

Khảo sát ảnh hưởng bã mật đường lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *Haematococcus pluvialis*

Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Lương Hiều Hòa, Huỳnh Trần Mỹ Hòa, Nguyễn Thanh Loan

Trung tâm Nghiên cứu VK Tech, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành
ntbngoc@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Tảo *Haematococcus pluvialis* là nguồn astaxanthin tự nhiên phong phú nhất hiện nay. Sự thay đổi về yếu tố dinh dưỡng và môi trường kích thích tảo tạo astaxanthin. Hiện nay, đã có rất nhiều nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát các yếu tố dinh dưỡng ảnh hưởng lên khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *Haematococcus* đã mang lại nhiều kết quả khả quan. Tuy nhiên, việc ứng dụng nguồn nitơ và cacbon xanh vào nuôi cấy tảo *Haematococcus* còn hạn chế, đặc biệt ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được thực hiện. Nghiên cứu này sử dụng bã mật đường – một loại chất rắn từ mật đường cô đặc làm môi trường cung cấp các chất dinh dưỡng sạch nuôi cấy tảo. Kết quả cho thấy, bã mật đường có ảnh hưởng lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *Haematococcus pluvialis*. Khi tăng dần nồng độ bã mật đường từ 0,01 % đến 0,2 %, lượng sinh khối có xu hướng tăng dần từ 150,497 mg/L đến 192,689 mg/L. Mật độ tế bào (cell) đạt cao nhất ở môi trường bã mật đường 0,2 % là $19,3 \times 10^4$ cell/mL với tốc độ tăng trưởng đặc hiệu 0,05 mg/L trong 1 ngày. Nồng độ astaxanthin tích lũy cao nhất là 3,1 % (so với sinh khối khô) khi nuôi cấy ở bã mật đường nồng độ thấp (0,01 %); nồng độ bã mật đường càng thấp, thời gian tích lũy astaxanthin càng nhanh.

Nhận 25/03/2022
Được duyệt 20/08/2022
Công bố 12/09/2022

Từ khóa
Haematococcus pluvialis, astaxanthin, bã mật đường, CMS

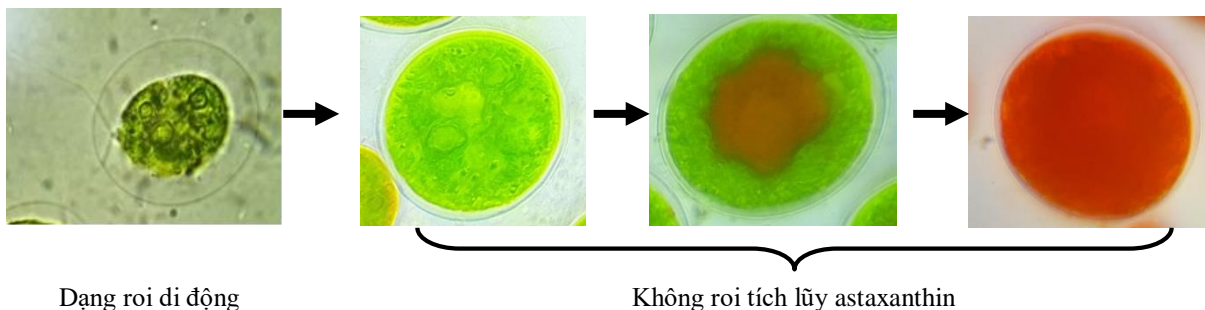
© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Tảo *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) là tảo lục đơn bào, chu kì tế bào được chia làm hai giai đoạn dựa trên hình thái và sinh lí tế bào: giai đoạn di động và giai đoạn không di động. Tế bào *H. pluvialis* trong giai đoạn di động có thành mỏng, hai roi và chủ yếu phát triển bằng cách tăng sinh tế bào. Ngược lại, tế bào của *H. pluvialis* trong giai đoạn không di động có vách dày, không roi và xảy ra quá trình tích tụ astaxanthin [1]. Astaxanthin [(3S,3'S)-3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-

4,4'-dione] là một xanthophyll ketocarotenoid có đặc tính chống oxi hóa mạnh hơn β -carotene và vitamin E, gần đây các ứng dụng của astaxanthin trong dược phẩm đã được nghiên cứu như bảo vệ chống lão hóa do sự oxi hóa của tia UV và viêm [2]. Do đặc tính chống ung thư, chất carotenoid này cũng tìm thấy ứng dụng để tăng cường phản ứng miễn dịch và cải thiện tổn thương mô, ngoài tác dụng điều trị các bệnh tim mạch, tiểu đường, viêm loét dạ dày và tăng huyết áp [3].





Hình 1 Tế bào tảo *H. pluvialis*

Tảo *H. pluvialis* là nguồn astaxanthin tự nhiên dồi dào. Hàm lượng astaxanthin được tích lũy từ (0,5-4) % trên trọng lượng khô của *H. pluvialis* [4] cao hơn rất nhiều so với một số loại vi tảo lục khác như: *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Chorella zofingiensis* và *Scenedesmus vacuolatus* (0,27 % đến 1,92 % trọng lượng khô) [5]. Hàm lượng astaxanthin được tạo ra phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy. Hầu hết tế bào vi tảo đều duy trì ở trạng thái sinh dưỡng, tích lũy rất ít hoặc không tích lũy astaxanthin khi nuôi ở điều kiện thích hợp. Tuy nhiên, dưới điều kiện bắt buộc, tế bào chuyển sang dạng bào nang không chuyển động và khi được kích thích phù hợp tế bào tảo có thể tích lũy một lượng lớn astaxanthin. Vì vậy, điều kiện cho tế bào sinh trưởng và tổng hợp astaxanthin là rất khác nhau. Việc xác định rõ ràng pha sinh trưởng tế bào và pha tổng hợp astaxanthin là cần thiết để đạt được mật độ tế bào và hàm lượng astaxanthin cao. Trong đó yếu tố về dinh dưỡng môi trường rất quan trọng. Sự thiếu hụt nitơ ảnh hưởng đến quá trình tạo astaxanthin [6], tuy nhiên khi bổ sung lượng nitơ cao gấp 4 lần môi trường nuôi cấy cơ bản Rudic's medium (RM) thì mật độ tế bào tảo đạt cao nhất. Ngoài ra, phospho hoặc dư thừa acetate hoặc bổ sung các tiền chất carotenoid khác nhau đã được chứng minh có ảnh hưởng đến quá trình tạo astaxanthin [6,7].

Hiện nay, ngành công nghiệp sản xuất cồn của Việt Nam khá phát triển do có nguồn nguyên liệu phong phú và dồi dào. Bã mật đường (molasses residue) – phế liệu còn sau quá trình lên men mật mía để sản xuất ethanol là một loại chất rắn từ mật đường cô đặc (Condensed Molasses Solubles – CMS). CMS được coi là thuộc loại nước thải ô nhiễm nặng, hàm lượng hữu cơ rất cao (ở dạng đậm đặc nước thải có COD – Chemical Oxygen Demand) (từ 50 000 mg/L đến 100 000 mg/L), pH giá

trị rất thấp (từ 4,2 đến 4,5), ngoài ra nhiệt độ cũng khá cao (75-85) °C; và trong 1 tấn bã mật đường sẽ thải ra 3 m³ CMS. Do đó, việc giảm thiểu nồng độ ô nhiễm đạt tiêu chuẩn rất khó khăn, đòi hỏi phải kết hợp nhiều phương pháp và qui định pháp luật.

Nghiên cứu này sử dụng CMS để nuôi cấy tảo *H. pluvialis* nhằm sử dụng đường cũng như protein và khoáng chất trong CMS là nguồn dinh dưỡng thay thế cho tảo sinh trưởng, tích lũy astaxanthin; từ đó xây dựng một quy trình nuôi cấy tiết kiệm và hiệu quả vừa giải quyết vấn đề về xử lý nước thải vừa có thêm nguồn thức ăn cung cấp cho thủy sản hoặc phân bón cho nông nghiệp.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Tảo *H. pluvialis* UTEX2505 được lấy từ Đại học Joongbu Hàn Quốc và được nuôi cấy tại Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành. Tảo được nuôi cấy trong môi trường tối ưu nuôi cấy tảo *H. pluvialis* (Optimal Haematococcus medium – OHM) với pH = 6,5 (Bảng 1), dưới điều kiện ánh sáng trắng cường độ 1 800 lux chiếu sáng và sục khí oxi liên tục (lưu lượng 5 L/min) ở nhiệt độ (25 ± 2) °C.

Bảng 1 Thành phần môi trường OHM [8]

STT	Hóa chất	Nồng độ
1	KNO ₃	0,41 g/L
2	NaHPO ₄	0,03 g/L
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,246 g/L
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,11 g/L
5	Fe(III)citrat.H ₂ O	2,62 mg/L
6	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,11 mg/L
7	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,012 mg/L
8	Cr ₂ O ₃	0,075 mg/L
9	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,98 mg/L

10	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,12 mg/L
11	SeO ₂	0,005 mg/L
12	Thiamin	25 µg/L
13	Biotin	17,5 µg/L
14	Vitamin B ₁₂	15 µg/L

Trong nghiên cứu này sử dụng CMS đã được xử lý của Công ty Huy Việt Tây Đô dưới dạng chất lỏng sệt. Thành phần của CMS đã được kiểm nghiệm bởi Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm (CASE) (Bảng 2).

Bảng 2 Thành phần của CMS

STT	Chỉ tiêu kiểm nghiệm	Đơn vị tính	Kết quả
1	As	mg/kg	0,18
2	B	mg/kg	3,01
3	Ca	mg/kg	14 300
4	Cd	mg/kg	Không phát hiện (MDL = 0,1)
5	Cu	mg/kg	2,06
6	Fe	mg/kg	1 000
7	Hg	mg/kg	Không phát hiện (MDL = 0,01)
8	K ₂ O	mg/kg	64 094
9	Mg	mg/kg	8 462
10	Mn	mg/kg	126
11	P ₂ O ₅	mg/kg	1 696
12	Pb	mg/kg	Không phát hiện (MDL = 1)
13	Zn	mg/kg	14,5
14	N	%	1,66
15	Chất hữu cơ	%	53,6
16	4-Hydroxyproline	g/100 g	Không phát hiện (MDL = 0,01)
17	Acid amin	g/100 g	2,69

2.2 Thiết kế thí nghiệm

H. pluvialis đạt giai đoạn tăng trưởng sau khoảng 15 ngày nuôi cấy trên môi trường OHM đạt mật độ từ 10⁵ thì được sử dụng để bố trí thí nghiệm. Thí nghiệm sử dụng bã mật đường (đã được trộn đều từ 3 mẻ lấy bất kỳ) pha loãng với nồng độ (0,01; 0,05, 0,1 và 0,2) %, điều chỉnh pH = 6,5 làm môi trường nuôi cấy và mẫu đối chứng nuôi trong môi trường OHM. Lấy 50 mL dịch tảo giống cho vào túi ép (có thể tích 1 000 mL) sau đó bổ sung dịch nuôi vừa đủ 500 mL để mật độ tế bào ban đầu 1 × 10⁵ cell/mL. Tảo được nuôi cấy dưới ánh sáng trắng với cường độ chiếu sáng 1 800 lux với

chu kỳ sáng/tối là 12 giờ/12 giờ). Đánh giá các nghiệm thức qua các chỉ tiêu về hình thái, trọng lượng khô và tốc độ tăng trưởng đặc hiệu. Quan sát tế bào bắt đầu chuyển sang màu đỏ tiến hành định lượng astaxanthin.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

- Quan sát hình thái tế bào *H. pluvialis*: hình thái tế bào *H. pluvialis* được quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100x sau các ngày nuôi cấy.
- Xác định trọng lượng khô của *H. Pluvialis*: lấy 10 mL dịch nuôi cấy tảo lọc qua màng lọc, với đường kính màng là 47 mm, đường kính lỗ 20 µm. Sau đó rửa tảo với 20 mL nước cất rồi hấp vô trùng, và sấy khô ở 103 °C liên tục 6 giờ hoặc cho đến khi trọng lượng khô không đổi (g).
- Xác định mật độ tế bào tảo: sử dụng buồng đếm hồng cầu, thêm 10 µL dung dịch tảo vào mỗi buồng đếm. Đếm 5 ô lớn. Mật độ tế bào được tính theo công thức: $N = 0,25a \times 10^6$ cell/mL, a: là số cell (tế bào) trung bình đếm được.
- Xác định tốc độ tăng trưởng đặc hiệu: trọng lượng khô tế bào ở hai thời điểm khác nhau trong quá trình tăng trưởng của mẫu tảo được dùng để tính tốc độ tăng trưởng đặc hiệu (μ : g/L trong 1 ngày) trong khoảng thời gian đó theo công thức:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{m_2}{m_1}\right)}{(t_2 - t_1)}$$

Trong đó: m₁, m₂: trọng lượng khô tại thời điểm 1 và 2
t₁, t₂: thời điểm 1 và 2

- Định lượng astaxanthin
 - Hóa chất: astaxanthin from *Blakeslea trispora* (nhà cung cấp Sigma), MeOH (Sigma), acetone (Sigma), enzyme Cholesterol esterase from *Pseudomonas sp.* (Sigma).
 - Quy trình định lượng: hệ thống HPLC Agilent 1260 Mĩ, pha tĩnh: cột sắc kí pha đảo Phenomenex Gemini NX-C18 (4,6 mm x 150 mm; 5 µm), pha động: chương trình isocratic với dung môi pha động MeOH, thể tích tiêm: 10 µL, tốc độ dòng: 0,5 mL/min, đầu dò DAD bước sóng phát hiện: 465 nm.
 - Xây dựng đường chuẩn astaxanthin: astaxanthin được pha trong acetone với các nồng độ (2,5; 5; 10; 20 và 25) ppm và được khai triển trên hệ thống HPLC.
 - Tách chiết astaxanthin: cân 10 mg cho thêm 1 mL HCl 4M, ủ 70 °C trong 5 phút. Tiến hành li tâm dịch 6 000 vòng trong 5 phút, bỏ dịch. Rửa lại cặn với nước

cất rồi hấp vô trùng 2 lần, li tâm lấy cặn. Nghiền to cặn, cho 1 mL aceton và trộn đều; rung siêu âm 20 phút ở nhiệt độ lạnh. Sau đó tiến hành li tâm thu dịch chiết và cho phản ứng với enzyme cholesterol esterase. Dung dịch chiết sau khi phản ứng được định lượng bằng phương pháp HPLC.

- Xử lý số liệu

– Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft Excel 2013 và phân tích ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với sai số ý nghĩa $p < 0,05$. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: trung bình (mean) \pm sai số chuẩn (SE).

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Hình thái tế bào tảo *H. pluvialis*

Kết quả khảo sát cho thấy, nồng độ CMS trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ ràng đến hình thái, màu sắc và mật độ tế bào tảo. Khi nuôi cấy với CMS, màu sắc dịch tế bào đậm hơn so với mẫu đối chứng được nuôi trong môi trường OHM điều này có thể giải thích do trong môi trường CMS hàm lượng các chất dinh dưỡng thấp vô tình tạo ra điều kiện khắc nghiệt ức chế tế bào làm rụng các roi, tăng kích thước tế bào và biến đổi thành tế bào hình trứng có vách dày bắt đầu tích lũy các caroten thứ cấp [9]. Ở nồng độ CMS 0,01 % màu sắc tế bào tảo hầu hết đã chuyển sang màu đỏ và kích thước tế bào lớn sau 3 ngày nuôi cấy. Các điều kiện CMS (0,05 và 0,1) % tế bào dần chuyển sang màu đỏ sau 6 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, tế bào tảo duy trì màu xanh cho đến ngày nuôi cấy thứ 18 và bắt đầu chuyển dần sang màu đỏ khi nuôi cấy trong môi trường CMS 0,2 % và OHM (Hình 2).

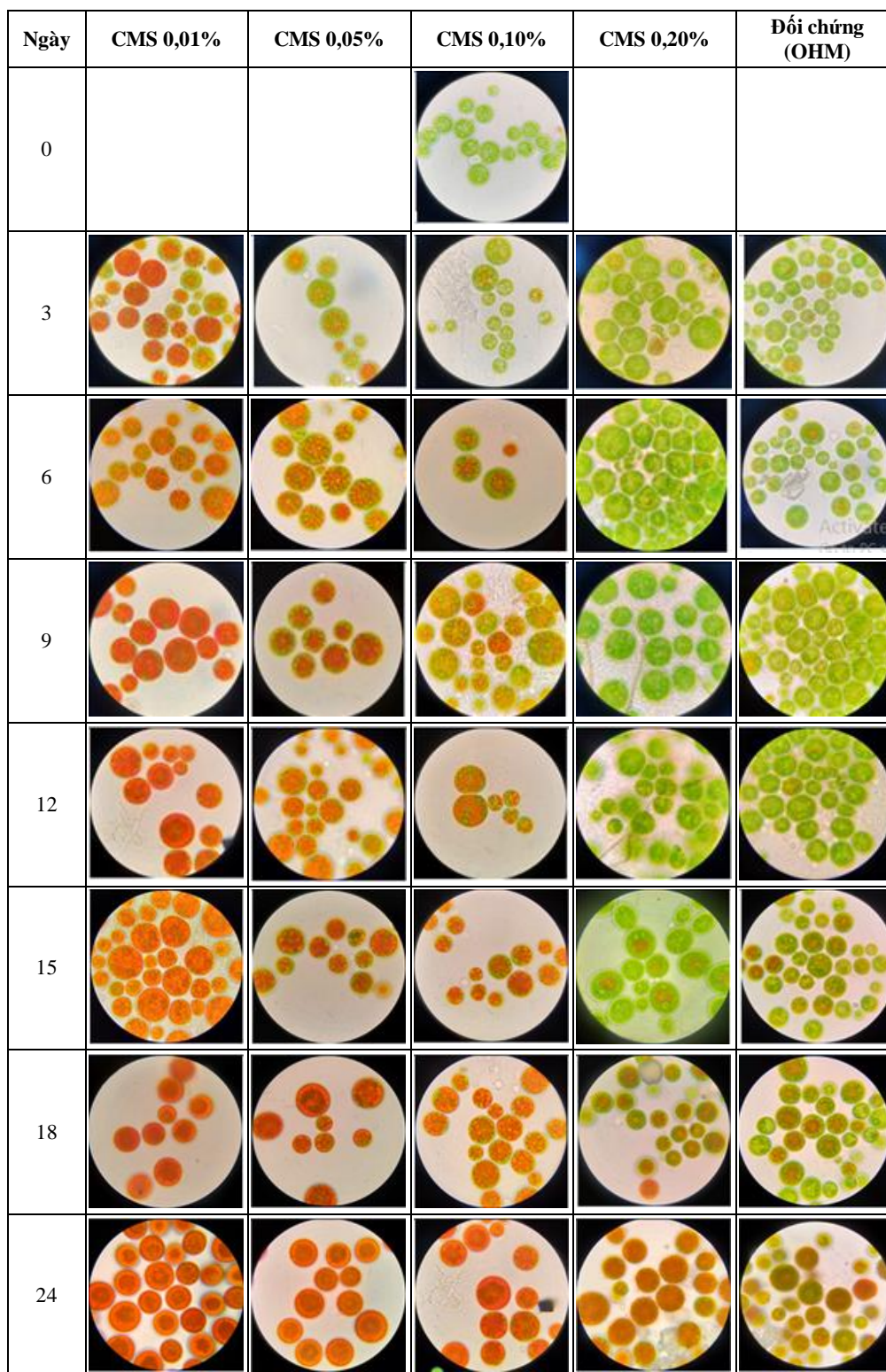
Màu sắc dịch nuôi cấy cũng có sự khác biệt rõ ràng, ở điều kiện môi trường OHM và CMS 0,2 % màu sắc dung dịch đậm hơn so với ban đầu. Ở các điều kiện CMS 0,05 % và 0,1 %, màu sắc dung dịch nuôi cấy không có sự thay đổi khác biệt, tuy nhiên ở điều kiện

0,01 % màu sắc dịch nuôi cấy chuyển sang màu đỏ chỉ sau 5 ngày nuôi cấy. Nghiên cứu của Mark Harker và các cộng sự [6] đã chỉ ra rằng, yếu tố dinh dưỡng và vật lý có ảnh hưởng đến khả năng tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*. Trong đó, yếu tố về dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy là một trong những yếu tố rất quan trọng. Sự thiếu hụt nitơ có tác động đến quá trình tạo astaxanthin, trong điều kiện CMS 0,01 % hàm lượng dinh dưỡng thấp làm sự sinh trưởng của tảo bị ức chế dẫn đến việc thay đổi màu sắc của tế bào trong một thời gian ngắn. Ngược lại, trong môi trường giàu dinh dưỡng như OHM và ở các nồng độ CMS cao hơn, nhiều dinh dưỡng hơn kích thích tảo tăng trưởng cho đến khi hàm lượng các chất dinh dưỡng trong dung dịch nuôi cấy bị cạn kiệt, tế bào dần chuyển sang màu đỏ.

3.2 Sự tăng trưởng của tảo *H. pluvialis*

Kết quả thí nghiệm cho thấy, tảo *H. pluvialis* có thể sinh trưởng được trong môi trường có CMS, tuy nhiên do hàm lượng chất khoáng khá thấp, dẫn đến sự tăng trưởng của tảo thấp hơn nhiều so với mẫu đối chứng nuôi trong môi trường OHM.

Nồng độ CMS có ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của quần thể tảo *H. pluvialis*. Khi tăng dần nồng độ CMS mật độ tế bào và trọng lượng khô tăng theo tỉ lệ thuận. Sau 12 ngày nuôi cấy ở nồng độ CMS 0,2 % tảo cho mật độ cao nhất là $19,3 \times 10^4$ cell/mL với trọng lượng khô là 192,689 mg/L. Kết quả này thấp hơn mẫu đối chứng khi nuôi cấy trong môi trường OHM có thể giải thích do trong điều kiện CMS hàm lượng các chất khoáng thấp không cung cấp đủ chất dinh dưỡng để tảo sinh trưởng và tăng sinh số lượng tế bào. Thực nghiệm cho thấy, thời gian của giai đoạn tăng trưởng tỉ lệ thuận với nồng độ CMS. Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu khi nuôi cấy ở điều kiện CMS 0,1 % là 0,06 mg/L trong 1 ngày, cao hơn không đáng kể so với các điều kiện còn lại và thấp hơn 2 lần so với mẫu đối chứng (Hình 3, Bảng 3 và Bảng 4).



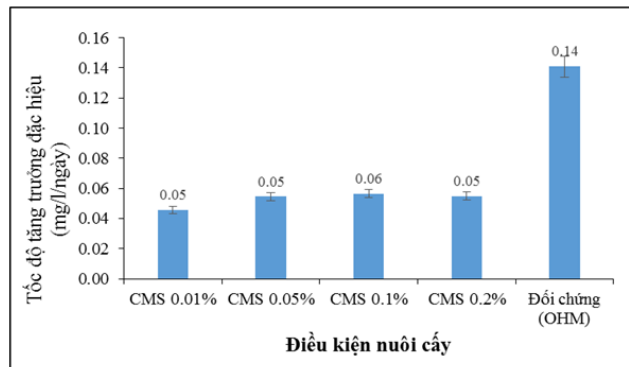
Hình 2 Hình thái tế bào tảo *H. Pluvialis*, 100x

Trong thành phần của CMS có chứa các chất dinh dưỡng (nitơ, phospho) và các vi lượng sắt (Fe) và bo

(B) là những yếu tố cần thiết cho sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis*, do đó tảo vẫn có thể sinh trưởng trong

môi trường CMS mặc dù môi trường này khá nghèo nàn về mặt dinh dưỡng. Theo nghiên cứu của Bahareh Nahidian và các cộng sự đã cho thấy, N và P rất cần thiết cho quá trình phân chia tế bào do là hai yếu tố quan trọng cho sự tổng hợp thành tế bào. Khi giảm nồng độ N xuống 50 % so với lượng N ban đầu trong môi trường BBM, không ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của tế bào; nhưng khi tăng nồng độ N lên gấp 2 đến 3 lần làm tăng tỉ lệ tăng trưởng của tảo lần lượt (86 và 14) % [10]. Trong thí nghiệm này, khi sử dụng CMS để nuôi cây mật độ tế bào cũng như khối lượng sinh khối khô của tảo không ảnh hưởng đáng kể, mặc dù nồng độ N và P rất thấp. Mặt khác, tảo *H. pluvialis* được nuôi cấy trong môi trường giàu dinh dưỡng OHM có mật độ tế bào tăng liên tục và cao hơn rất nhiều so với môi trường CMS. Tốc độ tăng trưởng của tảo *H. pluvialis* tăng khi tăng nồng độ Fe³⁺ có thể do sắt là xúc

tác oxi hóa khử trong hệ thống quang hợp tảo và do đó là sự đồng hóa phân tử NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - là coenzyme điển hình được sử dụng cho các phản ứng khử của quá trình đồng hóa) cao [10]. Kết quả thực nghiệm của đề tài có xu hướng giống với nghiên cứu của Bahareh Nahidian [10].



Hình 3 Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của tảo

Bảng 3 Mật độ tế bào tảo *H. pluvialis* trong các điều kiện nuôi cấy

Mật độ tế bào của <i>H. Pluvialis</i> ($\times 10^4$ cell/mL)	Nồng độ CMS (%)				
	0,01	0,05	0,1	0,2	OHM
Ngày thứ 0	10,33 \pm 0,333 ^{1a}	9,67 \pm 0,667 ^{1a}	10,0 \pm 0,333 ^{1a}	10,0 \pm 0,333 ^{1a}	10,0 \pm 0,333 ^{1a}
- 3	13,4 \pm 0,233 ^{1b}	14,5 \pm 0,289 ^{12bc}	15,0 \pm 0,577 ^{2bc}	14,8 \pm 0,219 ^{12b}	26,3 \pm 0,208 ^{3b}
- 6	14,2 \pm 0,196 ^{1c}	15,7 \pm 0,338 ^{1cd}	16,6 \pm 0,088^{2c}	17,8 \pm 0,145 ^{3c}	41,0 \pm 0,033 ^{4c}
- 9	15,1 \pm 0,173^{12d}	16,3 \pm 0,441^{2d}	15,1 \pm 0,067 ^{1bc}	18,7 \pm 0,441 ^{3cd}	72,7 \pm 0,057 ^{4d}
- 12	14,7 \pm 0,333 ^{2d}	14,8 \pm 0,167 ^{1bc}	15,4 \pm 0,348 ^{12bc}	19,3 \pm 0,333^{3e}	71,5 \pm 0,058 ^{4e}
- 15	14,0 \pm 0,192 ^{1c}	14,7 \pm 0,117 ^{1bc}	15,0 \pm 0,130 ^{1bc}	19,0 \pm 0,033 ^{2de}	111,0 \pm 0,161 ^{3ed}
- 18	13,4 \pm 0,058 ^{1b}	14,6 \pm 0,306 ^{2bc}	15,2 \pm 0,115 ^{2bc}	18,6 \pm 0,306 ^{3cd}	150,0 \pm 0,289^{4ed}
- 21	13,2 \pm 0,176 ^{1b}	14,1 \pm 0,088 ^{1b}	14,0 \pm 0,577 ^{1b}	18,0 \pm 0,577 ^{2cd}	13,4 \pm 0,306 ^{3ed}
- 24	13,2 \pm 0,231 ^{1b}	14,9 \pm 0,208 ^{1bc}	13,7 \pm 0,882 ^{1b}	18,4 \pm 0,306 ^{2cd}	128,7 \pm 0,033 ^{3ed}

Các số trung bình trong hàng với các mẫu tự số khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$
 Các số trung bình trong cột với các mẫu tự chữ khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$

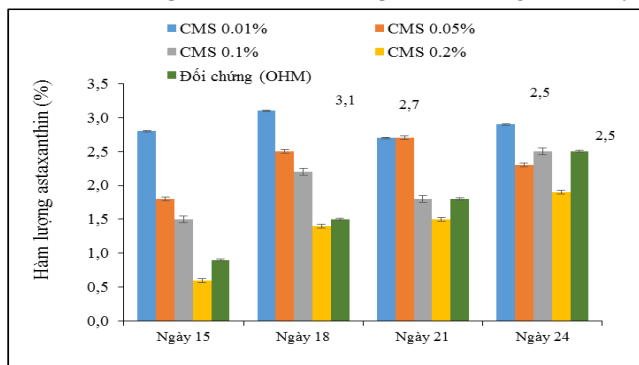
Bảng 4 Khối lượng sinh khối khô của *H. pluvialis* ở các điều kiện nuôi cấy

Khối lượng sinh khối khô (mg/L) của <i>H. pluvialis</i>	Nồng độ CMS (%)				
	0,01	0,05	0,1	0,2	OHM
Ngày thứ 0	99,667 \pm 0,333 ^{1a}	99,667 \pm 0,333 ^{1a}	99,667 \pm 0,333 ^{1a}	99,667 \pm 0,333 ^{1a}	99,667 \pm 0,333 ^{1a}
- 3	133,221 \pm 2,877 ^{1b}	144,517 \pm 5,754 ^{12bc}	149,500 \pm 2,179 ^{2bc}	147,174 \pm 2,075 ^{12b}	262,123 \pm 1,958 ^{3b}
- 6	141,859 \pm 0,879 ^{1c}	156,144 \pm 1,448 ^{1cd}	165,779 \pm 0,332^{2c}	177,074 \pm 0,575 ^{3c}	408,966 \pm 4,395 ^{4c}
- 9	150,497 \pm 4,395^{12d}	162,789 \pm 0,575^{2d}	150,164 \pm 0,332 ^{1bc}	186,044 \pm 1,661 ^{3cd}	1 127,064 \pm 3,469 ^{4d}
- 12	146,178 \pm 0,332 ^{2d}	147,839 \pm 1,661 ^{1bc}	153,819 \pm 3,469 ^{12bc}	192,689 \pm 3,322^{3e}	1 282,378 \pm 0,575 ^{4e}
- 15	139,866 \pm 0,439 ^{1c}	146,676 \pm 1,163 ^{1bc}	149,666 \pm 1,297 ^{1bc}	189,034 \pm 0,332 ^{2de}	1 249,156 \pm 1,602 ^{3ed}
- 18	133,553 \pm 0,575 ^{1b}	145,513 \pm 3,045 ^{2bc}	151,493 \pm 1,151 ^{2bc}	185,380 \pm 3,045 ^{3cd}	1 259,122 \pm 2,877^{4ed}
- 21	131,228 \pm 1,758 ^{1b}	140,862 \pm 0,879 ^{1b}	139,533 \pm 5,754 ^{1b}	179,400 \pm 5,754 ^{2cd}	1 249,156 \pm 3,045 ^{3ed}
- 24	131,560 \pm 2,302 ^{1b}	148,503 \pm 2,075 ^{1bc}	136,211 \pm 8,790 ^{1b}	183,387 \pm 3,045 ^{2cd}	1 252,478 \pm 3,322 ^{3ed}

Các số trung bình trong hàng với các mẫu tự số khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$
 Các số trung bình trong cột với các mẫu tự chữ khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$

3.3 Hàm lượng astaxanthin

Hàm lượng astaxanthin trong tảo *H. pluvialis* bị ảnh hưởng bởi các môi trường có nồng độ CMS khác nhau. Hàm lượng astaxanthin được tích lũy ở điều kiện CMS 0,01 % là 3,1 % (so với trọng lượng sinh khối khô) cao hơn khi nuôi cấy ở các điều kiện nuôi cấy có nồng độ CMS cao hơn (0,05; 0,1 và 0,2) %. Bên cạnh đó, thời gian tế bào tảo bắt đầu bị ức chế để tạo astaxanthin tỉ lệ thuận với nồng độ CMS có trong môi trường nuôi cấy.



Hình 4 Hàm lượng astaxanthin được tích lũy ở các điều kiện nuôi cấy

Cụ thể, sau 15 ngày nuôi cấy ở điều kiện CMS 0,2 % tảo mới bắt đầu đổi màu và tích lũy dần astaxanthin, trong khi đó ở các điều kiện CMS có nồng độ thấp hơn (0,1; 0,05 và 0,01) % có thời gian chuyển pha tích lũy astaxanthin ngắn hơn; đặc biệt là nồng độ CMS 0,01 % chỉ sau 3 ngày nuôi cấy tế bào dần chuyển sang đỏ và tích lũy astaxanthin (Hình 4).

Khi tiếp xúc với điều kiện môi trường khắc nghiệt, *H. pluvialis* sẽ tích lũy một lượng lớn astaxanthin. Trong điều kiện tăng trưởng tối ưu tế bào sinh dưỡng của tảo vẫn tồn tại và chứa các carotenoid thường được tìm thấy trong lục lạp như là β -carotene, lutein, violaxanthin, neoxanthin và zeaxanthin (thường được gọi chung là carotenoid sơ cấp). Tuy nhiên, khi tảo tiếp xúc với các điều kiện hạn chế tăng trưởng tế bào bắt đầu tổng hợp astaxanthin, đồng thời sẽ có những thay đổi về hình thái, tế bào tròn và to hơn có vách dày và chuyển dần sang màu đỏ để tồn tại được trong môi trường điều kiện khắc nghiệt. Sự hình thành

astaxanthin ở *H. pluvialis* có liên quan đến những thay đổi lớn trong đặc điểm hình thái, sinh lí và quang hợp của tảo. Dinh dưỡng và các thông số môi trường là những yếu tố có thể gây ra sự hình thành astaxanthin trong tế bào của *H. pluvialis*. Khi được nuôi cấy trong môi trường OHM, tảo duy trì trạng thái xanh và tăng trưởng mạnh và chỉ khi các thành phần dinh dưỡng và vi lượng trong môi trường như nitrat bị cạn kiệt khiến sự phát triển trở nên hạn chế, các tế bào bị ức chế và tích lũy astaxanthin. Trong nghiên cứu của Mark Harker và các cộng sự đã chỉ ra rõ, khi giảm nồng độ N và P trong môi trường nuôi cấy kích thích tảo tạo astaxanthin [6]. Trong môi trường CMS nồng độ N và P thấp hơn rất nhiều so với môi trường OHM, do đó đã tạo ra một môi trường khắc nghiệt làm tảo *H. pluvialis* kích thích tạo astaxanthin. Nồng độ CMS càng thấp, thời gian tảo chuyển dạng tích lũy astaxanthin càng ngắn.

4 Kết luận

Từ thực nghiệm cho thấy môi trường CMS có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng – khả năng tích lũy astaxanthin của tảo *H. Pluvialis*; mật độ tế bào và khối lượng khô tăng khi tăng nồng độ CMS từ 0,01 % lên 0,2 %, tuy nhiên, so với mẫu đối chứng nuôi trong môi trường OHM, năng suất về sinh khối còn thấp hơn rất nhiều. Ngược lại, ở nồng độ CMS càng thấp tảo có xu hướng tạo astaxanthin nhiều nhất và nhanh hơn (3,1 % chỉ sau 18 ngày nuôi cấy) để tồn tại trong môi trường nghèo nàn các chất dinh dưỡng và vi khoáng.

Dựa vào kết quả cho thấy, có thể sử dụng CMS với nồng độ thấp 0,01 % làm môi trường nuôi cấy trực tiếp cho tảo *H. pluvialis* để thúc đẩy tạo astaxanthin. Từ đó, xây dựng quy trình nuôi cấy vừa tiết kiệm, hiệu quả và nhanh chóng; đồng thời góp phần trong vấn đề giải quyết nước thải chứa CMS.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.108/HĐ-KHCN

Tài liệu tham khảo

- 1.C. Zhang, J. Liu, and L. Zhang (2017). Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, Vol. 35, pp. 1205-1211, 2017/09/01.
- 2.T.-B. Zou, Q. Jia, H.-W. Li, C.-X. Wang, and H.-F. Wu. (2013). Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Marine Drugs*, Vol. 11, pp. 1644-1655.
3. S. Dong, Y. Huang, R. Zhang, S. Wang, and L. Yun (2014). Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, Vol. 2014, p. 694305, 01/19.
- 4.K. Chekanov, E. Lobakova, I. Selyakh, L. Semenova, R. Sidorov, and A. Solovchenko (2014). Accumulation of Astaxanthin by a New *Haematococcus Pluvialis* Strain BM1 from the White Sea Coastal Rocks (Russia). *Marine Drugs*, Vol. 12, pp. 4504-4520, 08/01.
- 5.M. Orosa, J. F. Valero, C. Herrero, and J. Abalde (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters*, Vol. 23, pp. 1079-1085, 2001/07/01.
- 6.M. Harker, A. J. Tsavalos, and A. J. Young (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, Vol. 55, pp. 207-214, 1996/03/01.
- 7.T. Göksan, İ. Ak, and C. Kılıç (2011). Growth Characteristics of the Alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as Affected by Nitrogen Source, Vitamin, Light and Aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 11, pp. 377-383, 09/01.
- 8.J. Fábregas, A. Domínguez, M. Regueiro, A. Maseda, and A. Otero (2000). Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 53, pp. 530-535.
- 9.I. Niizawa, B. Y. Espinaco, S. E. Zorrilla, and G. A. Sihufe (2021). Chapter 5 – Astaxanthin production by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis*: A success story. *Global Perspectives on Astaxanthin*, G. A. Ravishankar and A. Ranga Rao, Eds., ed: Academic Press, pp. 71-89.
10. B. Nahidian, F. Ghanati, M. Shahbazi, and N. Soltani (2018). Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology*, Vol. 255, pp. 229-237, 2018/05/01.

Investigation the effect of molasses residue on the growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis*

Nguyen Thi Bich Ngoc, Nguyen Luong Hieu Hoa, Huynh Tran My Hoa, Nguyen Thanh Loan
Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University
ntbngoc@ntt.edu.vn

Abstract *Haematococcus pluvialis* is the richest natural source of astaxanthin available. Changes in nutritional and environmental factors stimulate algae to produce astaxanthin. Currently, there have been many studies investigate the nutritional factors affecting astaxanthin accumulation of *Haematococcus* algae. However, the application of nitrogen and green carbon sources to the culture of *Haematococcus* algae is limited in Vietnam. Therefore, this study used condensed molasses residue (condensed molasses solubles – CMS) as a medium to provide green nutrients for algae cultivation. Experimental results showed that CMS affects the growth and astaxanthin accumulation capacity of the algae *H. pluvialis*. When gradually increasing the CMS concentration from 0.01 % to 0.2 %, the biomass tended to increase gradually from 150.497 mg/L to 192.689 mg/L. The highest cell density was obtained in the CMS medium 0.2 % 19.3×10^4 cell/mL with a specific growth rate of 0.05 mg/L per day. The highest cumulative astaxanthin concentration was found up to 3.1 % (compared to dry biomass) at low concentration of 0.01 % CMS. It indicated that the lower the CMS concentration, the faster the astaxanthin accumulation time.

Keywords *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, condensed molasses solubles, CMS.