí nghiệm. Ở công thức đối chứng, mật độ tế bào có xu hướng duy trì ổn định trong quá trình nuôi. Ngược lại, ở công thức thí nghiệm, khi cảm ứng bằng nồng độ muối cao sẽ ức chế sinh trưởng của tảo, mật độ tế bào của công thức thí nghiệm lại giảm 2,5 lần so với giá

trị mật độ tế bào đầu pha II sau 22 ngày nuôi.

Sự thay đổi về hàm lượng sắc tố astaxanthin và hàm lượng lipid tổng số trong nuôi cấy ở pha II được trình bày ở hình 9 và 10. Kết quả chỉ ra trên hình 9 và 10 đã cho thấy, hàm lượng astaxanthin/tế bào của công thức đối chứng và thí nghiệm có xu hướng tăng dần trong cả pha I và pha II. Tuy nhiên, khi có sử dụng tác nhân sốc muối, hàm lượng astaxanthin/tế bào tăng đột biến. Sau 6 ngày sốc muối, hàm lượng sắc tố astaxanthin tăng từ 5 pg/TB lên 37 pg/TB.

Hàm lượng lipid tổng số của tảo ở pha I có xu hướng tăng nhẹ từ  $13,54 \pm 0,23\%$  TLK ở 0 ngày đến  $14,92 \pm 0,34\%$  TLK ở ngày thứ 10. Sau khi chuyển tảo sang pha II dưới điều kiện sốc muối, hàm lượng lipid tổng số tăng nhanh, từ  $14,92 \pm 0,34\%$  TLK lên  $17,14 \pm 0,26\%$  TLK sau 6 ngày.



Hình 11. Hình thái tế bào tảo *H. pluvialis* chụp dưới kính hiển vi quang học (hàng trên) và kính hiển vi huỳnh quang sau khi nhuộm Nile Red (hàng dưới) (độ phóng đại 1000 lần) ở công thức đối chứng và công thức 0,8% NaCl trong bình tam giác 250 mL

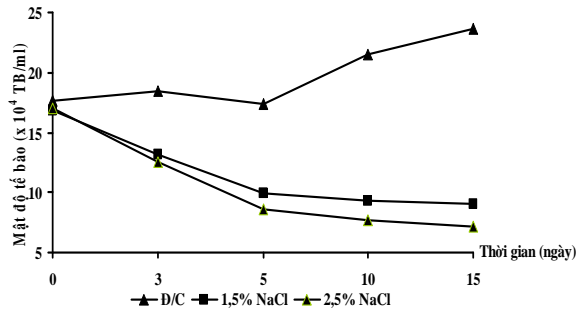
Sự thay đổi hàm lượng lipid bên trong tế bào tảo *H. pluvialis* cũng được phát hiện nhanh bằng phương pháp nhuộm tế bào bằng Nile Red. Chất nhuộm Nile Red sẽ đi qua màng tế bào và liên kết với các thể lipid trung tính nội bào và phát huỳnh quang màu vàng khi được chiếu bằng ánh sáng huỳnh quang ở dải bước sóng từ 450-490 nm (hình 11). Kết quả chỉ ra ở hình 11

đã cho thấy, ở công thức đối chứng, thể lipid nhỏ, tập trung ở mép ngoài của tế bào, thể hiện qua các thể bắt màu vàng. Trong khi đó, ở công thức thí nghiệm, các thể lipid tập trung ở cả bên trong tế bào vùng quanh nhân, bắt màu vàng đậm.

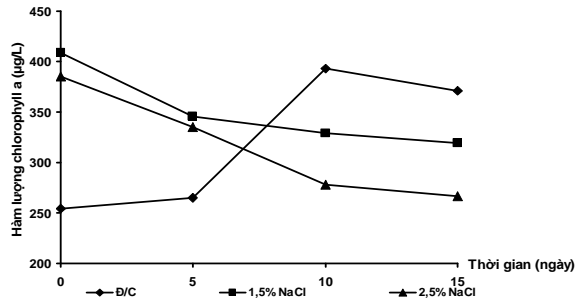
Tuy nhiên, khi tiến hành sốc muối ở nồng độ 0,8% NaCl thì quá trình carotenoid hóa diễn

ra chậm, các tế bào chuyển sang giai đoạn bào xác nhanh nhưng quá trình tích lũy astaxanthin bên trong tế bào kéo dài. Sau 22 ngày, sắc tố đỏ của các tế bào *H. pluvialis* ở công thức thí nghiệm sốc muối chỉ tập trung quanh vùng nhân. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Sarada et al. (2002) [20] đã công bố. Tác giả đã chỉ ra rằng, thời gian nuôi

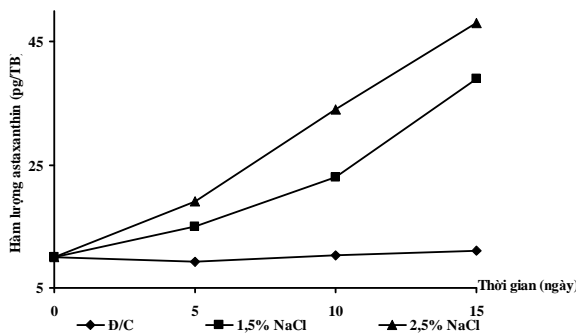
giống ban đầu (tuổi tảo) là yếu tố quyết định khởi động quá trình sinh tổng hợp astaxanthin ở mẫu cảm ứng bởi sốc muối. Khi dịch tảo mới được hoạt hóa (4-8 ngày nuôi) rất mẫn cảm với NaCl, trong khi đó, nếu dịch tảo nuôi trước đó 12-16 ngày thì có khả năng chống chịu tốt hơn với sốc muối và vì vậy, thời gian tích lũy astaxanthin kéo dài đến 20 ngày.



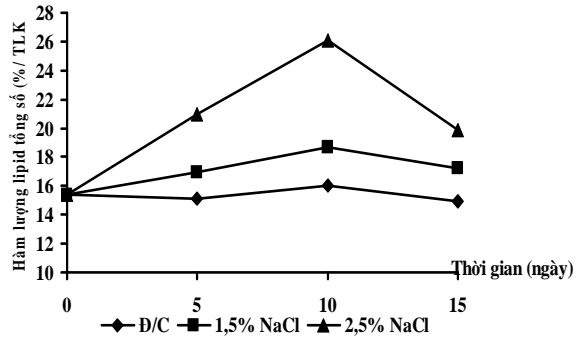
Hình 12. Sự thay đổi mật độ tế bào tảo *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau



Hình 13. Sự thay đổi hàm lượng chl a của tảo *H. pluvialis* ở các nồng độ sốc muối khác nhau



Hình 14. Sự thay đổi hàm lượng astaxanthin của tảo *H. pluvialis* ở các nồng độ sốc muối khác nhau



Hình 15. Sự thay đổi hàm lượng lipid tổng số của tảo *H. pluvialis* ở các nồng độ sốc muối khác nhau

Cũng theo tác giả Sarada et al. (2002) [20], khi sốc muối ở tảo *H. pluvialis* cần có chu kỳ cảm ứng dài hơn hoặc kết hợp với nhiều tác nhân cảm ứng khác mới tích lũy lượng lớn carotenoid bên trong tế bào. Để làm rõ hơn vấn đề này, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm sốc muối lần 2 với nồng độ muối cảm ứng là 1,5 và 2,5% kết hợp với nhiệt độ cao (> 30°C). Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 12, 13, 14 và 15.

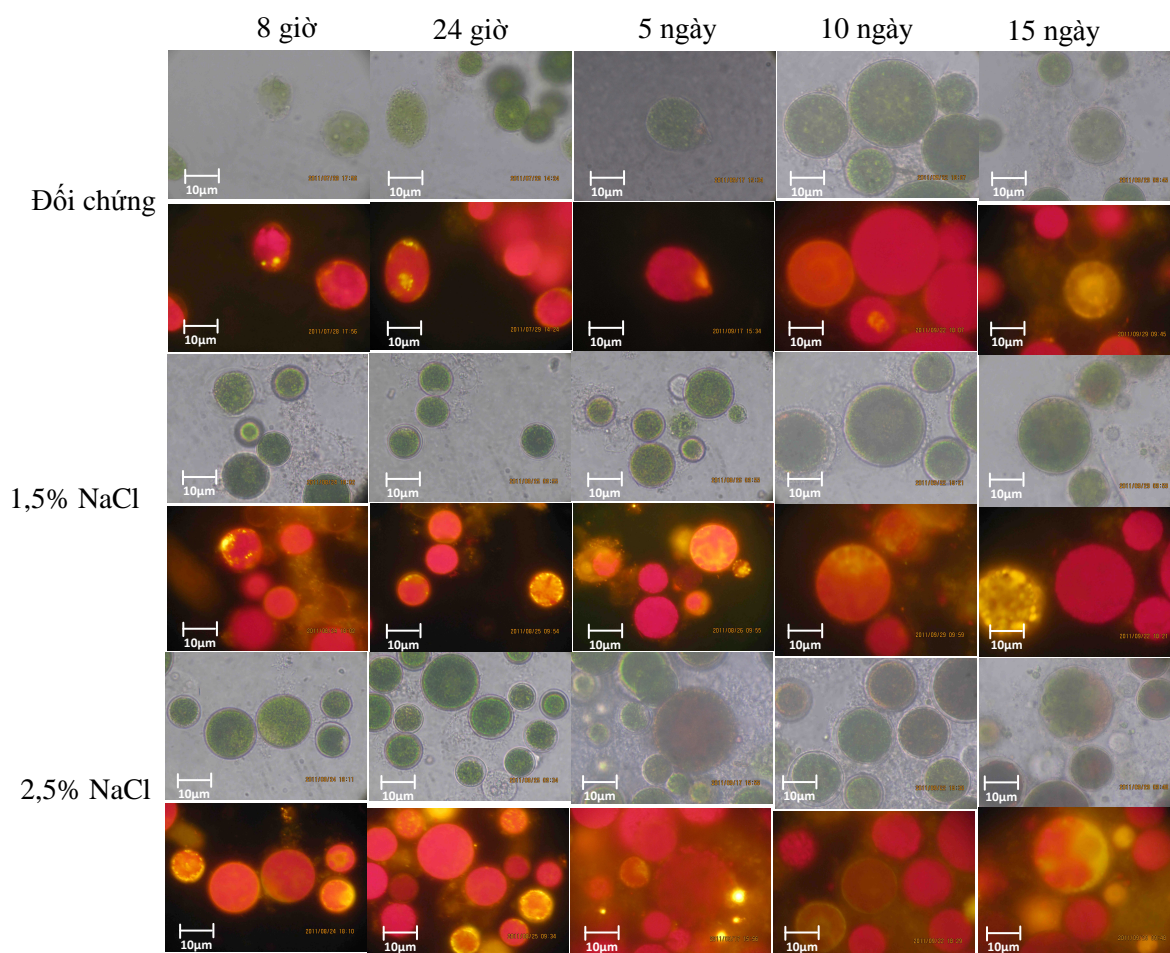
Kết quả chỉ ra ở hình 12 đã cho thấy, mật độ tế bào ở công thức đối chứng tiếp tục tăng, từ  $33 \times 10^4$  lên  $47 \times 10^4$  TB/ml và chúng tôi không quan sát thấy có sự thay đổi trạng thái tế bào từ

tế bào dạng sinh dưỡng sang dạng bào xác sau 15 ngày nuôi. Trong khi đó, giá trị mật độ tế bào ở môi trường có bổ sung NaCl với các nồng độ khác nhau lại có xu hướng giảm rõ rệt, đặc biệt là ở nồng độ muối 2,5%. Sau 15 ngày, mật độ tế bào ở công thức này giảm hơn 2 lần so với giá trị ban đầu, từ  $33 \times 10^4$  xuống  $14 \times 10^4$  TB/ml, tế bào ở trạng thái bào xác và tích lũy một lượng lớn astaxanthin bên trong tế bào. Tuy nhiên, tế bào bị mất dần sắc tố và bị chết khi nuôi ở nồng độ muối cao trong thời gian dài.

Khi sử dụng nồng độ muối cao kết hợp với nhiệt độ cao thì quá trình chuyển giai đoạn từ tế

bào sinh dưỡng sang tế bào dạng bào xác diễn ra rất nhanh trong vòng 8 giờ. Đến ngày thứ 5, chúng tôi quan sát thấy dịch tảo chuyển sang màu nâu đỏ và tích lũy một lượng lớn sắc tố đỏ bên trong tế bào của chúng. Kết quả về sự thay đổi hàm lượng sắc tố (chlorophyll a và astaxanthin) được trình bày ở hình 13 và hình 14. Hàm lượng chlorophyll a ở các công thức có xu hướng tăng sau 5 ngày nuôi, sau đó hàm lượng này giảm dần sau 15 ngày sốc muối (hình 13). Riêng ở công thức đối chứng, trong giai đoạn từ ngày thứ 10 đến 15, hàm lượng chlorophyll a giảm trong khi mật độ tế bào vẫn tăng. Điều này được giải thích là do sự giảm hàm lượng chlorophyll a trong tế bào tảo

*H. pluvialis* lớn hơn so với sự tăng mật độ. Ngoài ra, cũng có thể hàm lượng chlorophyll b vẫn tăng cao trong trường hợp này nên tảo vẫn tăng mật độ tế bào. Ngược lại, với xu hướng thay đổi của chlorophyll a, hàm lượng astaxanthin của tế bào tảo *H. pluvialis* tăng mạnh, từ 10 pg/TB ở ngày thứ nhất lên 39 và 48 pg/TB ở ngày thứ 15, tương ứng với công thức nồng độ muối 1,5% và 2,5%, lần lượt. Ở nồng độ muối 2,5%, tảo chuyển sang giai đoạn bào xác sớm, chỉ trong vòng 1 ngày. Như vậy, sự kết hợp giữa nồng độ muối cao và nhiệt độ cao là nhân tố giới hạn, giúp tảo *H. pluvialis* chuyển pha nhanh và cảm ứng tích lũy lượng lớn astaxanthin bên trong tế bào.



Hình 16. Hình thái tế bào tảo *H. pluvialis* chụp dưới kính hiển vi quang học (hàng trên) và kính hiển vi huỳnh quang sau khi nhuộm Nile Red (hàng dưới) (độ phóng đại 1000 lần) ở công thức đối chứng, công thức 1,5 và 2,5% NaCl trong bình tam giác 500 và 1000 ml



Sự tích lũy astaxanthin trong tế bào *H. pluvialis* dưới điều kiện sốc muối đã được trình bày trong các nghiên cứu của Boussiba & Vonshak (1991), Cifuentes et al. (2003), Kobayashi et al. (1997) [3, 5, 12]. Mặc dù thí nghiệm của chúng tôi được tiến hành dựa theo công bố của Cifuentes et al. (2003) [5] nhưng nồng độ NaCl thích hợp nhất để kích thích sự tích lũy astaxanthin của chủng tảo *H. pluvialis* Flotow mà chúng tôi phân lập được tại Hòa Bình là cao hơn so với kết quả của nghiên cứu của các tác giả trên đã công bố (2,5% NaCl so với 0,8% NaCl). Vì vậy, việc áp dụng các phương pháp nghiên cứu khác nhau đối với chủng tảo địa phương nên được cải biến hợp lý để thu được các kết quả tốt và tin cậy.

Golyal (2007) [8] đã chỉ ra rằng sốc muối là nguyên nhân gây ra sự tăng hàm lượng của lipid nội bào và glycerol ở tảo *Dunaliella tertiolecta*. Trong thí nghiệm này, chúng tôi cũng tìm hiểu mối liên hệ giữa quá trình chuyển pha tế bào từ sinh dưỡng sang giai đoạn bào xác, tích lũy astaxanthin và quá trình tích lũy lipid tổng số bên trong tế bào. Kết quả về sự thay đổi hàm lượng lipid tổng số của tảo *H. pluvialis* ở các nồng độ NaCl khác nhau được trình bày ở hình 15. Kết quả chỉ ra ở hình 15 cho thấy, quá trình tích lũy lipid tổng số và astaxanthin xảy ra đồng thời. Ở công thức đối chứng và công thức có nồng độ muối 1,5%, hàm lượng lipid tổng số dao động trong khoảng  $15 \pm 0,35\%$  -  $19 \pm 1,3\%$  TLK và không có sự khác biệt nhiều giữa các ngày nuôi. Ngược lại, hàm lượng này tăng mạnh ở công thức có nồng độ muối 2,5% (tăng từ  $15 \pm 0,35\%$  lên  $26 \pm 0,12\%$  TLK) sau 10 ngày sốc muối. Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian sốc muối lên 15 ngày thì hàm lượng lipid tổng số lại giảm đi. Điều này có thể do tảo bị chết khi nuôi ở nồng độ muối cao, dẫn tới hàm lượng lipid tổng số trên trọng lượng khô tế bào giảm.

Hình 16 cho thấy, các thể lipid tập trung nhiều ở vùng màng xung quanh tế bào và có kích thước không đều. Tuy nhiên, khi nhuộm tế bào *H. pluvialis* chúng tôi nhận thấy, rằng mức độ bắt màu vàng với chất nhuộm Nile Red tăng dần khi tế bào chuyển sang giai đoạn bào xác và bắt đầu tích lũy astaxanthin, nhưng sau đó giảm dần khi tế bào chuyển sang dạng bào xác hoàn toàn. Điều này gợi ý rằng, có thể trong quá trình

chuyển pha sang giai đoạn bào xác, thành phần lipid cũng có sự biến đổi về lượng giữa triacylglycerol, phospholipid và cholesterol. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả định lượng lipid tổng số theo phương pháp của Bligh & Dyer (1959) [1].

## KẾT LUẬN

Nồng độ muối NaCl có ảnh hưởng rõ rệt lên sinh trưởng và khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *H. pluvialis*. Nồng độ muối 0,6- 0,8% sẽ kìm hãm sinh trưởng và kích thích tảo tích lũy astaxanthin.

Việc bổ sung NaCl 0,8% vào môi trường nuôi trong pha II của quy trình nuôi cấy 2 pha tảo *H. pluvialis* như là một tác nhân để cảm ứng sự tích lũy astaxanthin cho hiệu quả không cao. Thời gian chuyển pha từ tế bào sinh dưỡng sang dạng bào xác kéo dài hơn 20 ngày. Khi tăng nồng độ NaCl lên 2,5% kết hợp với nhiệt độ cao sẽ kích thích tảo chuyển sang giai đoạn bào xác nhanh hơn (trong vòng 8 giờ) và bắt đầu tích lũy astaxanthin. Ở nồng độ muối 2,5%, hàm lượng astaxanthin tăng từ 10 pg/TB lên 48 pg/TB sau 15 ngày sốc muối. Kết quả thu được này là những dữ liệu có giá trị khoa học bước đầu phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo về quy trình nuôi cấy hai pha để thu được sinh khối tảo *H. pluvialis* giàu astaxanthin.

Quá trình tích lũy astaxanthin và lipid tổng số ở tảo *H. pluvialis* xảy ra đồng thời với quá trình chuyển trạng thái tế bào từ sinh dưỡng sang dạng bào xác. Ở công thức đối chứng và công thức có nồng độ NaCl 1,5%, hàm lượng lipid tổng số dao động từ  $15 \pm 0,35\%$  đến  $19 \pm 1,3\%$  trọng lượng khô. Khi tăng nồng độ NaCl lên 2,5%, lipid tổng số đạt giá trị cao nhất là  $26 \pm 0,12\%$  trọng lượng khô sau 10 ngày.

**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” Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn thuộc Chương trình Công nghệ sinh học trong thủy sản năm 2010-2012 cho Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bligh E. G. and Dyer W. J., 1959. A rapid

- method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
2. Boussiba S., Bing W., Yuan J-P., Zarka A. and Chen F., 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.*, 21: 601-604.
  3. Boussiba S. and Vonshak A., 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.*, 32: 1077-1082.
  4. Cerón M. C., García-Malea M. C., Rivas J., Acien F. G., Fernández J. M., Del Río E., Guerrero M. G. and Molina E., 2007. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 1112-1119.
  5. Cifuentes A. S., González M. A., Vargas S., Hoeneisen M. and González N., 2003. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Necada, USA) under laboratory conditions. *Biol. Res.*, 36: 343-357.
  6. Doan T. T. Y., Obbard J. P., 2011. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp.. *J. Appl. Phycol.*, 23(50): 895-901.
  7. Fábregas J., Domínguez A., Álvarez D. G., Lamela T. and Otero A., 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, 20(6): 623-626.
  8. Goyal A., 2007. Osmoregulation in *Dunaliella*. II. Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol. Biochem.*, 45:705-710.
  9. Đinh Đức Hoàng, Lưu Thị Tâm, Nguyễn Thị Thu Thủy, Đặng Diễm Hồng, 2011. 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. *Tạp chí Sinh học*, 33(1): 59-66.
  10. Đặng Diễm Hồng, Đinh Đức Hoàng, Nguyễn Thị Thủy, Hoàng Thị Lan Anh, 2010. Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi trồng vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin. *Tạp chí Sinh học*, 32(2): 43-53.
  11. Kang C. D., Lee J. S., Park T. H., Sim S. J., 2005. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68: 237-241.
  12. Kobayashi M., Kurimura Y., Tsuji Y., 1997. Light independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Lett.*, 19: 507-509.
  13. Lorenz R. T., Cysewski G. R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *TibTech*, 18: 160-167.
  14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J., 1991. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
  15. Manny B. A., 1969. The relationship between organic nitrogen and the carotenoid to chlorophyll a ratio in five freshwater phytoplankton species. *American Society of Limnology and Oceanography*, 11 pages.
  16. Mendoza H., Martel A. M., Jiménez del Río M. and García Reina G., 1999. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.*, 11: 15-19.
  17. Miki W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 63: 141-146.
  18. Olaizola M., 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.*, 12: 499-506.
  19. Rabbani S., Beyer P., Lintig J., Philippe H. and Kleinig H., 1998. Induced  $\beta$ -Carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.*, 116: 1239-1248.

20. Sarada R., Tripayhi U., Ravishankar G. A., 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochem.*, 37: 623-627.
21. Strickland J. D. H., Parsons T. R., 1972. A manual of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 125, 310 p.
22. Ngô Thị Hoài Thu, Lưu Thị Tâm, Đặng Diễm Hồng, 2008. Một số đặc điểm sinh học của 2 loài vi tảo biển *Isochrysis galbana* và *Nannochloropsis oculata* phân lập tại Việt Nam được sử dụng làm thức ăn tươi sống cho nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí Hóa học*, 46(5A): 98-104
23. Tjahjono A. E., Kakizono T., Hayama Y., Nishio N. and Nagai S., 1994. Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis* and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *J. Ferment Bioeng.*, 77(4): 352-357.
24. Yuan J. P., Chen F., 2000. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chem*, 68: 443-448.
25. Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka A., Cohen Z., 2002. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J. Phycol.*, 38: 325-331.
26. Zhekisheva M., Zarka A., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S., 2005. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 41: 819-826.

**STUDY ON THE EFFECT OF SALT CONCENTRATION ON GROWTH AND ASTAXANTHIN ACCUMULATION OF MICROALGAE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* AS THE INITIAL BASIS FOR TWO PHASE CULTURE OF ASTAXANTHIN PRODUCTION**

**Luu Thi Tam, Dinh Duc Hoang, Dinh Thi Ngoc Mai,  
Ngo Thi Hoai Thu, Hoang Thi Lan Anh, Dang Diem Hong**

Institute of Biotechnology, VAST

**SUMMARY**

Microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow is one of the natural sources of astaxanthin, a pigment widely used in aquaculture, food, pharmaceutical and nutraceutical industries. In the present study, we investigated the effect of high NaCl concentrations on growth and astaxanthin accumulation in the microalga. Growth was observed under different salt concentrations (0.8%, 1.5% and 2.5% NaCl) according to two - phase culture mode. The obtained results have indicated that the high NaCl concentrations caused an increase in carotenoid content per cell and a decrease in the algal growth. The best carotenogenic condition by addition of salt was obtained at 2.5% NaCl under high temperature. Astaxanthin content per cell increased 4.8 folds in comparison to the initial value, from 10 pg.cell<sup>-1</sup> to 48 pg.cell<sup>-1</sup> after 15 days of salt stress. We observed that the accumulation of total lipid content was correlated with an increasing in astaxanthin content. The total lipid content of control was 15 ± 0,35% of dry cell weight whereas that of cell exposed to salt stress was 19% ± 1,3% and 26 ± 0.12% at 1.5% and 2.5% NaCl concentrations, respectively. This study will be an initial basis for the two phase culture process to obtain astaxanthin rich *Haematococcus pluvialis* biomass.

*Keywords: Astaxanthin accumulation, Haematococcus pluvialis, salt stress, total lipid, two phase culture.*

Ngày nhận bài: 14-2-2012