

TỔNG QUAN

TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VI KHUẨN SẢN SINH ASTAXANTHIN VÀ ỨNG DỤNG TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

Nguyễn Thị Kim Liên<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Lan<sup>1</sup>, Nguyễn Kim Thoa<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Diệu Phương<sup>3</sup>, Nguyễn Quang Huy<sup>3</sup>, Nguyễn Huy Hoàng<sup>1</sup>, ✉

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nhhoang@igr.com

Ngày nhận bài: 13.3.2017

Ngày nhận đăng: 20.01.2018

TÓM TẮT

Astaxanthin là một sắc tố tạo nên màu đỏ hoặc màu hồng ở nhiều động vật biển và giáp xác. Astaxanthin có vai trò quan trọng trong việc tạo nên giá trị thương mại của các loài thủy sản, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong nâng cao khả năng sinh sản cũng như khả năng sống sót của các loài thủy sản. Do động vật và giáp xác không có khả năng tự tổng hợp astaxanthin nên nhu cầu astaxanthin đặc biệt là astaxanthin tự nhiên để bổ sung vào thức ăn cho động vật thủy sản ngày càng tăng cao. Nguồn astaxanthin tự nhiên từ tảo, nấm men và vi khuẩn đang được sử dụng trong sản xuất công nghiệp. Tuy nhiên, astaxanthin từ vi khuẩn có ưu điểm là dễ dàng hấp thụ hơn so với tảo và nấm men. Do đó, sinh tổng hợp astaxanthin bởi vi khuẩn đang rất được chú ý. Nhiều loại vi khuẩn có thể sinh astaxanthin bao gồm *Paracoccus* spp., *Agrobacterium* spp., *Sphingomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Halobacterium* spp... Trong đó, loài vi khuẩn được nghiên cứu và sử dụng nhiều nhất là *Paracoccus carotinifaciens*. Trong bài tổng quan này, chúng tôi tóm lược vai trò và tình hình sử dụng astaxanthin, đặc biệt là astaxanthin từ vi khuẩn trong nuôi trồng động vật thủy sản cần tăng cường màu sắc đỏ cam như cá cảnh, cá hồi vân và tôm trên thế giới và Việt Nam. Bên cạnh đó, một số tiến bộ trên thế giới trong việc tăng năng suất sinh astaxanthin như kỹ thuật chuyển gen và lên men sinh khối vi sinh vật cũng được thảo luận. Đây là những thông tin hữu ích cho việc phát triển và ứng dụng astaxanthin từ vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản.

**Từ khóa:** Astaxanthin, nuôi trồng thủy sản, vai trò và ứng dụng, vi khuẩn sinh astaxanthin

MỞ ĐẦU

Astaxanthin là một xanthophyll carotenoid được tìm thấy trong nhiều vi sinh vật biển. Astaxanthin liên kết với protein tạo màu sắc đỏ hay hồng của động vật và giáp xác như tôm, cua, ghẹ, tôm hùm, cá hồi và nhiều động vật biển khác (Goodwin, 1984; Davis, 1985; Matsuno, Hirao, 1989). Do động vật và giáp xác không có khả năng tự tổng hợp astaxanthin nên trong quá trình nuôi trồng chất này cần được cung cấp qua nguồn thức ăn. Astaxanthin được sử dụng hiện nay chủ yếu là từ nguồn tổng hợp hóa học có giá thành cao (khoảng 2000 USD/kg) và chưa được cho phép sử dụng ở Mỹ như một dạng thực

phẩm chức năng (Tangeras, Slinde, 1994). Do vậy nhu cầu astaxanthin sinh tổng hợp có nguồn gốc tự nhiên thay thế cho nguồn tổng hợp hóa học đang ngày càng tăng. Các nguồn sinh tổng hợp astaxanthin tự nhiên có thể kể đến như là tảo, nấm men và vi khuẩn đang được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp. Tuy nhiên, astaxanthin từ vi khuẩn có một số ưu điểm so với tảo và nấm men là dễ dàng hấp thụ hơn. Do đó, sinh tổng hợp astaxanthin bởi vi khuẩn rất được chú ý.

Một số bài tổng quan tập trung vào đánh giá khả năng sản sinh astaxanthin và các carotenoid bởi tảo, nấm sợi và nấm men cũng như vai trò của chúng trong dược học và nuôi trồng thủy sản (Gupta *et al.*,

2007; Ambati *et al.*, 2014), tuy nhiên các báo cáo về astaxanthin sinh tổng hợp bởi vi khuẩn và ứng dụng của chế phẩm thì chưa được tổng kết. Chính vì vậy, trong bài báo này, chúng tôi tổng hợp lại một số kết quả nghiên cứu về các vi khuẩn sinh astaxanthin; công nghệ chuyển gen và một số kết quả tối ưu hóa quá trình lên men để tăng khả năng tạo astaxanthin của vi khuẩn; vai trò và tình hình sử dụng astaxanthin trong nuôi trồng thủy sản trên thế giới và ở Việt Nam. Các thông tin trong bài sẽ góp phần hiểu biết rõ hơn ứng dụng cũng như triển vọng phát triển các chế phẩm giàu astaxanthin từ vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản.

## VAI TRÒ CỦA ASTAXANTHIN TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

Astaxanthin là sắc tố thuộc nhóm carotenoid có vai trò quan trọng trong nuôi trồng thủy sản. Động vật thủy sản không có khả năng tự tổng hợp astaxanthin, nên muốn duy trì màu đỏ hay hồng tự nhiên thì phải bổ sung astaxanthin qua thức ăn. Ngoài tự nhiên, động vật thủy sản hấp thụ astaxanthin khi chúng ăn tảo biển, động vật phù du, giáp xác (tôm, cua, ghẹ...). Trong điều kiện nuôi thâm canh, nguồn thức ăn tự nhiên hạn chế nên phải bổ sung astaxanthin cho thủy sản nuôi bằng cách bổ sung vào thức ăn công nghiệp. Thức ăn cho tôm, cá hồi vân, cá hồi Đại Tây Dương, thức ăn cho cá cảnh biển đều được bổ sung astaxanthin. Bên cạnh việc tăng màu sắc cho cá, astaxanthin còn thúc đẩy quá trình sinh sản của cá như: tăng khả năng sinh trưởng và thành thực sinh dục, khả năng sinh sản và chất lượng trứng, gia tăng sự phát triển phôi (Putnam, 1991). Astaxanthin làm tăng chất lượng trứng và tỷ lệ sống của cá bột, cá hồi vân, cá tráp đỏ và cá cam. Đối với tôm, astaxanthin là chất chống oxi hóa đóng vai trò quan trọng bảo vệ trứng khỏi hư hỏng và là chất dinh dưỡng dự trữ cần thiết cung cấp cho ấu trùng phát triển, giúp nâng cao tỷ lệ sống của ấu trùng tôm (Wouters *et al.*, 2001).

Như vậy, astaxanthin không những tạo nên màu sắc đỏ, làm tăng giá trị thương mại và giá trị thẩm mỹ của sản phẩm thủy sản mà còn có vai trò quan trọng trong dinh dưỡng và sinh sản ở động vật thủy sản.

### **Sử dụng astaxanthin trong nuôi cá cảnh**

Ngành công nghiệp cá cảnh của thế giới phát triển mạnh mẽ trong những thập niên gần đây. Theo báo cáo của FAO (Food and Agriculture Organization), thương mại cá cảnh trên thế giới đạt

900 triệu USD và khoảng 3 tỷ USD giá trị bán lẻ vào năm 2000. Tốc độ tăng trưởng bình quân 14%/năm kể từ năm 1985. Các nước đang phát triển chiếm 2/3 sản lượng cá cảnh cung cấp cho thị trường thế giới. Thị trường tiêu thụ cá cảnh chủ yếu gồm châu Âu, Mỹ, Nhật Bản (Ngô Thị Thanh Hương, Nguyễn Văn Tam, 2014).

Liên quan đến việc tăng màu sắc cho cá cảnh, đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới về bổ sung sắc tố (carotenoid) vào thức ăn nuôi cá. Paripatananont *et al.*, (1999) đã xác định được hàm lượng astaxanthin tối ưu để hình thành sắc tố trên da cá vàng (*Carassius auratus*) là 36 - 37 mg/kg. Tan (2006) sử dụng astaxanthin có nguồn gốc hóa tổng hợp Caroten Pink, Caroten Red hoặc có nguồn gốc sinh tổng hợp từ tảo *Spirulina* với các liều lượng khác nhau (100 - 500 ppm) để nghiên cứu trên cá chép Nhật hay còn gọi là cá Koi (loại Kohaku). Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng sắc tố trong thức ăn ảnh hưởng đến tăng trưởng và màu sắc của cá Koi. Màu sắc của cá cũng phụ thuộc vào nguồn gốc sắc tố là tổng hợp hay tự nhiên với liều thích hợp từ 100 - 250 ppm và thời gian cho ăn từ 8 - 12 tuần. Tảo *Spirulina* còn tăng cường màu sắc vàng của cá cichlid tai vàng, tăng cường khả năng hấp thụ thức ăn và khả năng sản xuất trứng của chúng (Güroy *et al.*, 2012). Trong thí nghiệm với cá khoang cổ Nemo, nhóm bổ sung astaxanthin hóa tổng hợp (Carophyll Pink 8%) làm tăng màu sắc da cá khoang cổ Nemo so với nhóm đối chứng, tuy nhiên không có sự sai khác về chiều dài và khối lượng giữa 2 nhóm (Seyedi *et al.*, 2013). Yedier *et al.*, (2014) cho biết màu sắc của cá ngựa đỏ (*Maylandia estherae*) phụ thuộc vào loại sắc tố và hàm lượng sắc tố có trong thức ăn. Astaxanthin trong thức ăn tăng cường màu đỏ-vàng trên da cá ngựa đỏ, trong khi đó sắc tố trong tảo *Spirulina* tăng màu cam và vàng.

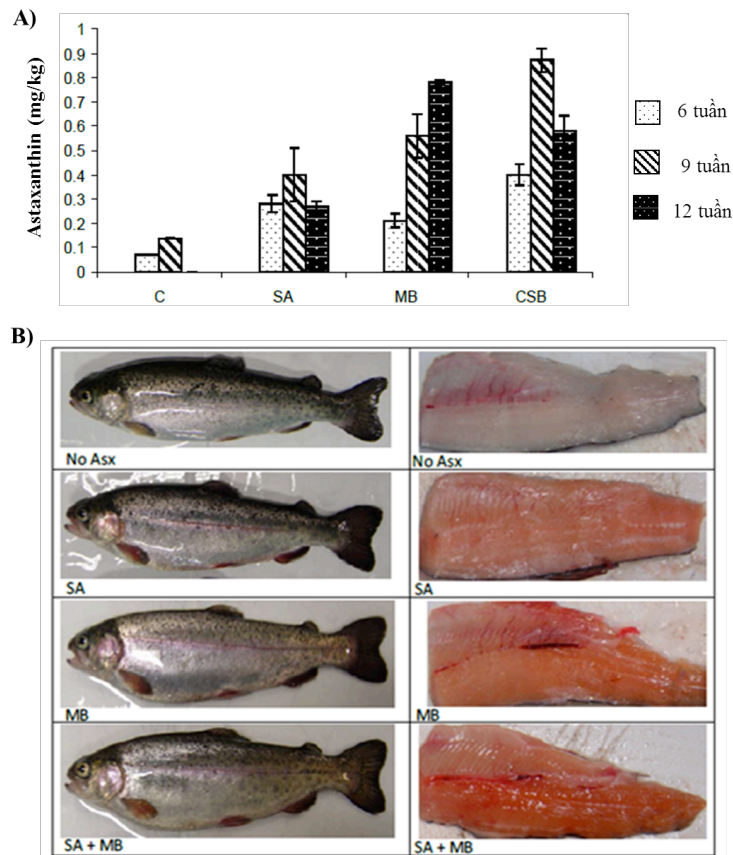
### **Sử dụng astaxanthin vào thức ăn cho tôm**

Yamada *et al.*, (1990) đã tiến hành nghiên cứu hàm lượng astaxanthin bổ sung vào thức ăn cho tôm he Nhật Bản với liều từ 50 đến 400 ppm trong thời gian 8 tuần. Kết quả nghiên cứu cho thấy chế độ cho ăn với hàm lượng astaxanthin tăng đến 200 ppm thì sự tích lũy astaxanthin trong tôm cũng tăng lên tối đa là 29,1 mg/kg trọng lượng cơ thể. Tuy nhiên, chế độ bổ sung > 200 ppm không dẫn đến sự gia tăng nồng độ astaxanthin trong cơ thể, chứng tỏ lượng bổ sung đã đạt đến mức bão hòa. Ngoài ra, tỷ lệ sống của tôm đạt 91% với hàm lượng astaxanthin bổ sung là 100 ppm, cao hơn so với 57% trong nhóm đối chứng. Thử nghiệm khác cho tôm he Nhật Bản ăn thức ăn

có bổ sung astaxanthin với liều 100 ppm, canthaxanthin với liều 100 ppm và một hỗn hợp của carotenoid (astaxanthin 100 ppm + canthaxanthin 100 ppm) đã được tiến hành. Kết quả cho thấy chế độ bổ sung astaxanthin cho phép tích tụ sắc tố trong thịt cao hơn 128% so với canthaxanthin và cao hơn 135% so với hỗn hợp astaxanthin-canthaxanthin (Nègre-Sadargues *et al.*, 1993).

Nghiên cứu của Marsden *et al.*, (1997) cho biết có thể thay thế 100% thức ăn tươi sống (mực và vẹm) khi sử dụng viên ẩm (soft pellet diet) có bổ sung astaxanthin (40 mg/kg) và beta-caroten (40 mg/kg) trong nuôi vỗ tôm sú bố mẹ. Thức ăn viên ẩm BIARC2 trong nghiên cứu này, cho tần suất sinh sản cao hơn (1,4 lần) so với tôm ăn thức ăn đối chứng (thức ăn sống) và cho tỉ lệ sống từ ấu trùng đến giai đoạn hậu ấu trùng 1 (74,6%) cao hơn so với công thức đối chứng (39,5%). Ở một nghiên cứu

khác, Paibulkichakul *et al.*, (2008) bổ sung astaxanthin (từ nguồn chlophyll pink - tảo *Haematococcus pluvialis*) và HUFAs (chủ yếu DHA và ARA từ dầu cá) vào thức ăn viên kết hợp với thức ăn tươi (mực) nuôi vỗ tôm sú bố mẹ cho thấy việc bổ sung astaxanthin với lượng ít nhất là 280 mg/kg thức ăn và 8% dầu cá (thức ăn có 12% lipid) cải thiện đáng kể chất lượng sinh sản của cả tôm cái và tôm đực. Nghiên cứu ở tôm thẻ chân trắng giai đoạn hậu ấu trùng cho thấy để tăng khả năng phát triển và sống sót của hậu ấu trùng thì hàm lượng astaxanthin cung cấp là từ 100 mg đến 200 mg/kg (Niu *et al.*, 2009). Nhóm tác giả này còn chứng minh astaxanthin làm tăng khả năng tăng trọng, tỷ lệ sinh trưởng và sống sót trên tôm sú (Niu *et al.*, 2012). Zhang *et al.*, (2013) cũng kết luận rằng với nồng độ astaxanthin bổ sung 125 mg và 150 mg/kg thì khả năng tăng trọng, tỷ lệ phát triển và chống oxi hóa tăng hơn so với đối chứng.



**Hình 1.** Kết quả đánh giá hàm lượng astaxanthin và màu sắc của cơ thịt cá hồi vân sau khi bổ sung astaxanthin hóa tổng hợp và vi khuẩn biển theo Kurnia *et al.*, (2015). A) Hàm lượng astaxanthin trong cơ thịt cá hồi vân trong suốt quá trình thí nghiệm. B) Hình ảnh màu sắc cơ thịt cá khi kết thúc thí nghiệm. Ast, astaxanthin; SA, astaxanthin hóa tổng hợp; MB, vi khuẩn biển; CSB, kết hợp astaxanthin hóa tổng hợp và vi khuẩn.

### Sử dụng astaxanthin vào thức ăn cho cá hồi

Đối với cá hồi, màu hồng cơ thịt là chỉ tiêu cảm quan quan trọng để người tiêu dùng đánh giá chất lượng thịt cá. Những cá có cơ thịt màu hồng đỏ tự nhiên có giá trị thương phẩm cao, ngược lại, cá có màu hồng nhạt hoặc trắng sẽ khó tiêu thụ. Sắc tố quyết định đến màu hồng đỏ của thịt cá hồi vẫn là các carotenoid, trong đó astaxanthin. Sắc tố này phải được bổ sung qua thức ăn và dẫn được cá hồi tích lũy trong cơ (Ando *et al.*, 1992; Storebakken, No, 1992). Vì vậy, để đáp ứng thị hiếu màu sắc hồng đỏ cơ thịt cá hồi của người tiêu dùng, các trại nuôi cá hồi phải sử dụng thức ăn có bổ sung astaxanthin.

Đối với cá hồi, astaxanthin được tích lũy với lượng rất lớn trong cơ thịt. Thịt cá hồi hoang dã từ đại dương và các dòng sông thường có cơ thịt màu đỏ, màu hồng hoặc màu da cam tự nhiên với mức độ đậm nhạt khác nhau. Hàm lượng astaxanthin trong cơ thịt cá hồi có thể đạt đến 40 mg/kg. Trung bình thịt cá hồi Đại Tây Dương trong tự nhiên có chứa từ 3 - 11 mg astaxanthin/kg. Ngoài ra, để tạo màu đậm hơn cho cá hồi, astaxanthin có thể được cung cấp ở mức 450 mg/kg thức ăn trong vòng 7 tuần (Sedgwick, 1995). Theo Torrissen và Christiansen (1995), bổ sung canthaxanthin hoặc astaxanthin ở mức > 10 mg/kg thức ăn khô có thể đảm bảo nhu cầu của cá. Thử nghiệm của Ni *et al.*, (2008) bổ sung 0,75% *Paracoccus* sp. và 0,03% astaxanthin tổng hợp cho cá hồi vẫn trong 12 tuần đã làm tăng tỷ lệ astaxanthin phân tích được trong cơ thịt cá sử dụng *Paracoccus* sp. cao hơn rõ rệt so với đối chứng sử dụng astaxanthin tổng hợp. Thử nghiệm của Kurnia *et al.*, (2015) cho thấy màu sắc cơ thịt của cá hồi vẫn có bổ sung vi khuẩn biển sinh astaxanthin có màu đỏ sậm hơn so với bổ sung astaxanthin tổng hợp do hàm lượng astaxanthin trong cơ thịt cá hồi vẫn cao hơn (Hình 1).

### NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT ASTAXANTHIN TRÊN THẾ GIỚI

Nguồn astaxanthin bổ sung vào thức ăn cho cá hồi thường là dạng tổng hợp hóa học. Mặc dù, bổ sung với liều lượng rất thấp nhưng chi phí cho bổ sung astaxanthin chiếm tới 10% giá thành thức ăn (Johnson, 1991) và chưa được cấp phép sử dụng như một phụ gia thực phẩm hoặc thành phần dược phẩm (Tangeras, Slinde, 1994). Vì vậy, sử dụng nguồn astaxanthin có nguồn gốc tự nhiên được coi là hướng đi có triển vọng trong tương lai.

Astaxanthin sinh tổng hợp sản xuất từ nhiều nguồn như sản phẩm phụ trong chế biến tôm, cua (Bubrick, 1991), song do hàm lượng astaxanthin trong các sản phẩm này thấp hơn 1000 ppm nên phải bổ sung vào thức ăn cá hồi với tỷ lệ 5 - 10% mới cho hiệu quả cao về màu sắc cơ thịt (Torrissen *et al.*, 1995). Hơn nữa, nguyên liệu có nguồn gốc từ bột đầu tôm, vỏ cua thường có hàm lượng tro, florua và chitin cao, không thể bổ sung nhiều vào thức ăn thủy sản do ảnh hưởng đến hiệu quả sử dụng thức ăn.

Nguồn astaxanthin sinh tổng hợp khác từ nấm men *Phaffia rhodozyma* được sản xuất và ứng dụng khá rộng rãi. Andrews *et al.*, (1976) báo cáo rằng lượng astaxanthin chiếm 83 - 87% tổng số các carotenoids có trong *P. rhodozyma*. Tuy nhiên, việc hấp thu astaxanthin từ nấm men của động vật bị hạn chế bởi cấu tạo thành tế bào nấm men. Để nâng cao sự hấp thu astaxanthin từ nấm men cần quá trình tách chiết khá phức tạp.

Nguồn astaxanthin tự nhiên khác là từ tảo *Haematococcus pluvialis* (Guerin *et al.*, 2003). Bột tảo *H. pluvialis* có hàm lượng astaxanthin cao là một trong những sản phẩm được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thức ăn chăn nuôi thủy sản. Carotenoid của bột tảo *Haematococcus* có chứa khoảng 70% monoesters của astaxanthin, 10% diesters của astaxanthin, 5% astaxanthin tự do và phần còn lại bao gồm carotene, canthaxanthin, lutein và các carotenoids khác. Tuy nhiên, việc sử dụng tảo cho sản xuất quy mô công nghiệp bị hạn chế, nguyên nhân chính là do tảo có tốc độ sinh trưởng chậm và chu kỳ sống phức tạp. Vì vậy, đòi hỏi một số kỹ thuật phức tạp gây stress nhân tạo để có hàm lượng astaxanthin cao. Thời gian chuyển pha mất khoảng vài tuần dưới điều kiện quang tự dưỡng. Hơn nữa, astaxanthin từ tảo *Haematococcus* và nấm men *Phaffia* là khó hấp thụ vì astaxanthin nằm trong nội bào, muốn nâng cao hiệu quả sử dụng phải phá vỡ màng tế bào trước khi bổ sung vào thức ăn. Quá trình sản xuất astaxanthin đòi hỏi kỹ thuật cao để làm vỡ hơn 95% các vách tế bào để tạo ra astaxanthin có tính khả dụng sinh học tối đa.

Trong khi đó một số vi khuẩn biển được xác định là có khả năng tổng hợp astaxanthin ví dụ như loài *Agrobacterium aurantiacum* (Yokoyama *et al.*, 1994), chủng *Paracoccus haeundaesis* BC74171 (Lee *et al.*, 2004), và chủng *Paracoccus schoinia* NBRC 100637<sup>T</sup> (Takaichi *et al.*, 2006). Do có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin cao, sản phẩm astaxanthin tạo ra dễ hấp thu đối với vật nuôi, nhiều

loại vi khuẩn biển có tiềm năng trở thành đối tượng vi sinh vật tổng hợp astaxanthin tự nhiên để sử dụng trong việc bổ sung vào thức ăn cho các đối tượng thủy sản nuôi. Đặc biệt vi khuẩn đất *Paracoccus carotinifaciens* được phân lập tại Nhật Bản có khả năng tổng hợp astaxanthin (Tsubokura *et al.*, 1999), và đã có chế phẩm Panaferd-AX từ vi khuẩn này (<http://www.noe.jx-group.co.jp/english/products/astaxanthin/>). Thử nghiệm so sánh với nguồn astaxanthin hóa tổng hợp đã cho thấy nhiều ưu điểm như mức độ an toàn sinh học cao, khả năng

tạo màu đỏ vượt trội của chế phẩm astaxanthin từ chủng vi khuẩn *P. carotinifaciens* trên đối tượng thử nghiệm là cá hồi vân và cá tráp đỏ (Kurnia *et al.*, 2007, 2010, 2015).

Có sự khác biệt rất lớn về khả năng sinh tổng hợp astaxanthin giữa các chủng vi khuẩn, ví dụ như năng suất của *Brevibacterium* sp. chủng 103 chỉ từ 25 - 30 µg/g sinh khối khô trong khi đó chủng *Sphingomonas astaxanthinbreifaciens* tạo ra 2800 µg/g sinh khối khô (Bảng 1).

**Bảng 1.** Các vi khuẩn có khả năng tổng hợp astaxanthin.

Vi khuẩn	Lượng astaxanthin	Tài liệu tham khảo
<i>Brevibacterium</i> sp. chủng 103	25 - 30 µg/g sinh khối khô	lizuka, Nishimura, 1969
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	90 µg/g sinh khối khô	Yokoyama <i>et al.</i> , 1994
<i>Paracoccus</i> sp. chủng MBIC 01143	50 µg/g sinh khối khô	Misawa <i>et al.</i> , 1995
<i>Halobacterium salinarium</i>	265 µg/g sinh khối khô	Calo <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas</i> sp. SD-212	-	Yokoyama <i>et al.</i> , 1996
<i>Paracoccus marcusii</i>	200 µg/L	Harker <i>et al.</i> , 1998
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	-	Tsubokura <i>et al.</i> , 1999
<i>Paracoccus haeundaensis</i>	-	Lee <i>et al.</i> , 2004
<i>Sphingomonas astaxanthinbreifaciens</i>	2800 µg/g sinh khối khô	Asker <i>et al.</i> , 2007
<i>Paracoccus</i> sp. N1106	1012 µg/L	Choi <i>et al.</i> , 2009
<i>Paracoccus bogoriensis</i>	400 µg/g sinh khối khô	Osanzo <i>et al.</i> , 2009
<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	-	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Sphingomicrobium astaxanthinifaciens</i> TDMA-17T	40 µg/g sinh khối khô	Shahina <i>et al.</i> , 2013
<i>Paracoccus</i> NBRC 101723	1035 µg/g sinh khối khô	Chougle <i>et al.</i> , 2014
<i>Sphingomonas faeni</i>	-	Mageswari <i>et al.</i> , 2015
<i>Corynebacterium glutamicum</i> MB001	1600 mg/g sinh khối khô	Henke <i>et al.</i> , 2016

Ghi chú: - không xác định.

## NÂNG CAO SẢN XUẤT ASTAXANTHIN BẰNG KỸ THUẬT GEN

Gần đây, với sự phát triển của công nghệ sinh học, các nhà khoa học có thể tạo đột biến trực tiếp các chủng sinh tổng hợp astaxanthin đã có hoặc tách dòng và biểu hiện toàn bộ cụm gen liên quan đến con đường tổng hợp carotenoid trên các vật chủ khác như *Escherichia coli* và *Corynebacterium glutamicum* (Lee, Kim, 2006; Tao *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2009). Nhóm nghiên cứu của Tao *et al.*, (2006) đã tách dòng gen mã hóa cho enzym β-carotene ketolase (*crtW*) từ một chủng vi khuẩn sinh tổng hợp carotenoid và xây dựng thư viện đột biến gen này với mục tiêu sàng lọc được các thể đột

biến có khả năng chuyển hóa các dạng carotenoid khác thành astaxanthin. Kết quả nghiên cứu cho thấy đột biến kép R203W/F213L có khả năng chuyển hóa canthaxanthin thành astaxanthin cao nhất. Rick *et al.*, (2006) cũng xây dựng thư viện đột biến trên gen *crtW* (M99I, M99V, và L175M) làm tăng khả năng sản xuất astaxanthin. Nghiên cứu của Lee và Kim (2006) cho thấy, tách dòng cụm gen liên quan đến con đường tổng hợp carotenoid và tái tổ hợp vào tế bào *Escherichia coli* BL21(DE3) cho phép thu được 0,4 mg astaxanthin/g sinh khối khô. Lee *et al.*, (2006, 2008) không những tách dòng và biểu hiện nhóm gen tổng hợp carotenoid từ vi khuẩn *Paracoccus haeundaensis*, mà còn tách dòng và biểu hiện nhóm gen liên quan đến con đường tổng hợp isoprenoid. Kết quả biểu hiện trên *E. coli*

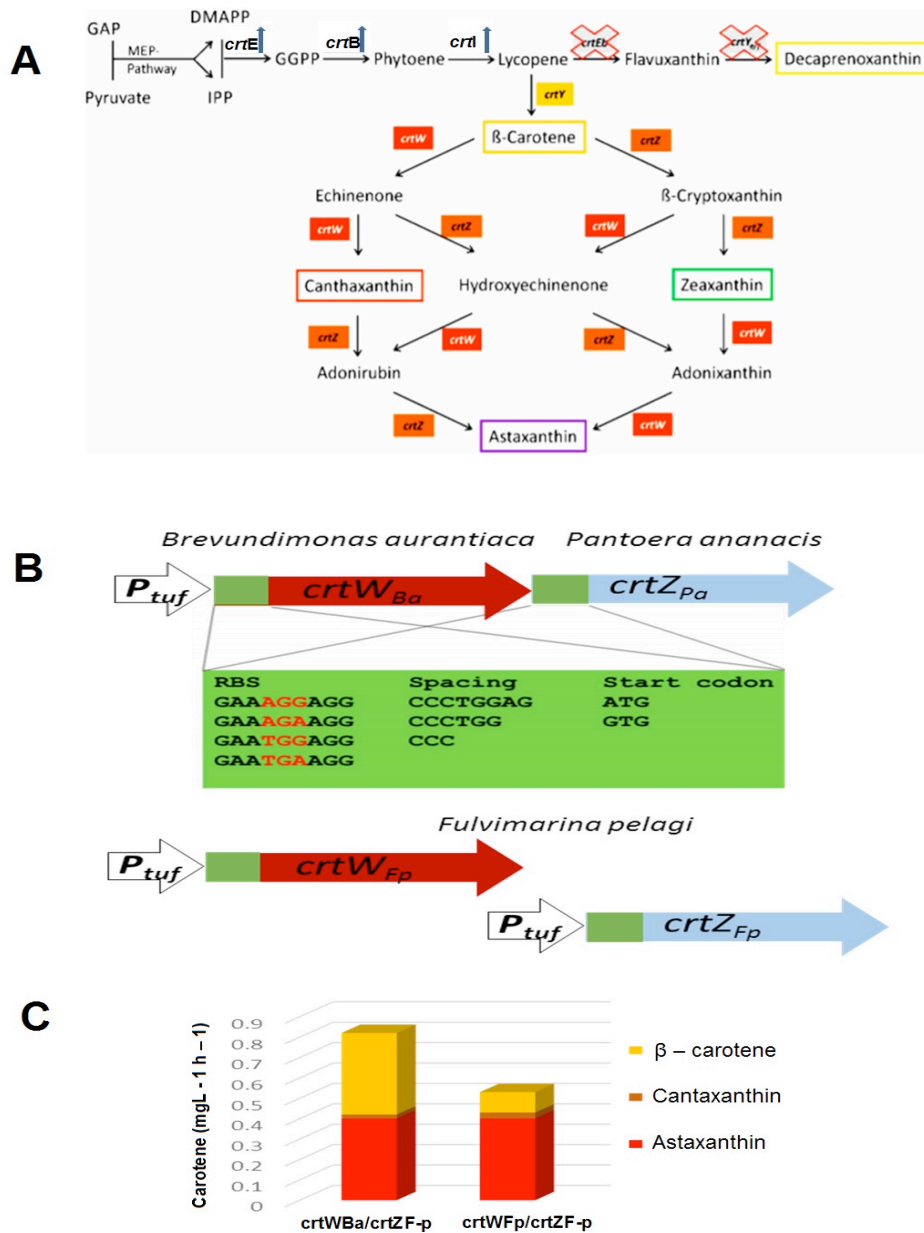
thu được lượng astaxanthin đạt 1,2 mg/g sinh khối khô, cao gấp 3 lần so với khi chỉ tái tổ hợp nhóm gen tổng hợp carotenoid (Bảng 2).

**Bảng 2.** Kỹ thuật chuyển gen từ vi khuẩn để cải thiện khả năng sản xuất astaxanthin.

Kỹ thuật	Mô tả	Nguồn vi khuẩn	Năng suất astaxanthin	Tài liệu tham khảo
Gen riêng lẻ	Tách dòng gen <i>crtW</i>	<i>Agrobacterium auratiacum</i>	60 ± 8,0 pmol/h/mg protein	Fraser <i>et al.</i> , 1997
Đột biến gen	Hai đột biến (R203W/F213L) trên <i>crtW</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. DC18	Lượng astaxanthin tạo ra cao hơn so với đối chứng	Tao <i>et al.</i> , 2006
	Đột biến L175M, M99V và M99I trên <i>crtW</i>	<i>Paracoccus</i> sp. strain N81106	Lượng astaxanthin tạo ra cao hơn so với đối chứng	Rick <i>et al.</i> , 2006
	Đột biến ngẫu nhiên	<i>Paracoccus</i> sp. strain N-81106	Lượng astaxanthin tạo ra gấp 17 lần so với đối chứng	Ide <i>et al.</i> , 2012
Kết hợp gen	<i>crtW148-crtZ</i>	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102- <i>Pantoea ananatis</i>	1,4 mg/g dcw	Lemuth <i>et al.</i> , 2011
	<i>crtY-crtW-crtZ</i>	<i>Pantoea ananatis</i> - <i>Brevundimonas aurantiaca</i> - <i>Pantoea ananatis</i>	0,4 mg/L/h	Henke <i>et al.</i> , 2016
		<i>Brevundimonas bacterioides</i>	<0,1 mg/g dcw	Henke <i>et al.</i> , 2016
		<i>Sphingomonas astaxanthinifaciens</i>	<0,1 mg/g dcw	Henke <i>et al.</i> , 2016
		<i>S. astaxanthinifaciens</i> - <i>Fluvimarina pelagi</i>	0,7 ± 0,3 mg/g dcw	Henke <i>et al.</i> , 2016
	<i>crtW-crtZ</i>	<i>B. bacterioides</i> - <i>F. Pelagi</i>	1,7 ± 0,3 mg/g dcw	Henke <i>et al.</i> , 2016
		<i>F. pelagi</i>	1,6 ± 0,3 mg/g dcw	Henke <i>et al.</i> , 2016
		<i>Methylomonas</i> sp. strain 16a	1 - 2,4 mg/g dcw	Rick <i>et al.</i> , 2006
	<i>crtW, crtZ, crtY, crtI, crtB, và crtE</i>	<i>Paracoccus haeundaensis</i>	0,4 mg/g dcw	Lee, Kim, 2006
	<i>crtW, crtZ, crtY, crtI, crtB, crtE-lytB, FPP, ispA, IPP, idi</i>	<i>Paracoccus haeundaensis</i> - <i>E.coli</i>	1,2 mg/g dcw	Lee <i>et al.</i> , 2008

Lemuth *et al.*, (2011) đã thành công sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp λ-red để chuyển các gen *crtEBIY*, *crtW148* (mã hóa cho β-carotene-ketolase) và *crtZ* (mã hóa cho β-carotene-hydroxylase) vào vi khuẩn *E. coli* BW-ASTA, kết quả biểu hiện gen cho sản phẩm astaxanthin mong muốn đạt tới 1,4 mg/g sinh khối khô. Nghiên cứu đột biến ngẫu nhiên trên chủng *Paracoccus* sp. N81106 bằng cách xử lý *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine tạo ra các chủng đột biến sinh astaxanthin cao gấp 17 lần so với chủng đại (Ide *et al.*, 2012). Gần đây, Ma *et al.*,

(2016) đã biểu hiện gen *idi* từ *E. coli* vào *Sphingomonas* sp. ATCC 55669 làm tăng sản lượng astaxanthin lên 5,4 lần. Henke *et al.*, (2016) đã dùng kỹ thuật chuyển gen vào đối tượng khác là *Corynebacterium glutamicum* (Hình 2). Nhóm tác giả đã chuyển thành công các gen *crtY* (mã hóa cho lycopene cyclase), *crtW* (mã hóa cho β-carotene ketolase) và *crtZ* (mã hóa cho β-carotene-hydroxylase) được tách từ các vi khuẩn khác nhau vào *C. glutamicum* BETA1. Sản phẩm astaxanthin đạt được với năng suất 0,4 mg/L/h.



**Hình 2.** Sinh tổng hợp astaxanthin bằng kĩ thuật chuyển gen vào *Corynebacterium glutamicum* (Henke *et al.*, 2016). **A:** Con đường chuyển hóa sinh tổng hợp carotenoid ở *C. glutamicum* tái tổ hợp. Sinh tổng hợp carotenoid có nguồn gốc từ các tiền chất dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) và isopentenyl pyrophosphate (IPP) được minh họa. Các gen được thể hiện bên cạnh các phản ứng được xúc tác bởi các enzyme mã hóa (*crtE*: Prenyl transferase, *crtB*: Phytoene synthase, *crtI*: Phytoene desaturase, *crtEb*: Lycopene elongase, *crtYe/f*: C45/50 carotenoid  $\epsilon$ -cyclase, *crtY*: Lycopene  $\beta$ -cyclase, *crtZ*:  $\beta$ -carotene hydroxylase (3,3'-beta-ionone hydroxylase), *crtW*:  $\beta$ -carotene ketolase (4,4'-beta-ionone ketolase). Các gen nội sinh được hiển thị trong hộp màu xám và biểu hiện vượt mức của chúng được chỉ bằng mũi tên màu xanh lá cây. Các gen ngoại lai được đánh dấu trong các hộp màu. **B:** Lắp ráp gen tổ hợp cho khởi đầu quá trình dịch mã đa dạng của gen *crtW* ( $\beta$ -carotene ketolase) và gen *crtZ* (hydroxylase). Gen *crtW* được tách từ *Brevundimonas aurantiaca* hoặc *Fulvimarina pelagi*; và gen *crtZ* được tách từ *Pantoea ananatis* hoặc *Fulvimarina pelagi*. Kết hợp chuỗi RBS khác nhau, codon mở đầu dịch mã (ATG/GTG) và khoảng cách giữa chúng (khoảng 3, 6 hoặc 8 bp) được đánh dấu trong hộp màu xanh lá cây  $P_{tuf}$ , promoter. **C:** Sản xuất astaxanthin, canthaxanthin và  $\beta$ -carotene bởi các chủng biểu hiện vượt mức bởi sự kết hợp khác nhau các gen *crtW* và *crtZ*. B.a.: *Brevundimonas aurantiaca*; F.p.: *Fulvimarina pelagi*.

## NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CHỨA ASTAXANTHIN TỪ VI KHUẨN *Paracoccus* sp. TRÊN THỂ GIỚI

Các chủng khác nhau thuộc loài *Paracoccus* sp. có thể khác nhau về hiệu suất tổng hợp astaxanthin, dẫn đến màu sắc khuẩn lạc thay đổi từ vàng đến cam đỏ. Chính vì vậy, các nhà nghiên cứu đã tìm các điều kiện nuôi cấy và lên men thích hợp để nâng cao hiệu suất tổng hợp astaxanthin của chủng vi khuẩn này. Các chủng *Paracoccus* sp. có thể phát triển trong một môi trường dinh dưỡng từ carbon, nitrogen và các chất vô cơ. Nó có thể tổng hợp được một sắc tố riêng biệt hoặc hỗn hợp các sắc tố.

Từ chủng vi khuẩn *Paracoccus carotinifaciens* có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin (Tsubokura *et al.*, 1999), nhóm nghiên cứu của công ty JX Nikko Niseki energy Co., Japan đã sản xuất được chế phẩm Panaferd-Ax từ sinh khối khô của vi khuẩn này. Chế phẩm Panaferd-Ax đã được Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu chứng nhận là an toàn, có thể sử dụng để bổ sung vào thức ăn cho cá hồi (Bories *et al.*, 2007). Chế phẩm này được sản xuất bằng phương pháp lên men truyền thống. Sau khi lên men, người ta nâng nhiệt độ trong nồi lên men lên 80°C để tiêu diệt các tế bào *P. carotinifaciens*. Hàm lượng astaxanthin đạt 20 - 21 g/kg. Sản phẩm được sấy phun ở 110 - 200°C. Chế phẩm bổ sung vào thức ăn cho cá ở nồng độ cao nhất là 3,68 g/kg, tương ứng với 85 mg astaxanthin trên kg. Chế phẩm bao gồm 50,4% protein thô, 33,6% các hợp chất không chứa nito bao gồm các carbohydrate và polyhydroxybutiric

acid từ môi trường lên men, 9,3% tro, 3,8% chất béo thô và độ ẩm chiếm 2,8%. Gần đây, Katsumata *et al.*, (2014) xác định nồng độ giới hạn của chế phẩm sinh khối loài *P. carotinifaciens* giàu astaxanthin lên chuột đạt ngưỡng an toàn dưới 1000 mg/kg/ngày.

### Tối ưu hóa điều kiện lên men trong điều kiện phòng thí nghiệm

Lee và Kim (2006) đã nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ C/N lên tăng trưởng của vi khuẩn biển *P. haeundaensis*, kết quả là với tỉ lệ C/N = 4,8 cho thấy vi khuẩn này tăng trưởng rất tốt, tuy nhiên có hàm lượng astaxanthin không cao, trong khi đó với tỉ lệ C/N = 6,2-7, vi khuẩn *P. haeundaensis* cho sinh khối chứa hàm lượng astaxanthin cao (2,4 mg). Nghiên cứu của Tsubokura *et al.*, (1999) đối với vi khuẩn *P. carotinifaciens* E-396<sup>T</sup> cho sinh khối giàu astaxanthin cao hơn hẳn, tuy với thời gian nuôi sinh khối để tổng hợp astaxanthin dài hơn (4 - 5 ngày) so với 3 ngày của vi khuẩn *P. haeundaensis*.

Chougale và Singhal (2012) cũng tối ưu hóa các thông số vật lý và thành phần môi trường cho chủng *Paracoccus* MBIC 01143 để sản xuất astaxanthin. Môi trường tối ưu hóa được bổ sung tricarboxylic acid để tăng cường phối trộn của các tiền chất, trong khi đó các cofactors của enzyme crt (ferrous sulphate, ascorbate, NADPH, ATP và 2-oxoglutarate) được thêm vào để kích thích hoạt tính của enzyme nhằm tăng khả năng tích lũy astaxanthin. Malate ở nồng độ 5 mM và ferrous sulphate nồng độ 1 mM tăng năng suất sản sinh astaxanthin từ 177 lên 3.750 µg/L.

**Bảng 3.** Thành phần môi trường và các thông số lên men trong quá trình tạo astaxanthin từ vi khuẩn.

Nhân tố	Thông số	Thành phần cụ thể
Nguồn carbon	0,5 - 3% 0,2 - 5%	Đường: Glucose, sucrose, Acid hữu cơ: acid acetic, acid fumaric, acid citric, acid propionic, acid malic, acid malonic, acid pyruvic. Chất cồn: ethanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol, glycerol. Dầu: dầu đậu nành, dầu ô liu, dầu ngô, dầu vừng, dầu cải
Nguồn nito	0,01 - 0,15% 0 - 80 g/L	Nitơ vô cơ: NaNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl, CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O, NH <sub>3</sub> -N. Nitơ hữu cơ: bột đậu tương, bột lạc, nấm men, glutamate
Muối vô cơ	0,001 - 0,01%	NaCl, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , KCl, NaHCO <sub>3</sub> , SrCl <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , NaF, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , FeCl <sub>3</sub> , MnCl <sub>2</sub> , MnSO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> , CuSO <sub>4</sub>
Vitamin	0,01 - 100 mg/L	Biotin, cyanocobalamin, riboflavin, pantothenic acid, pyridoxine, thiamine, ascorbic acid, folic acid, niacin, p-aminobenzoic acid, inositol, và choline
Nguồn đặc biệt khác	0,01 - 0,5%	Cao nấm men, peptone, triptone
pH	6,0 - 8,0	
Nhiệt độ	20 - 35 °C	
Chất chống ẩm	01 - 10 g/L	Chất chống ẩm gốc cồn, polyether, ester, acid béo
Thời gian	4 - 7 ngày	
Oxi hòa tan	2 - 8 ppm	
Tốc độ khuấy	200 rpm	



### Tối ưu hóa điều kiện lên men ở quy mô pilot

Hirasawa *et al.*, (2011) đã nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng lên sự tổng hợp astaxanthin (Bảng 3) và xác định điều kiện lên men tối ưu cho chủng vi khuẩn *P. carotinifaciens* E-396 như sau: môi trường khởi động gồm sucrose (20 g/L), dịch chiết ngô (5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,54 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2,78 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,7 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3 g/L), nhiệt độ 28 °C, tốc độ lắc 100 vòng/phút; môi trường lên men gồm glucose (40 g/L), dịch chiết ngô (30 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,25 g/L),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (5,7 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5 g/L), L-monosodium glutamate monohydrate (6 g/L), chất chống âm gốc cồn (0,5 g/L), D-biotin (1 mg/L), oxygen hòa tan (2 ppm), nhiệt độ 28 °C, tốc độ khuấy 200 rpm. Kết quả cho thấy hàm lượng astaxanthin thu được đã tăng từ 7,5 mg/L lên 39 mg/L.

## TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT ASTAXANTHIN VÀ TRIỂN VỌNG ỨNG DỤNG Ở VIỆT NAM

### Nghiên cứu sản xuất astaxanthin

Ở Việt Nam, chủ yếu là sử dụng các chế phẩm giàu astaxanthin thương mại như CAROPHYLL® Pink vào sản xuất thức ăn cho cá hồi và cá cảnh. Cho đến nay, rất ít các công trình nghiên cứu sản xuất astaxanthin từ nguồn thiên nhiên được nghiên cứu. Nghiên cứu của Tống Kim Thuần *et al.*, (2007) tạo sinh khối nấm men *Phaffia rhodozyma* nhằm tạo chế phẩm giàu astaxanthin bổ sung cho nuôi trồng thủy sản. Nhóm tác giả đã phân lập được hai chủng nấm men và đưa ra được quy trình tách chiết, xác định astaxanthin trong sinh khối nấm men bằng phương pháp quang học và sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và đưa ra hai quy trình sản xuất sinh khối nấm men giàu astaxanthin. Năm 2008 - 2012, Nguyễn Thị Hương *et al.*, đã tiến hành nghiên cứu tách chiết astaxanthin từ tảo *Haematococcus pluvialis* phân lập ở Việt Nam. Một nghiên cứu khác cũng được thực hiện năm 2010 - 2012 tại Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học nghiên cứu vòng đời của vi tảo *Haematococcus pluvialis* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Nhóm tác giả đã phân lập thành công hai chủng tảo *H. pluvialis* có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin với hàm lượng 4 - 6% sinh khối khô của tảo và đưa ra quy trình điều khiển quá trình sinh tổng hợp astaxanthin và quy trình chiết xuất astaxanthin. Tuy nhiên, những nghiên cứu trên cho thấy việc

chiết xuất astaxanthin từ tế bào tảo khá phức tạp, hiệu suất sử dụng của động vật còn thấp.

Ở Việt Nam nghiên cứu nào về vi khuẩn sản sinh astaxanthin còn chưa nhiều. Nguyễn Thị Vân Anh và nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên năm 2012 – 2015 đã "Nghiên cứu sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* từ gà và tôm để sản xuất probiotic có tính ưu việt cho chăn nuôi và thủy sản". Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được các chủng *Bacillus* có khả năng sản sinh astaxanthin sử dụng cho chăn nuôi. Do vậy, việc phân lập tuyển chọn được chủng vi khuẩn sản sinh astaxanthin, phát triển công nghệ sản xuất chế phẩm giàu astaxanthin và ứng dụng chế phẩm này trong chăn nuôi tại Việt Nam là rất cần thiết và cần được quan tâm nhiều hơn nữa.

### Bổ sung astaxanthin trong thức ăn nuôi cá cảnh

Astaxanthin có nguồn gốc từ tự nhiên hoặc hóa tổng hợp đã được nghiên cứu bổ sung vào thức ăn nuôi cá cảnh ở Việt Nam. Đặng Quang Hiếu *et al.*, (2010) đã nghiên cứu sử dụng chế phẩm chứa astaxanthin và tảo *Spirulina* bổ sung vào thức ăn cá đĩa (*Symphysodon* sp.). Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc bổ sung tảo *Spirulina* vào thức ăn nuôi cá đĩa (3-9 g/kg) có tác dụng làm tăng cường màu sắc cá (độ đậm - nhạt, màu vàng, màu xanh) với kết quả tốt nhất ở liều lượng 9 g/kg. Việc bổ sung chế phẩm astaxanthin vào thức ăn cá đĩa với lượng 1, 2 và 3 g/kg đều cho kết quả tăng màu sắc ở cá với cường độ màu sắc tốt nhất với liều 3 g/kg thức ăn. Tuy nhiên, tác giả của thí nghiệm này không nói rõ hàm lượng astaxanthin có trong chế phẩm. Nghiên cứu của Hồ Sơn Lâm *et al.*, (2016) trên cá khoang cổ Nemo cho thấy hàm lượng astaxanthin (hóa tổng hợp) càng cao (0 đến 200 mg/kg thức ăn) thì chỉ số màu sắc của cá càng tăng (2,12 đến 8,04) sau 8 tuần thí nghiệm.

### Bổ sung astaxanthin trong thức ăn nuôi tôm

Hiện nay trong nuôi vỗ tôm bố mẹ ở Việt Nam, các trại sản xuất tôm giống đang chủ yếu sử dụng thức ăn sống và chưa bổ sung astaxanthin vào thức ăn nuôi vỗ. Vì vậy, việc cập nhật và ứng dụng các những tiến bộ khoa học trong nghiên cứu bổ sung astaxanthin vào thức ăn nuôi vỗ để cải tiến thức ăn nuôi vỗ tôm bố mẹ ở Việt Nam là rất cần thiết, góp phần nâng cao tính bền vững, ổn định của nghề nuôi tôm. Nghiên cứu bổ sung chế phẩm giàu astaxanthin cần được tiến hành trên cả thức ăn viên ẩm và thức ăn sống để có sự lựa chọn trong áp dụng kết quả nghiên cứu sau này vào thực tiễn sản xuất rộng hơn. Hơn nữa, việc bổ sung astaxanthin vào thức ăn viên

âm có ưu điểm là kỹ thuật bổ sung thuật lợi hơn trong quá trình sản xuất thức ăn, đảm bảo độ chính xác cao và đỡ hao hụt hoạt chất hơn trong quá trình sử dụng.

**Sản xuất và sử dụng thức ăn bổ sung astaxanthin cho cá hồi**

Để chủ động nguồn thức ăn trong nước thay thế cho thức ăn nhập khẩu, một số công ty sản xuất thức ăn và Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1 đã thực hiện nghiên cứu và thử nghiệm sản xuất thức ăn cá hồi ở quy mô nhỏ. Kết quả nuôi thử nghiệm bằng thức ăn sản xuất trong nước cho tốc độ sinh trưởng nhanh, hệ số thức ăn thấp (FCR < 1,3). Tuy nhiên, mức độ ổn định trong duy trì màu đỏ hồng của cơ thịt còn chưa đạt yêu cầu như người nuôi mong muốn. Do vậy, tất cả những trang trại nuôi cá hồi vân tại Việt Nam vẫn phải sử dụng thức ăn nhập ngoại để nuôi cá hồi vân, ít nhất là 2 tháng trước khi thu hoạch để tăng màu sắc cho cá. Vấn đề tạo màu sắc cho cá hồi đang là vấn đề quan tâm của không chỉ các nhà sản xuất thức ăn trong nước mà còn là của người nuôi cá hồi vân tại Việt Nam.

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1 đã triển khai đề tài Nghiên cứu ứng dụng enzyme để sản xuất thức ăn nuôi cá hồi và cá tầm, sản phẩm thức ăn do đề tài sản xuất ra đã được người nuôi đánh giá là có hiệu quả cao trong tăng trưởng và phát triển của cá hồi (Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Tiên Hóa, 2013). Đề tài đã bổ sung astaxanthin vào trong thức ăn cho cá hồi vân bằng nguồn astaxanthin tổng hợp (Carophyl Pink 10%) với tỷ lệ 80 mg/kg thức ăn. Tuy nhiên hiệu quả về màu sắc chưa cao và chưa ổn định. Do đó, cần có những nghiên cứu tiếp theo tìm ra những chế phẩm tự nhiên bổ sung vào thức ăn cho cá hồi cũng như liều lượng và phương pháp bổ sung sẽ để góp phần thúc đẩy sản xuất thức ăn cho cá hồi tại các công ty trong nước cũng như nghề nuôi phát triển.

**KẾT LUẬN**

Astaxanthin đặc biệt là astaxanthin sinh tổng hợp bởi vi khuẩn có vai trò quan trọng trong việc nâng cao giá trị thương mại và khả năng sinh sản cũng như khả năng sống sót của các loài thủy sản như cá cảnh, cá hồi, tôm. Nghiên cứu các chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh astaxanthin và việc bổ sung astaxanthin vào thức ăn trong nuôi trồng thủy sản đã được nghiên cứu trên thế giới. Cho đến nay chế phẩm Panafed-AX từ vi khuẩn *Paracoccus*

*carotinifaciens* được cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu chứng nhận là an toàn đối với cá hồi. Tuy nhiên, nghiên cứu tìm ra chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin và bổ sung astaxanthin từ vi khuẩn vào thức ăn cho cá cảnh, cá hồi và tôm ở Việt Nam còn chưa nhiều. Vì vậy, trong tương lai có thể định hướng nghiên cứu chọn lọc môi trường cho vi khuẩn sinh tổng hợp astaxanthin cũng như cải thiện khả năng tạo astaxanthin của chủng bằng các kỹ thuật chuyển gen hay biến đổi gen liên quan đến con đường chuyển hóa astaxanthin và các nghiên cứu ứng dụng astaxanthin cho nuôi trồng thủy sản.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm giàu astaxanthin có nguồn gốc từ vi khuẩn *Paracoccus carotinifaciens* bổ sung vào thức ăn cá cảnh, cá hồi và tôm bố mẹ” thuộc Chương trình trọng điểm Phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Ando S, Amauchi H, Hatano M, Heard, WR (1992) Comparison of muscle compositions between red- and white-fleshed chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 103: 359–365.

Andrews AG, Phaff HJ, Starr MP (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003–1007.

Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG (2014) Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial application- a review. *Marine drugs* 12(1): 128–152.

Asker D, Beppu T, Ueda K (2007) *Sphingomonas astaxanthinifaciens* sp. nov., a novel astaxanthin-producing bacterium of the family *Sphingomonadaceae* isolated from Misasa, Tottori, Japan. *FEMS Microbiol Lett* 273(2): 140–148.

Bories G, Brantom P, de Barberà JB, Chesson A, Cocconcelli PS, Debski B, Dierick N, Franklin A, Gropp J, Halle I, Hogstrand C, de Knecht J, Leng L, Haldorsen AKL, Mantovani A, Mézes M, Nebbia C, Rambeck W, Rychen G, von Wright A, Wester P (2007) Safety and efficacy of Panafed-AX (red carotenoid-rich bacterium *Parracoccus carotinifaciens* as feed additive for salmon and trout. *EFSA J* 546: 1–30.

Bubrick P (1991) Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresour Technol* 38: 237–239.

Calo P, Miguel TD, Sieiro C, Velazquez JB, Villa TG (1995) Ketocarotenoids in halobacteria:

- 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin. *J Appl Bacteriol* 79(3): 282–285.
- Choi JI, Lee PC, Kim JH, Song BS, Yoon Y, Byun MW, Lee JW (2009) Medium optimization for the production of astaxanthin by *Paracoccus* sp. using response surface methodology. *J Biosci Bioeng* 108: S129.
- Chougle JA, Singhal RS (2012) Metabolic precursors and cofactors stimulate astaxanthin production in *Paracoccus* MBIC 01143. *Food Sci Biotechnol* 21(6): 1695–1700.
- Chougle JA, Singhal RS, Baik OD (2014) Recovery of astaxanthin from *Paracoccus* NBRC 101723 using ultrasound-assisted three phase partitioning (UA-TPP). *Sep Sci Technol* 49(6): 811–818.
- Davis BH (1985) Carotenoid metabolism in animals: A biochemist's view. *Pure Appl Chem* 57: 679–684.
- Đặng Quang Hiếu, Hà Lê Thị Lộc, Bùi Minh Tâm (2010) Ảnh hưởng của hàm lượng *Spirulina* và astaxanthin trong thức ăn đến tăng trưởng và màu sắc cá Đĩa (*Symphysodon* sp.) giai đoạn 20-50 ngày tuổi. *Tap chí khoa học Đại học Cần Thơ* 14b: 311–320.
- Fraser PD, Miura Y, Misawa N (1997) In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 272(10): 6128–6135.
- Goodwin TW (1984) *The biochemistry of carotenoids*. In 2<sup>nd</sup> ed., Chapman và Hall, London:64–96.
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M (2003) Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology* 21(5): 210–216.
- Gupta SK, Jha AK, Pal AK, Venkateshwarlu G (2007) Use of natural carotenoids for pigmentation in fishes. *Natural Product Radiance* 6(1): 46–49.
- Güroy B, Şahin İ, Mantoğlu S, Kayalı S (2012) *Spirulina* as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquac Int* 20(5): 869–878.
- Harker M, Hirschberg J, Oren A (1998) *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange gram-negative coccus. *Int J Syst Evol Microbiol* 48(2): 543–548.
- Henke NA, Heider SA, Peters-Wendisch P, Wendisch VF (2016) Production of the marine carotenoid astaxanthin by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Marine drugs* 14(7): 124.
- Hirasawa K, Satoh H, Yoneda H, Yata T, Azuma M (2011) Method for producing astaxanthin by fermentation. *US Patent Application* 13: 634–657.
- Hồ Sơn Lâm, Nguyễn Tường Vi, Phan Thị Ngọc (2016) Ảnh hưởng của astaxanthin bổ sung trong thức ăn lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và màu sắc da cá khoang cổ nemo (*Amphiprion ocellaris*) thương mại. *Tap chí Khoa học và Công nghệ Biển* 16 (3): 321–327.
- Ide T, Hoya M, Tanaka T, Harayama S (2012) Enhanced production of astaxanthin in *Paracoccus* sp. strain N-81106 by using random mutagenesis and genetic engineering. *Biochem Eng J* 65: 37–43.
- Iizuka H, Nishimura Y (1969) Microbiological studies on petroleum and natural Gas. *J Gen Appl Microb* 15(2): 127–134.
- Johnson EA (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol* 11: 297–326.
- Katsumata T, Ishibashi T, Kyle D (2014) A sub-chronic toxicity evaluation of a natural astaxanthin-rich carotenoid extract of *Paracoccus carotinifaciens* in rats. *Toxicol Rep* 1: 582–588.
- Kurnia A, Satoh S, Kuramoto D, Hanzawa S (2007) Effect of different astaxanthin sources on skin pigmentation of red sea bream (*Pagrus major*). *Aquacult Sci* 55(3): 441–447.
- Kurnia A, Satoh S, Hanzawa S (2010) Effect of *Paracoccus* sp. and their genetically modified on skin coloration of red sea bream. *HAYATI J Biosci* 17(2): 79–84.
- Kurnia A, Satoh S, Haga Y, Kudo H, Nakada M, Matsumura H, Watanabe Y, Adachi S (2015) Muscle coloration of rainbow trout with astaxanthin sources from marine bacteria and synthetic astaxanthin. *J Aquacult Res Develop* 6(5): 1.
- Lee JH, Kim YS, Choi TJ, Lee WJ, Kim YT (2004) *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1699–1672.
- Lee JH, Kim YT (2006) Functional expression of astaxanthin biosynthesis genes from a marine bacterium, *Paracoccus haeundaensis*. *Biotechnol Lett* 28: 1167–1173.
- Lee JH, Kim YS (2006) Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *Gene* 370: 86–95.
- Lee JH, Seo YB, Kim YT (2008) Enhanced production of astaxanthin by metabolic engineered isoprenoid pathway in *Escherichia coli*. *Kor J Life Sci* 18(12): 1764–1770.
- Lemuth K, Steuer K, Albermann C (2011) Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved in vivo biosynthesis of astaxanthin. *Microb Cell Fact* 10(1): 29.
- Ma T, Zhou Y, Li X, Zhu F, Cheng Y, Liu Y, Deng Z, Liu T (2016) Genome mining of astaxanthin biosynthetic genes from *Sphingomonas* sp. ATCC 55669 for heterologous overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol J* 11: 228–237.
- Mageswari A, Subramanian P, Srinivasan R, Karthikeyan

- S, Gothandam KM (2015) Astaxanthin from psychrotrophic *Sphingomonas faeni* exhibits antagonism against food-spoilage bacteria at low temperatures. *Microbiol Res* 179: 38–44.
- Marsden GE, McGuren JJ, Hansford SW, Burke MJ (1997) A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 149: 145–156.
- Matsuno T, Hirao S (1989) Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils. In Avàman ed. *Marine carotenoids*. CRC Press, Florida, 251–388.
- Matsumoto M, Iwama D, Arakaki A, Tanaka A, Tanaka T, Miyashita H, Matsunaga T (2011) *Altererythrobacter ishigakiensis* sp. nov., an astaxanthin-producing bacterium isolated from a marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(12): 2956–2961.
- Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwara S, Saito T, Ohtani T, Miki W (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* 177(22): 6575–6584.
- Nègre-Sadargues G, Castillo R, Petit H, Sancé S, Martinez RG, Milicua JC, Choubert G, Trilles JP (1993) Utilization of synthetic carotenoids by the prawn *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. *Aquaculture* 110: 151–159.
- Ni H, Chen QH, He GQ, Wu GB, Yang YF (2008) Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *J Zhejiang Univ Sci B* 9(1): 51–59.
- Niu J, Tian LX, Liu YJ, Yang HJ, Ye CX, Gao W, Mai KS (2009) Effect of dietary astaxanthin on growth, survival, and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquacult Soc* 40(6): 795–802.
- Niu J, Li CH, Liu YJ, Tian LX, Chen X, Huang Z, Lin HZ (2012) Dietary values of astaxanthin and canthaxanthin in *Penaeus monodon* in the presence and absence of cholesterol supplementation: effect on growth, nutrient digestibility and tissue carotenoid composition. *Br J Nutr* 108(01): 80–91.
- Ngô Thị Thanh Hương, Nguyễn Văn Tam (2014) Thực trạng xuất nhập khẩu cá cảnh ở Việt Nam. <http://www.vifep.com.vn/29/07/2014>.
- Nguyễn Thị Hương (2008 – 2012) Nghiên cứu tách chiết astaxanthin từ các chủng vi tảo *Haematococcus* phân lập ở Việt Nam. Báo cáo tổng kết đề tài. *Đại học Quốc gia Hà Nội*.
- Nguyễn Thị Trang, Nguyễn Tiến Hóa (2013) Ảnh hưởng của thức ăn có bổ sung astaxanthin và canthaxanthin với tỷ lệ khác nhau lên màu sắc thịt cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 11 (7): 981–986.
- Nguyễn Thị Vân Anh (2012 – 2015) Nghiên cứu sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* từ gà và tôm để sản xuất probiotic có tính ưu việt cho chăn nuôi và thủy sản. Báo cáo tổng kết đề tài. *Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*.
- Osanjo GO, Muthike EW, Tsuma L, Okoth MW, Bulimo WD, Luuml H, Abraham WR, Dion M, Timmis KN, Golyskin PN, Mulaa FJ (2009). A salt lake extremophile, *Paracoccus bogoriensis* sp. nov., efficiently produces xanthophyll carotenoids. *Afr J Microbiol Res* 3(8): 426–433.
- Paripatananont T, Tangtrongpaioj J, Sailasuta A, Chansue N (1999) Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish *Carassius auratus*. *J World Aquacult Soc* 30(4): 454–460.
- Paibulkichakul C, Piyatiratitivorakul S, Sorgeloos P, Menasveta P (2008) Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. *Aquaculture* 282(1): 83–89.
- Putnam M (1991) A review of the nature, function, variability and supply of pigments in salmonid fish. In: *Aquaculture and the environment*, de Pauw N and Joyce J, eds. *EAS Special Publication*, Gent, Belgium: 245–263
- Rick WY, Stead KJ, Yao H, He H (2006) Mutational and functional analysis of the  $\beta$ -carotene ketolase involved in the production of canthaxanthin and astaxanthin. *Appl Environ Microbiol* 72(9): 5829–5837.
- Sedgwick SD (1995) *Trout Farming Handbook*, 6th ed. Fishing News Books, Oxford, UK.
- Seo YB, Choi SS, Nam SW, Lee JH, Kim YT (2009) Cloning and characterization of the zeaxanthin glucosyltransferase gene (*crtX*) from the astaxanthin-producing marine bacterium, *Paracoccus haeundaensis*. *J Microbiol Biotechnol* 19(12): 1542–1546.
- Seyedi SM, Sharifpour I, Ramin M, Jamili S (2013) Effect of dietary astaxanthin on survival, growth, pigmentation clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Ind J Fund Appl Life Sci* 3(3): 391–395.
- Shahina M, Hameed A, Lin SY, Hsu YH, Liu YC, Cheng IC, Lee MR, Lai WA, Lee RJ, Young CC (2013) *Sphingomicrobium astaxanthinifaciens* sp. nov., an astaxanthin-producing glycolipid-rich bacterium isolated from surface seawater and emended description of the genus *Sphingomicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(9): 3415–3422.
- Storebakken T, No HK (1992) Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture* 100: 209–229.
- Takaichi S, Maoka T, Akimoto N, Khan ST, Harayama S (2006) Major carotenoid isolated from *Paracoccus schoinia* NBRC 100637<sup>T</sup> is adonixanthin diglucoside. *J Nat Prod* 69: 1823–1825.
- Tao L, Wilczek J, Odom JM, Cheng Q (2006) Engineering

- a  $\beta$ -carotene ketolase for astaxanthin production. *Metab Eng* 8(6): 523–531.
- Tan PS (2006) Skin colour changes in ornamental Koi (*Cyprinus carpio*) fed different dietary carotenoid sources. *Master Thesis*. University Sains Malaysia.
- Tangeras A, Slinde E (1994) Coloring of salmonids in aquaculture: The yeast *Phaffia rhodozyma* as a source of astaxanthin. In *Fisheries Processing* Martin AM, ed. Springer, US: 394–431.
- Torrissen OJ, Christiansen R, Struksnæs G, Estermann R (1995) Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquacult Nutr* 1: 77–84.
- Torrissen OJ, Christiansen R (1995) Requirements for carotenoids in fish diets. *J Appl Ichthyol* 11(3-4): 225–230.
- Tống Kim Thuần, Trần Thanh Thủy (2007) Xác định hàm lượng sắc tố astaxanthin trong tế bào của chủng nấm men *Phaffia rhodozyma* NT5 được sử dụng làm thức ăn bổ sung trong nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí Sinh học* 29(1): 82–88.
- Tsubokura A, Yoneda H, Mizuta H (1999) *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 49: 277–282.
- Wouters R, Lavens P, Julia N, Sorgeloos P (2001) Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture* 202: 1–21.
- Yamada S, Tanaka Y, Sameshima M, Ito Y (1990) Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I. Effect of dietary astaxanthin, beta-carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture* 87: 323–330.
- Yedier S, Gümüş E, Livengood EJ, Chapman FA (2014) The relationship between carotenoid type and skin color in the ornamental red zebra cichlid *Maylandia estherae*. *AACL Bioflux* 7: 207–216.
- Yokoyama A, Izumida H, Miki W (1994) Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1842–1844.
- Yokoyama A, Miki W, Izumida H, Shizuri Y (1996) New trihydroxy-keto-carotenoids isolated from an astaxanthin-producing marine bacterium. *Biosci Biotech Biochem* 60(2): 200–203.
- Zhang J, Liu YJ, Tian LX, Yang HJ, Liang GY, Yue YR, Xu DH (2013) Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Nutr* 19(6): 917–927.

## BACTERIAL ASTAXANTHIN: PRODUCTION AND APPLICATION IN AQUACULTURE - A REVIEW

Nguyen Thi Kim Lien<sup>1</sup>, Nguyen Ngoc Lan<sup>1</sup>, Nguyen Kim Thoa<sup>2</sup>, Nguyen Huy Hoang<sup>1</sup>, Nguyen Thi Dieu Phuong<sup>3</sup>, Nguyen Quang Huy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup>Research Institute for Aquaculture No. 1

### SUMMARY

Astaxanthin is red or pink pigment that found in crustaceans and marine animals. Astaxanthin plays an important role in enhancing the commercial value, the reproductivity and survivability of aquatic species. Due to crustaceans and marine animals are unable to self-synthesize astaxanthin, the demand for astaxanthin especially natural astaxanthin added to the food for aquaculture are increasing. Natural astaxanthin sources from algae, yeast and bacteria are being used in industrial production. However, astaxanthin from bacteria has the advantage of being easier to absorb than algae and yeast. Therefore, astaxanthin biosynthesis by bacteria are being very noticeable. Many bacterial strains are capable of producing astaxanthin such as *Paracoccus* spp., *Agrobacterium* spp., *Sphingomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Halobacterium* spp.... Among these, *Paracoccus carotinifaciens* is one of the most studied and used species in astaxanthin production. In this review, we summarize information about the role and situation using of astaxanthin in aquaculture. Especially, we focus on the astaxanthin from bacteria in aquaculture to improve color of aquatic species such as ornamental fish, rainbow trout, and shrimp in the world and Vietnam. Besides that, the progress to enhance astaxanthin production such as genetic engineering, gene mutations, as well as optimization of fermentation conditions are also discussed in this article. These are useful information for the development and application of astaxanthin from bacteria in aquaculture.

**Keywords:** *Aquaculture, Astaxanthin, astaxanthin producing bacteria, role and application*