

Bài báo nghiên cứu

**CƯỜNG ĐỘ ÁNH SÁNG ẢNH HƯỞNG LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG,
TÍCH LŨY SẮC TỐ, HỢP CHẤT PHENOLIC VÀ KHẢ NĂNG
CHỐNG OXY HÓA CỦA VI TẢO *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*****Võ Hồng Trung*, Nguyễn Thị Hồng Phúc, Nguyễn Trần Khương Bắc**

Bộ môn Hóa sinh – Độc chất, Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*Tác giả liên hệ: Võ Hồng Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Ngày nhận bài: 21-12-2020; ngày nhận bài sửa: 25-3-2021; ngày duyệt đăng: 30-3-2021

TÓM TẮT

Haematococcus pluvialis là một loài vi tảo lục đơn bào có giá trị thương mại cao nhờ khả năng tích lũy một lượng lớn astaxanthin trong tế bào. Ánh sáng là một trong những tác nhân chính ảnh hưởng lên sự tăng trưởng và tích lũy sắc tố, hợp chất phenolic và khả năng chống oxy hóa của tế bào *H. pluvialis*. Trong nghiên cứu này, bốn cường độ ánh sáng từ 20 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ đến 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ được thực hiện nhằm khảo sát sự tăng trưởng, tổng hợp sắc tố, hàm lượng carotenoid, phenolic và khả năng chống oxy hóa của vi tảo *H. pluvialis* trên 2 môi trường OHM và BG11. Kết quả cho thấy, ở cường độ ánh sáng thấp 20 đến 50 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tế bào *H. pluvialis* duy trì giai đoạn tăng trưởng sinh dưỡng và mật độ tế bào cao. Tuy nhiên ở cường độ ánh sáng cao 70 đến 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tế bào chuyển sang giai đoạn bào nang sớm hơn, tăng trưởng thấp, hàm lượng sắc tố, phenolic và khả năng chống oxy hóa cao hơn điều kiện cường độ ánh sáng thấp ở cả 2 môi trường OHM và BG11.

Từ khóa: khả năng chống oxy hóa; carotenoid; *Haematococcus pluvialis*; phenolic

1. Giới thiệu

Hiện nay, vi tảo là một nguồn tự nhiên rất tiềm năng về các hợp chất có hoạt tính sinh học mới (Plaza, Cifuentes, Ibáñez, & Technology, 2008). Các chất có hoạt tính sinh học này không chỉ được sử dụng làm chất phụ gia hay chất bảo quản tự nhiên mà còn được làm chất bổ sung thực phẩm như một thành phần nhằm tăng cường sức khỏe của con người (Rodríguez-Meizoso et al., 2010). Vi tảo đơn bào là một nguồn thay thế đầy hứa hẹn các chất chống oxy hóa. Chất chống oxy hóa được cho là có một số tác dụng tích cực đối với sức khỏe, bao gồm ngăn ngừa rối loạn tim mạch, một số bệnh liên quan đến lão hóa như Alzheimer và một số loại ung thư (Goiris et al., 2012).

Cite this article as: Vo Hong Trung, Nguyen Thi Hong Phuc, & Nguyen Tran Khuong Bac (2021). Light intensity effect on the growth, pigment, phenolic compound accumulation, and antioxidant capacity of *Haematococcus Pluvialis* microalgae. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 18(3), 559-571.

Nhiều nghiên cứu cho thấy một số chi vi tảo có chứa chất chống oxy hóa mạnh, gồm các chất có bản chất ưa lipid và ưa nước. Một loại chất chống oxy hóa quan trọng và biết nhiều từ vi tảo là carotenoid. Carotenoid đóng một vai trò quan trọng trong việc khử các gốc oxy phản ứng (ROS) được tạo ra trong quá trình quang hợp, đặc biệt là oxy singlet. Một loại chất chống oxy hóa quan trọng nữa là các hợp chất phenolic, cụ thể là các flavonoid phức tạp. Các flavonoid có thể ức chế quá trình oxy hóa lipid bằng cách loại bỏ trực tiếp các gốc $\bullet\text{OH}$, HOCl , oxy singlet và các gốc peroxy hóa lipid, bằng cách chelat kim loại và ức chế enzym lipoxygenase. Hàm lượng các chất phenolic trong sinh khối vi tảo tăng lên khi tiếp xúc với ánh sáng UV, cho thấy rằng chúng thực sự đóng một vai trò trong phản ứng chống oxy hóa đáp ứng với các ức chế trong môi trường (Goiris et al., 2012).

Haematococcus pluvialis là một loại vi tảo lục đơn bào, nước ngọt được nghiên cứu nhiều do khả năng tích lũy astaxanthin dưới các điều kiện bất lợi của môi trường, một carotenoid màu đỏ có hoạt tính chống oxy hóa mạnh (Yuan, Chen, & Chemistry, 1998). Hoạt tính chống oxy hóa của ketocarotenoid astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4-dione) cao hơn gấp 10 lần so với các loại carotenoid khác như β -carotene, zeaxanthin, lutein, canthaxanthin và cao hơn gấp 500 lần so với α -tocopherol (Suh, Joo, & Lee, 2006). Sự tổng hợp astaxanthin ở *H. pluvialis* liên quan đến quá trình giảm hoặc ngừng sinh trưởng và chuyển trạng thái tế bào từ dạng sinh dưỡng sang dạng bào nang (Tocquin, Fratamico, & Franck, 2012). Sự tích lũy astaxanthin có thể được cảm ứng trong các điều kiện như thiếu hụt nitơ, phosphor, dư thừa acetat, cường độ ánh sáng cao hoặc bổ sung các tiền chất carotenoid khác nhau (Harker, Tsavalos, & Young, 1996). Cường độ ánh sáng được coi là một trong những yếu tố môi trường quan trọng nhất ảnh hưởng đến sự tích tụ của astaxanthin trong *H. pluvialis* (Makio Kobayashi, Kakizono, Nishio, & Nagai, 1992). Cường độ ánh sáng mạnh giúp gia tăng sự tích lũy astaxanthin, tuy nhiên cường độ quá mạnh có thể kìm hãm sự tăng trưởng của tế bào vi tảo (Nam, Trân, Hiếu, Hiền, & Liên). Trong nuôi cấy vi tảo *Haematococcus* cần xác định được điều kiện chiếu sáng tối ưu cho giai đoạn nuôi tăng trưởng và giai đoạn nuôi ức chế để giúp tế bào tích lũy được lượng lớn astaxanthin và các chất chống oxy hóa trong khoảng thời gian thích hợp nhất. Vì vậy, 4 cường độ ánh sáng từ 20 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ được sử dụng để nghiên cứu sự tăng trưởng, sự tích lũy sắc tố, hàm lượng phenolic tổng và hoạt tính chống oxy hóa của *H. pluvialis* nhằm xác định cường độ ánh sáng thích hợp cho giai đoạn nuôi tăng trưởng cũng như giai đoạn nuôi ức chế tích lũy astaxanthin và các chất chống oxy hóa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng *Haematococcus pluvialis* và điều kiện nuôi cấy

Chủng vi tảo *Haematococcus pluvialis* (UTEX2505) được nuôi cấy tại phòng thí nghiệm Hóa sinh – Độc chất trường Đại học Nguyễn Tất Thành. *H. pluvialis* được nuôi cấy trên môi trường OHM (Fábregas, Otero, Maseda, & Domínguez, 2001), cường độ ánh sáng 20 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, chu kỳ chiếu sáng tối 12:12 giờ, nhiệt độ nuôi cấy khoảng $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Các phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Quan sát hình thái tế bào *Haematococcus pluvialis*

Hình thái tế bào *Haematococcus pluvialis* được quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400X mỗi 3 ngày nuôi cấy.

2.2.2. Xác định sự tăng trưởng tế bào *Haematococcus pluvialis*

100 μ L mẫu tảo được lấy và cố định bằng lugol. Số lượng tế bào được đếm bằng kính hiển vi quang học (100X) với 10 μ L dịch tảo. Mật độ tế bào ở hai thời điểm khác nhau trong quá trình tăng trưởng của mẫu được dùng để tính tốc độ tăng trưởng đặc hiệu (μ : tế bào/mL/ngày) trong khoảng thời gian đó theo công thức (Levasseur, Thompson, & Harrison, 1993):

$$\mu = \frac{\ln(\frac{C_2}{C_1})}{t_2 - t_1}$$

trong đó, C_1 , C_2 : Mật độ tế bào tại thời điểm 1 và 2

t_1 , t_2 : Thời điểm 1 và 2

2.2.3. Xác định hàm lượng sắc tố

Lấy 1 mL dịch nuôi cấy, li tâm ở 13.000 vòng trong 5 phút, bỏ dịch lấy phần cặn tảo bên dưới, thêm 1mL HCl 4M vào hòa tan cặn sau đó đem đun cách thủy ở 70 °C trong 2 phút. Thêm 3 mL ethanol: hexane (2:1 v/v), vortex cẩn thận. Thêm vào 4 mL n-hexane, vortex kĩ. Hỗn hợp được li tâm 3000 vòng trong 5 phút. Lóp sắc tố có hexane bên trên được đọc ở các bước sóng 450nm, 662nm, 645nm. Hàm lượng carotenoid tổng được xác định theo công thức: Carotenoid (μ g/mL) = $A_{450} \times 25,2$ (Prieto, Canavate, & García-González, 2011; Shaish, Ben-Amotz, & Avron, 1992)

Hàm lượng diệp lục tố a và b được xác định theo công thức (LICHTENTHALER & Wellburn, 1983):

$$\text{Diệp lục tố a } (\mu\text{g/mL}) = 11,75 (A_{662}) - 2,35 (A_{645})$$

$$\text{Diệp lục tố b } (\mu\text{g/mL}) = 18,61 (A_{645}) - 3,96 (A_{662})$$

$$\text{Diệp lục tố tổng } (\mu\text{g/mL}) = \text{diệp lục tố a} + \text{diệp lục tố b}$$

trong đó, A_{645} : độ hấp thụ ở bước sóng 645nm

A_{662} : độ hấp thụ ở bước sóng 662nm

2.2.4. Xác định hàm lượng phenolic tổng

Lấy 1,0 mL dịch tảo li tâm 12.000 vòng trong 05 phút, loại bỏ dịch. Thêm 1 mL methanol tuyệt đối vào cặn, trộn đều. Li tâm 10.000 vòng trong 5 phút, bỏ cặn thu được dịch chiết. Lấy 0,5 mL dịch chiết cho vào eppendorf 2 mL, cho thêm 0,5 mL thuốc thử Folin Ciocalteu's phenol, tiếp tục cho từ từ 0,5 mL dung dịch Na_2CO_3 10%. Ủ 90 phút trong tối. Đo quang ở bước sóng 750 nm (Goiris et al., 2012).

Đường chuẩn phenolic: Sử dụng nồng độ acid gallic chuẩn 10 đến 200 mg/L và xác định nồng độ phenolic tổng trong mẫu *Haematococcus pluvialis* bằng phương trình: $y = 30,263x - 0,0638$; $R^2 = 0,9948$

2.2.5. Xác định khả năng chống oxy hóa

Pha thuốc thử DPPH: Dung dịch DPPH được pha loãng bằng cách hòa tan 0,004 g DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) trong 100 mL methanol (Das et al., 2011).

Lấy 1,0 mL dung dịch tảo li tâm 12.000 vòng trong 5 phút, loại bỏ dịch. Thêm 1 mL ethanol tuyệt đối vào cấn, trộn đều và ủ 4 giờ ở 4 °C. Li tâm 10.000 vòng trong 5 phút, bỏ cấn lấy dịch chiết. Lấy 0,5 mL dịch chiết cho vào eppendorf 2 mL, cho thêm 1 mL thuốc thử DPPH trộn đều. Ủ 30 phút trong tối, ở nhiệt độ phòng. Đo quang ở bước sóng 517nm. Khả năng chống oxy hóa (I%) được tính dựa trên khả năng khử gốc tự do của DPPH theo công thức sau (Yaltirak, Aslim, Ozturk, & Alli, 2009):

$$I\% = (A_{\text{Đối chứng}} - A_{\text{Mẫu}}) / A_{\text{Đối chứng}} \times 100$$

2.3. Phương pháp thiết kế thí nghiệm

Vi tảo *Haematococcus pluvialis* nuôi cấy trên môi trường OHM (Fábregas et al., 2001) và BG11 (Andersen, 2005) đạt pha tăng trưởng sau 10 ngày nuôi cấy được sử dụng để bố trí thí nghiệm.

Haematococcus pluvialis được nuôi cấy trên môi trường OHM và BG11 với 4 cường độ ánh sáng 20 (OHM-20 và BG11-20), 50 (OHM-50 và BG11-50), 70 (OHM-70 và BG11-70) và 100 (OHM-100 và BG11-100) $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$. Thí nghiệm thực hiện với 200 mL dịch nuôi cấy (gồm môi trường mới và dịch tảo), mật độ tế bào ban đầu khoảng $0,3 \cdot 10^6$ tế bào/mL, sục khí liên tục, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ, nhiệt độ 25 ± 2 °C. Đánh giá sự tăng trưởng dựa trên mật độ tế bào, sự biến đổi hình thái và sắc tố quang hợp, hàm lượng phenolic tổng và khả năng chống oxy hóa của *H. pluvialis* sau mỗi 3 ngày nuôi cấy.

2.4. Xử lý số liệu

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

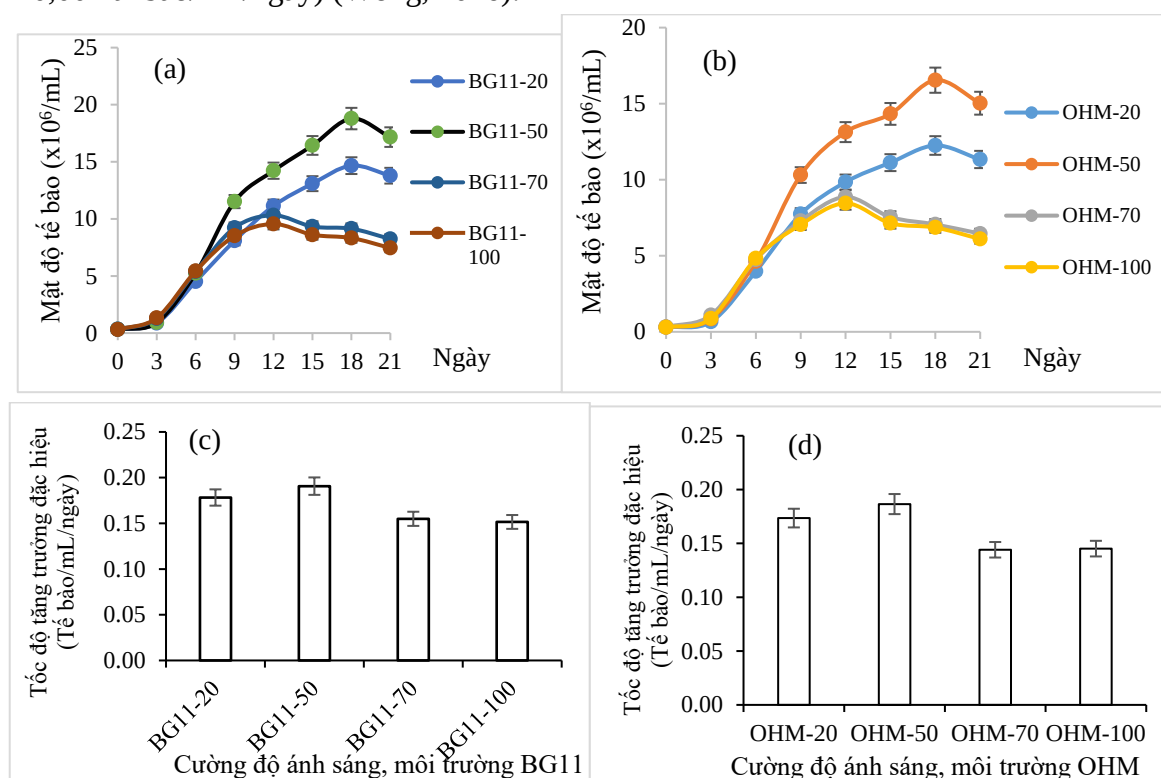
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Sự tăng trưởng của *Haematococcus pluvialis*

Sự tăng trưởng của vi tảo *H. pluvialis* dưới 4 cường độ ánh sáng từ 20 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ được thể hiện ở Hình 3.1a,b. Mật độ tế bào *H. pluvialis* ở cường độ ánh sáng 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ nuôi cấy trên cả 2 môi trường BG11 và OHM đạt giá trị cao hơn các cường độ ánh sáng 20, 70 và 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$. Trong đó, cường độ ánh sáng 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ và môi trường BG11 đạt mật độ cao nhất tại ngày thứ 18 ($18,79 \cdot 10^6$ tế bào/mL) ($p \leq 0,05$).

Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của vi tảo *H. pluvialis* ở cường độ ánh sáng thấp từ 20 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đến 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ở cả 2 môi trường OHM và BG11 không có sự khác biệt ($p > 0,05$) và cao hơn so với cường độ ánh sáng cao từ 70 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ($p \leq 0,05$) (Hình 3.1c, d)

So sánh giữa 4 cường độ ánh sáng thử nghiệm, sự tăng trưởng của tế bào vi bào *H. pluvialis* ở cường độ ánh sáng $50 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ là cao nhất. Như vậy, môi trường OHM và BG11 ở cường độ ánh sáng thấp từ $20 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đến $50 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ là phù hợp nhất cho sự tăng trưởng và phát triển của *H. pluvialis*. Theo Tran và cs (2009), *Haematococcus lacustris* nuôi cấy ở cường độ ánh sáng thấp $40 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ trong 6 ngày đầu mật độ tế bào đạt cực đại $2,2 \times 10^5$ tế bào/mL và sau đó đạt phase ổn định. Sau đó chuyển sang phase ức chế ánh sáng cao $200 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, tế bào bắt đầu tích lũy astaxanthin, tế bào từ màu xanh chuyển sang dạng bào nang có màu đỏ (Tran, Park, & Lee, 2009). Điều kiện nuôi cấy với cường độ ánh sáng $40,6 \pm 3,05 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, ánh sáng trắng với chu kỳ chiếu sáng 24:0 giờ giúp tế bào *Haematococcus pluvialis* duy trì giai đoạn tăng trưởng sinh dưỡng, đạt mật độ tế bào cực đại ($8,58 \pm 0,452 \times 10^5$ tế bào/mL), tốc độ tăng trưởng đặc hiệu ($0,365 \pm 0,004$ tế bào/mL/ngày) (Wong, 2016).



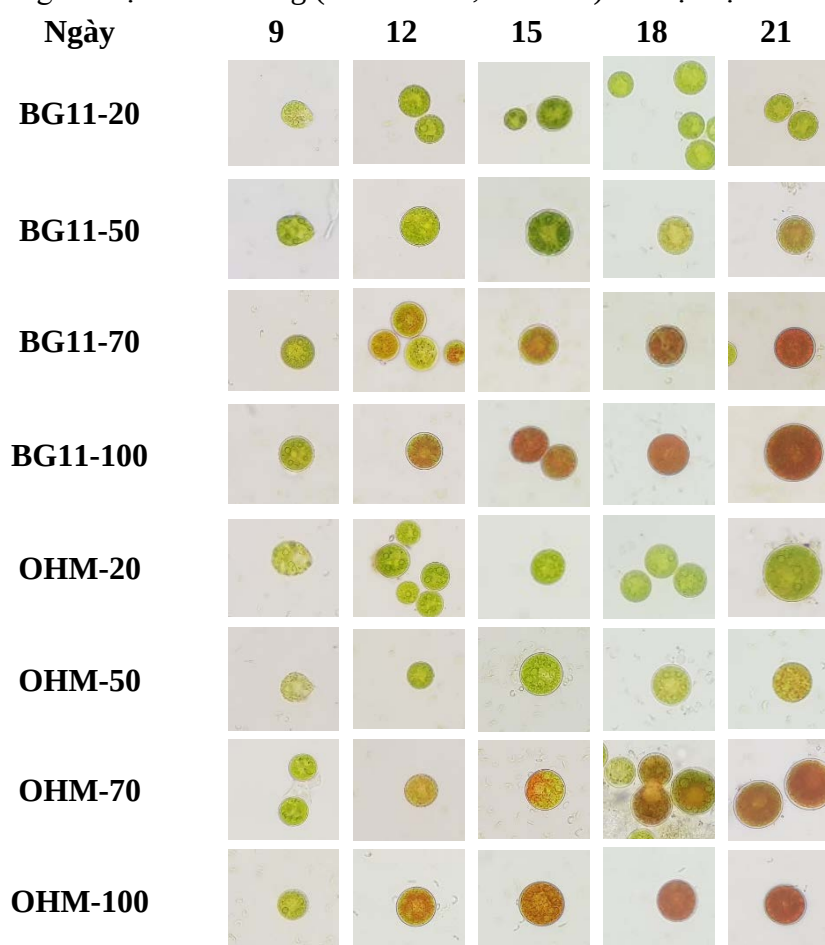
Hình 3.1. Mật độ tế bào và tốc độ tăng trưởng của vi tảo *H. pluvialis* ở các cường độ ánh sáng trên 2 môi trường BG11 (a,c) và OHM (b,d)

3.2. Hàm lượng sắc tố

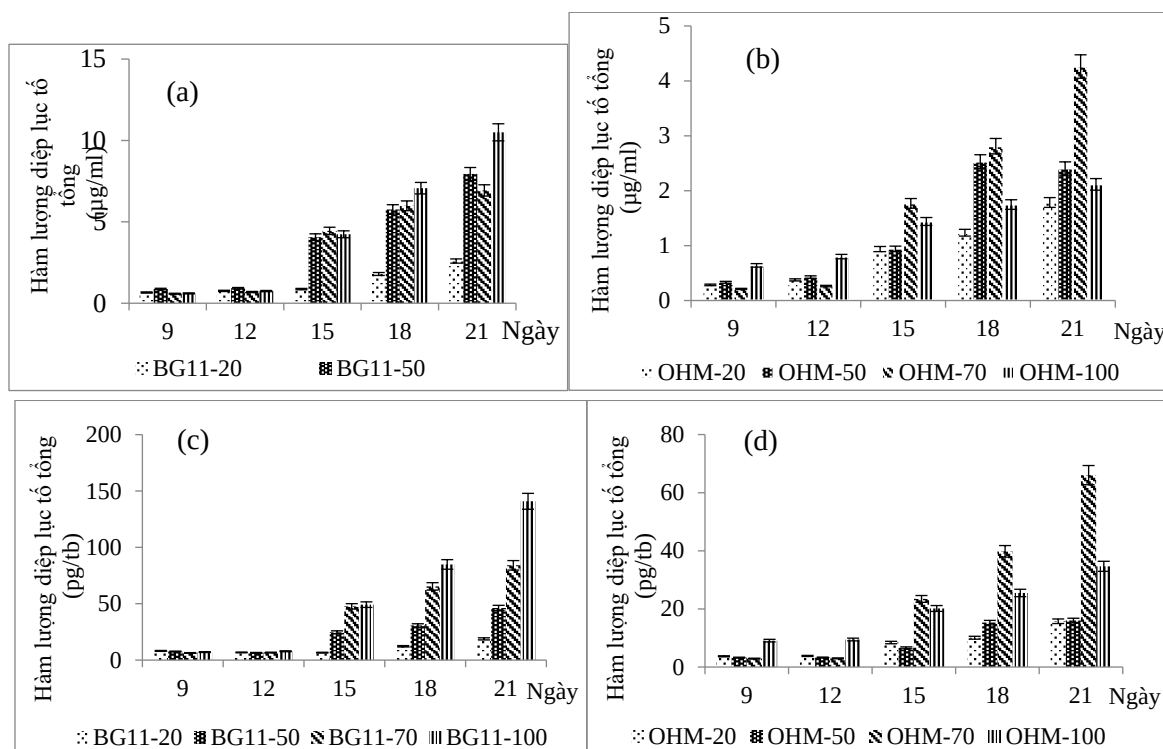
3.2.1. Hàm lượng diệp lục tố

Hàm lượng diệp lục tố tổng của vi tảo *H. pluvialis* nuôi cấy trên môi trường OHM và BG11 ở 4 cường độ ánh sáng từ $20 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đến $100 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ tăng dần trong quá trình nuôi cấy. Trong đó, hàm lượng diệp lục tố tổng của *H. pluvialis* ở môi trường BG11 cao hơn so với môi trường OHM ($p \leq 0,05$) (Hình 3.3).

Sự gia tăng của hàm lượng diệp lục tố trong tế bào dường như phụ thuộc nhiều vào các điều kiện thí nghiệm và mối quan hệ giữa mật độ tế bào và cường độ ánh sáng mà không phụ thuộc vào sự hình thành astaxanthin (Fan et al., 1995). Nghiên cứu của Chen và Liang (2009), phân tích các mối tương quan cho thấy có mối tương quan thuận giữa hàm lượng diệp lục tố và mật độ tế bào trong toàn bộ thời gian thí nghiệm. Trong khi hàm lượng diệp lục tố và mật độ tế bào đều cho thấy có mối tương quan với cường độ ánh sáng (CHEN & LIANG, 2009). Hàm lượng diệp lục tố của *H. pluvialis* phụ thuộc vào yếu tố đa lượng trong môi trường đặc biệt nitơ và phosphor, môi trường BG11 với sự dồi dào của các yếu tố đa lượng này giúp tế bào tăng tổng hợp sắc tố quang hợp (diệp lục tố và caroten sơ cấp) dẫn đến tế bào duy trì giai đoạn sinh dưỡng (tế bào xanh, hình 3.2) và mật độ tế bào cao.



Hình 3.2. Sự thay đổi hình thái tế bào vi tảo *H. pluvialis* qua các ngày nuôi cấy ở cường độ ánh sáng 20 đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ trên 2 môi trường BG11 và OHM



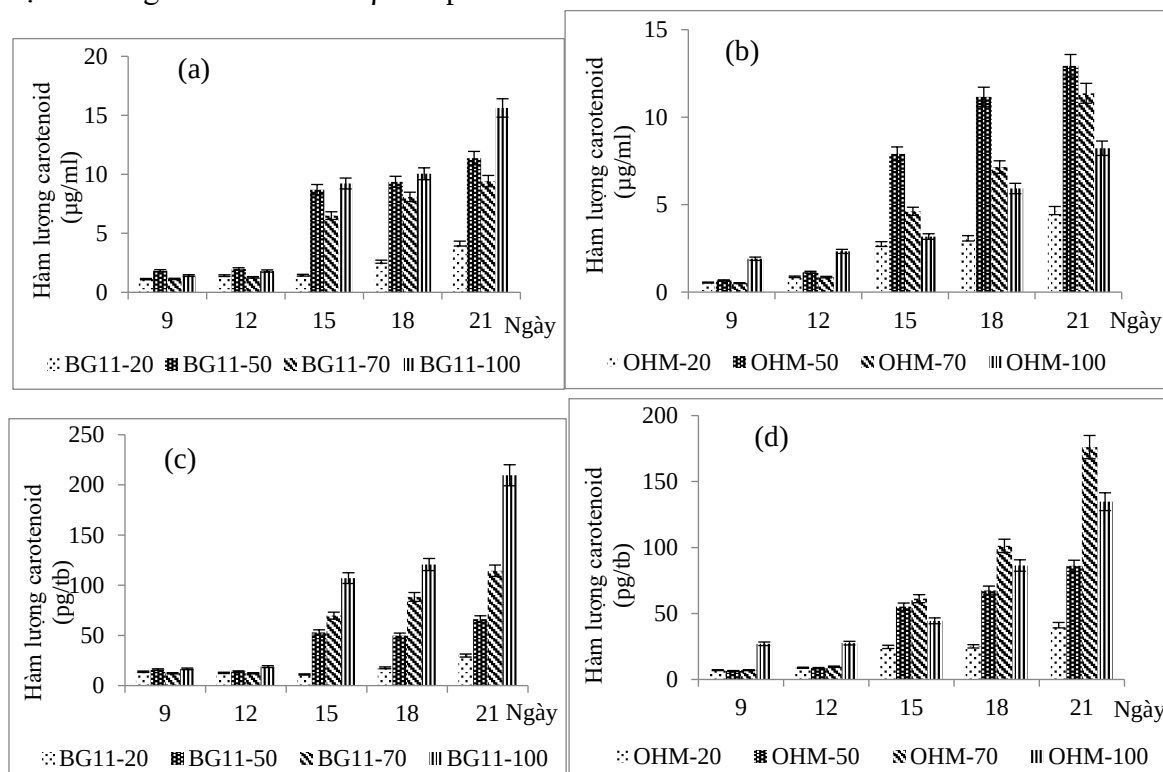
Hình 3.3. Hàm lượng diệp lục tổng trên đơn vị thể tích và trên đơn vị tế bào của vi tảo *H. pluvialis* ở các cường độ ánh sáng trên 2 môi trường BG11 (a,c) và OHM (b,d)

3.2.2. Hàm lượng carotenoid của *H. pluvialis*

Hàm lượng carotenoid của vi tảo *H. pluvialis* nuôi cấy ở 4 cường độ ánh sáng từ 20 µmol photon/m²/s đến 100 µmol photon/m²/s được thể hiện ở hình 3.4. Môi trường OHM, hàm lượng carotenoid (µg/mL) ở cường độ ánh sáng 50 µmol photon/m²/s cao hơn so với các điều kiện ánh sáng còn lại là do mật độ tế bào ở cường độ ánh sáng này cao hơn ($p \leq 0,05$) (Hình 3.4a,b). Tuy nhiên, hàm lượng carotenoid (pg/tb) của *H. pluvialis* nuôi cấy trên môi trường OHM ở cường độ ánh sáng cao 70 µmol photon/m²/s đến 100 µmol photon/m²/s đạt giá trị cao hơn ($p \leq 0,05$) (Hình 3.4c,d). Ở môi trường BG11, hàm lượng carotenoid của *H. pluvialis* đạt giá trị cao hơn cường độ ánh sáng 100 µmol photon/m²/s ($p \leq 0,05$) (Hình 3.4a,c).

Cường độ ánh sáng cao có thể gây ra sự tổng hợp và tích lũy hàm lượng lớn astaxanthin ở *H. pluvialis*. Hàm lượng astaxanthin tương quan tỷ lệ với lượng ánh sáng (cường độ ánh sáng $\times$ thời gian chiếu sáng thực). Những thay đổi về màu sắc, hình dạng và kích thước của tế bào *H. pluvialis* phản ánh sự thích nghi của sinh vật này với môi trường bất lợi. Sự gia tăng hàm lượng astaxanthin của bào nang *H. pluvialis* có liên quan chặt chẽ với sự tăng kích thước nang và cả hai đều bị ảnh hưởng bởi cường độ ánh sáng. Khi tiếp xúc với stress quang oxy hóa, các tế bào *H. pluvialis* bắt đầu tổng hợp và tích lũy astaxanthin để tự bảo vệ khỏi tổn thương do quang oxy hóa. Trong quá trình tích lũy astaxanthin, sự gia tăng hàm lượng lipid và carbohydrate (Li et al., 2019). Nghiên cứu cho thấy tăng cường độ ánh sáng dẫn đến tăng tổng hợp astaxanthin. Hơn nữa, sự giới hạn hàm lượng nitrat và cường độ chiếu sáng cao làm tăng tổng hợp carotenoid. Ngoài thiếu nitrat và chiếu sáng cao, việc không có sự

khí cũng tăng khả năng sản xuất và năng suất astaxanthin (Dominguez-Bocanegra, Ponce-Noyola, & Torres-Munoz, 2007). Như vậy, *H. pluvialis* tăng tích lũy carotenoid đặc biệt astaxanthin: tế bào chuyển sang bào nang có màu đỏ (Hình 3.2) khi được nuôi cấy ở cường độ ánh sáng cao 70 đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$.

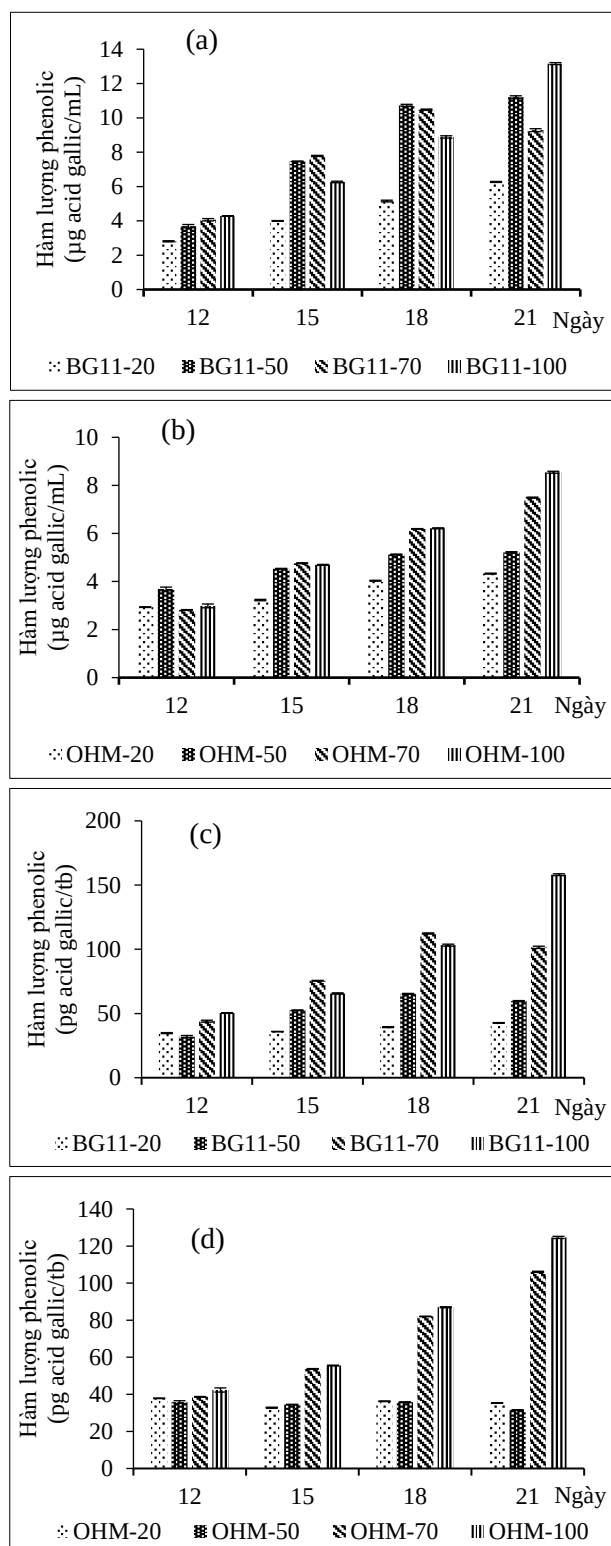


Hình 3.4. Hàm lượng carotenoid trên đơn vị thể tích và trên đơn vị tế bào của vi tảo *H. pluvialis* ở các cường độ ánh sáng trên 2 môi trường BG11 (a,c) và OHM (b,d)

3.3. Hàm lượng phenolic tổng của *H. pluvialis*

Hàm lượng phenolic của *H. pluvialis* nuôi cấy trên 2 môi trường BG11 và OHM ở 4 cường độ ánh sáng từ 20 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ tăng dần trong quá trình nuôi cấy. Ở cả 2 môi trường BG11 và OHM, cường độ ánh sáng 70 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ và 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đạt hàm lượng phenolic ($\mu\text{g/mL}$) cao hơn so với các cường độ ánh sáng thấp ($p < 0,05$) (hình 3.5a,b). Đặc biệt, hàm lượng phenolic (pg/tb) ở cường độ ánh sáng 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ đạt kết quả cao nhất 1,25 pg/tb ở môi trường OHM và 1,58 pg/tb ở môi trường BG11 sau 21 ngày nuôi cấy ($p < 0,05$) (Hình 3.5c,d).

Các hợp chất phenolic là một trong những loại chất chống oxy hóa tự nhiên quan trọng nhất và ngày càng nhận được sự quan tâm của người tiêu dùng và các nhà sản xuất thực phẩm vì lợi ích sức khỏe (Ruiz-Domínguez et al., 2019). Các hợp chất phenolic là chất chống oxy hóa tự nhiên quan trọng. Polyphenol hoạt động như chất chống oxy hóa thông qua chuyển điện tử và nguyên tử hydro (Safafar, Van Wagenen, Møller, & Jacobsen, 2015). Như vậy *H. pluvialis* tăng tổng hợp các hợp chất phenolic khi được nuôi cấy ở điều kiện cường độ ánh sáng cao từ 70 đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ở cả 2 môi trường BG11 và OHM.

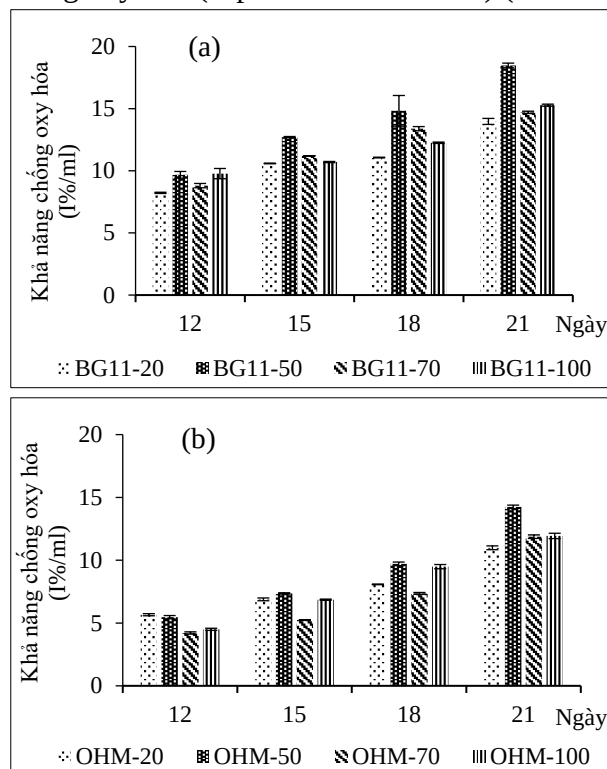


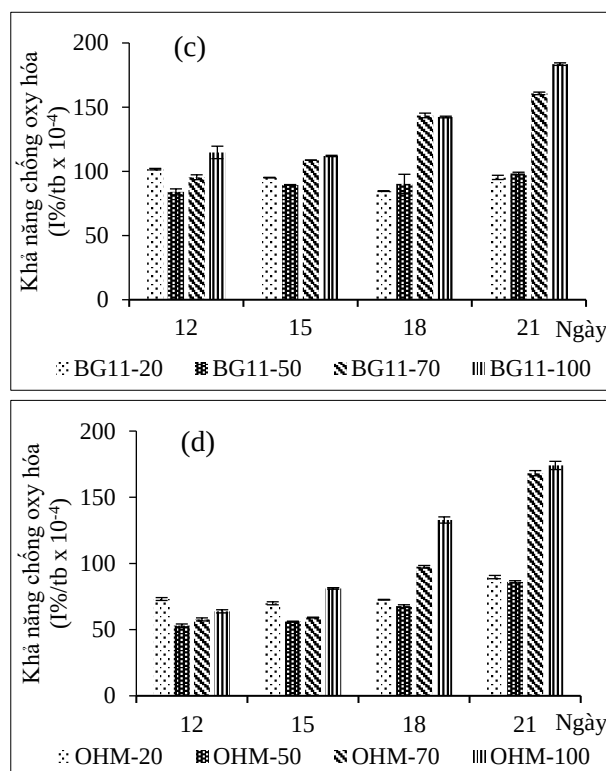
Hình 3.5. Hàm lượng phenolic trên đơn vị thể tích và trên đơn vị tế bào của vi tảo *H. pluvialis* ở các cường độ ánh sáng trên 2 môi trường BG11 (a,c) và OHM (b,d)

3.4. Khả năng chống oxy hóa của *H. pluvialis*

Khả năng chống oxy hóa của vi tảo *H. pluvialis* tăng trong quá trình nuôi cấy. Trong đó, khả năng chống oxy hóa (I%/mL) của *H. pluvialis* ở môi trường BG11 đạt giá trị cao hơn so với môi trường OHM ở tất cả các điều kiện chiếu sáng sau 21 ngày nuôi cấy ($p < 0,05$) (hình 3.6a,b). Khả năng chống oxy hóa (I%/tb) ở điều kiện ánh sáng cao 70 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ (1,61 I%/tb ở BG11 và 1,68 I%/tb ở OHM) và 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ (1,84 I%/tb ở BG11 và 1,74 I%/tb ở OHM) cao hơn so với các điều kiện chiếu sáng cường độ thấp ở cả 2 môi trường ($p < 0,05$) (hình 3.6c,d).

Khả năng chống oxy hóa là một chức năng của cả carotenoid và các loại acid béo, khả năng chống oxy hóa của phần astaxanthin diester cao hơn 60% so với phần astaxanthin monoester và hai lần so với astaxanthin tự do (Ceron et al., 2007). *H. pluvialis* có 2 hệ thống chống oxy hóa, enzyme chống oxy hóa liên quan đến giai đoạn tế bào sinh dưỡng và chất chống oxy hóa astaxanthin trong giai đoạn bào nang. Nang trưởng thành (giàu astaxanthin) cho thấy hoạt tính chống oxy hóa cao chống lại O_2^- trong các tế bào đã được thâm thấu, nhưng không có hoạt tính trong dịch chiết chứa astaxanthin, trong khi nang chưa trưởng thành (nghèo astaxanthin) có hoạt tính chống oxy hóa rất thấp đối với O_2^- ở cả hai trường hợp. Kết quả cho thấy rằng astaxanthin tích lũy trong tế bào nang có chức năng như một chất chống oxy hóa chống lại stress oxy hóa quá mức. Hoạt tính chống oxy hóa chống lại O_2^- cũng tương tự trong cả tế bào được thâm thấu và dịch chiết từ tế bào sinh dưỡng cho thấy sự hiện diện của enzym chống oxy hóa (superoxide dismutase) (M Kobayashi et al., 1997).





Hình 3.6. Khả năng chống oxy hóa trên đơn vị thể tích và trên đơn vị tế bào của vi tảo *H. pluvialis* ở các cường độ ánh sáng trên 2 môi trường BG11 (a,c) và OHM (b,d)

4. Kết luận

Cường độ ánh sáng ảnh hưởng lên sự tăng trưởng, tổng hợp sắc tố, hợp chất phenolic và khả năng chống oxy hóa của vi tảo *H. pluvialis*. Cường độ ánh sáng thấp 20 đến 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ thích hợp cho giai đoạn nuôi cấy sinh dưỡng tế bào *H. pluvialis*. Trong khi, cường độ ánh sáng cao 70 đến 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ kích thích hình thành bào nang, tăng tổng hợp sắc tố, hợp chất phenolic và khả năng chống oxy hóa của tế bào *H. pluvialis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*: Academic Press.
- Ceron, M. C., Garcia-Malea, M. C., Rivas, J., Acien, F. G., Fernandez, J. M., Del Rio, E., . . . 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(5), 1112-1119. doi:10.1007/s00253-006-0743-5
- CHEN, S., & LIANG, Y. J. S. C. F. S. (2009). Effects of illumination on the chlorophyll fluorescence parameters and astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* [J]. 1.
- Das, B., Das, B., Arpita, F., Morshed, M., Uddin, A., Bhattacharjee, R., & Hannan, J. (2011). Phytochemical screening and antioxidant activity of *Leucas aspera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(7), 1746.
- Dominguez-Bocanegra, A. R., Ponce-Noyola, T., & Torres-Munoz, J. A. (2007). Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(4), 783-791. doi:10.1007/s00253-007-0889-9

- Fábregas, J., Otero, A., Masada, A., & Domínguez, A. J. J. o. B. (2001). Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *89*(1), 65-71.
- Fan, L., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirshberg, J., Cohen, Z., Boussiba, S. J. P., & physiology, c. (1995). The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *36*(8), 1519-1524.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, *24*(6), 1477-1486.
- Harker, M., Tsavalos, A. J., & Young, A. J. (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, *55*(3), 207-214.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., & Nagai, S. (1992). Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *74*(1), 61-63.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., & Tsuji, Y. (1997). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied microbiology and biotechnology*, *48*(3), 351-356.
- Levasseur, M., Thompson, P. A., & Harrison, P. J. J. J. o. P. (1993). Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources 1. *29*(5), 587-595.
- Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J., Ke, H., . . . Wu, S. (2019). Differences between Motile and Nonmotile Cells of *Haematococcus pluvialis* in the Production of Astaxanthin at Different Light Intensities. *Marine drugs*, *17*(1), 39.
- LICHTENTHALER, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents: Portland Press Ltd.
- Nam, T. N., Trần, T. N. B., Hiếu, H. T., Hiền, N. T. D., & Liên, T. T. B. **NÂNG CAO SỰ TÍCH LŨY ASTAXANTHIN Ở VI TẢO *Haematococcus pluvialis* BỞI CÁC ĐIỀU KIỆN STRESS CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY.**
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. J. T. i. F. S., & Technology. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *19*(1), 31-39.
- Prieto, A., Canavate, J. P., & García-González, M. J. J. o. b. (2011). Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *151*(2), 180-185.
- Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F. J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. J. J. o. p., & analysis, b. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *51*(2), 456-463.
- Ruiz-Domínguez, M. C., Espinosa, C., Paredes, A., Palma, J., Jaime, C., Vílchez, C., & Cerezal, P. (2019). Determining the Potential of *Haematococcus pluvialis* Oleoresin as a Rich Source of Antioxidants. *Molecules*, *24*(22), 4073.
- Safar, H., Van Wagenen, J., Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine drugs*, *13*(12), 7339-7356.
- Shaish, A., Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1992). [41] Biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella* *Methods in Enzymology* (Vol. 213, pp. 439-444): Academic Press.

- Suh, I. S., Joo, H.-N., & Lee, C.-G. J. J. o. b. (2006). A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. 125(4), 540-546.
- Tocquin, P., Frataamco, A., & Franck, F. J. J. o. A. P. (2012). Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. 24(3), 365-373.
- Tran, N.-P., Park, J.-K., & Lee, C.-G. (2009). Proteomics analysis of proteins in green alga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae) expressed under combined stress of nitrogen starvation and high irradiance. *Enzyme and microbial technology*, 45(4), 241-246.
- Wong, Y. (2016). Effects of Light Intensity, Illumination Cycles on Microalgae *Haematococcus Pluvialis* for Production of Astaxanthin. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, 1-6.
- Yaltirak, T., Aslim, B., Ozturk, S., & Alli, H. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2052-2056.
- Yuan, J.-P., Chen, F. J. J. o. A., & Chemistry, F. (1998). Chromatographic separation and purification of trans-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis*. 46(8), 3371-3375.

**LIGHT INTENSITY EFFECT ON THE GROWTH, PIGMENT, PHENOLIC COMPOUND
ACCUMULATION, AND ANTIOXIDANT CAPACITY
OF HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS MICROALGAE**

Vo Hong Trung*, Nguyen Thi Hong Phuc, Nguyen Tran Khuong Bac

Nguyen Tat Thanh University, Vietnam

*Corresponding author: Vo Hong Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Received: December 21, 2020; Revised: March 25, 2021; Accepted: March 30, 2021

ABSTRACT

Haematococcus pluvialis is a green unicellular microalga highly valued for its ability to accumulate a large amount of astaxanthin in cells. Cultivation light is one of the most factors affecting the growth, pigment synthesis, capacity for antioxidant, and phenolic compound accumulation of *H. pluvialis* cells. In this research, four light intensities from 20 to 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ were used to investigate the organismal growth, pigment, and phenolic compound accumulation, as well as antioxidant capacity of *H. pluvialis* cells in OHM and BG11 media. In both media tested, we observed that under low light intensities from 20 to 50 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, *H. pluvialis* cells sustained a prolonged green vegetative stage and high cell density. On the contrary, under the high light intensities from 70 to 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, *H. pluvialis* cells developed cyst forms faster and exhibited lower growth while higher pigment synthesis and higher phenolic contents and antioxidant capacity.

Keywords: antioxidant capacity; carotenoid; *Haematococcus pluvialis*; phenolic