

# Tiềm năng các hợp chất chống oxy hóa carotenoid và phenolic của vi tảo (*Haematococcus pluvialis*)

Nguyễn Trần Khương Bắc, Nguyễn Thị Hồng Phúc, Võ Hồng Trung\*  
BM Hóa sinh – Độc chất, Khoa Dược, Trường ĐH Nguyễn Tất Thành

## Summary

*Haematococcus pluvialis* is a freshwater, green unicellular microalga capable of accumulating high levels of astaxanthin. The capacity to accumulate carotenoid and phenolic antioxidants of *H. pluvialis* was evaluated when cultured under BBM, OHM, BG11 and MD4 media. The results showed that carotenoid and phenolic contents of *H. pluvialis* was achieved at high values when cultured in OHM medium. However, phenolic content per cells (pg gallic acid/cell) of *H. pluvialis* was highest when cultured in MD4 medium. The antioxidant capacity of *H. pluvialis* was the greatest when grown in OHM. The antioxidant capacity of *H. pluvialis* showed a positive correlation with carotenoid and phenolic contents when cultured in different media. Thus, *H. pluvialis* demonstrated the potential of accumulating high carotenoid and phenolic antioxidants when grown in OHM media.

**Keywords:** *Haematococcus pluvialis*, carotenoid, phenolic, antioxidant capacity.

## Đặt vấn đề

*Haematococcus pluvialis* là một loài vi tảo lục nước ngọt, đơn bào, thuộc lớp Chlorophyceae, bộ Volvocales, họ Haematococcaceae và phân bố ở nhiều môi trường sống trên toàn thế giới [1]. *H. pluvialis* ngày càng nhận được nhiều sự quan tâm và được xem là nhà sản xuất astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta$ -carotene-4,4-dione) tốt nhất, một loại carotenoid có hoạt tính chống oxy hóa cao gấp khoảng 10 lần so với các carotenoid khác, như zeaxanthin, lutein, canthaxanthin và  $\beta$ -carotene, và lớn hơn  $\alpha$ -tocopherol hơn 500 lần. Các đặc tính chống oxy hóa của astaxanthin được cho là có vai trò chính trong việc bảo vệ chống lại tia UV, viêm, ung thư, nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori*, lão hóa và thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, tăng cường đáp ứng miễn dịch, chức năng gan, tim, mắt, sức khỏe khớp và tuyến tiền liệt [2], có giá trị cao với các ứng dụng trong dược phẩm dinh dưỡng, mỹ phẩm, các ngành công nghiệp thực phẩm và thức ăn chăn nuôi [3].

Vi tảo lục *H. pluvialis* có hai cơ chế chống oxy hóa chống lại stress oxy hóa môi trường: Các enzym chống oxy hóa trong tế bào sinh dưỡng và ketocarotenoid astaxanthin chống oxy hóa trong tế bào nang [4]. Khả năng chống oxy hóa của phần astaxanthin diester cao hơn 60% so với astaxanthin monoester và hai lần so với astaxanthin tự do [5]. Nghiên cứu gần đây của Klejdus và CS. (2010) cho thấy một số lớp flavonoid như isoflavone, flavanone, flavonol và dihydrochalcone có thể được tìm thấy trong vi tảo và vi khuẩn lam. Carotenoid và các hợp chất phenolic góp phần đáng kể vào khả năng chống oxy hóa của các loài vi tảo [6].

Môi trường và điều kiện nuôi cấy có ảnh hưởng lên sự tích lũy các hợp chất carotenoid, phenolic và khả năng chống oxy hóa của tế bào *H. pluvialis*. Sự tích lũy astaxanthin và các chất chống oxy hóa ở vi tảo *Haematococcus* gây ra bởi các yếu tố môi trường làm hạn chế sự phát triển của tế bào như điều kiện ánh sáng bất lợi, đói phosphor, nitơ, ức chế độ muối và nhiệt độ [7]. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tiềm năng tích lũy các hợp chất carotenoid, phenolic và khả năng chống oxy hóa của vi tảo *H. pluvialis* nuôi cấy ở 4 môi trường BBM, OHM, BG11 và MD4.

---

Chịu trách nhiệm: Võ Hồng Trung  
Email: vohongtrung2503@gmail.com  
Ngày nhận: 11/01/2021  
Ngày phản biện: 24/02/2021  
Ngày duyệt bài: 19/3/2021

## **Nguyên liệu và phương pháp**

### **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.

Để đánh giá hiệu quả tích lũy carotenoid, phenolic và khả năng chống oxy hóa, vi tảo *H. pluvialis* được nuôi cấy trên 4 môi trường BBM [8], OHM [9], BG11 [10] và MD4 [11] với 200 mL dịch môi trường (gồm môi trường mới và dịch tảo) trong các erlen 250 mL đạt mật độ tế bào ban đầu khoảng  $0,3 \times 10^6$  tế bào/mL. Điều kiện nuôi cấy: sục khí liên tục, chiếu sáng với cường độ ánh sáng  $30 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$  và chu kì sáng tối 12:12 giờ, nhiệt độ  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau 21 ngày nuôi cấy tiến hành phân tích hàm lượng carotenoid, phenolic và khả năng chống oxy hóa của tế bào *H. pluvialis*.

### **Các phương pháp nghiên cứu**

#### **Xác định mật độ tế bào *Haematococcus pluvialis***

100  $\mu\text{L}$  mẫu tảo được lấy và cố định bằng lugol. Số lượng tế bào được đếm bằng kính hiển vi quang học (100X) với 10  $\mu\text{L}$  dịch tảo.

#### **Xác định hàm lượng carotenoid**

Lấy 1 mL dịch nuôi cấy, ly tâm ở 13.000 vòng trong 5 phút, bỏ dịch lấy phần cặn tảo bên dưới, thêm 1 mL HCl 4 M vào hòa tan cặn sau đó đem đun cách thủy ở  $70^\circ\text{C}$  trong 2 phút. Thêm 3 mL ethanol: hexan (2:1 v/v), vortex cẩn thận. Thêm vào 4 mL n-hexan, vortex kỹ. Hỗn hợp được ly tâm 3000 vòng trong 5 phút. Lớp sắc tố có hexan bên trên được đọc ở các bước sóng 450, 662, 645 nm. Hàm lượng carotenoid tổng được xác định theo công thức [12]:

$$\text{Carotenoid } (\mu\text{g/mL}) = A_{450} \times 25,2$$

#### **Xác định hàm lượng phenolic**

Lấy 1,0 mL dịch tảo ly tâm 12.000 vòng trong 05 phút, loại bỏ dịch. Thêm 1 mL methanol tuyệt đối vào cặn, trộn đều. Ly tâm 10.000 vòng trong 5 phút, bỏ cặn thu được dịch chiết. Lấy 0,5 mL dịch chiết cho vào ống eppendorf 2 mL, cho thêm 0,5 mL thuốc thử folin ciocalteu's phenol, tiếp tục cho từ từ 0,5 mL dung dịch  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%.

Ủ 90 phút trong tối. Đo quang ở bước sóng 750 nm [6]. Đường chuẩn phenolic: Sử dụng nồng độ acid gallic chuẩn 10 đến 200 mg/L và xác định nồng độ phenolic trong mẫu *H. pluvialis* bằng phương trình:  $y = 30,263x - 0,0638$ ;  $R^2 = 0,9948$ .

#### **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.

Lấy 1,0 mL dung dịch tảo ly tâm 12.000 vòng trong 5 phút, loại bỏ dịch. Thêm 1 mL ethanol tuyệt đối vào cặn, trộn đều và ủ 4 tiếng ở  $4^\circ\text{C}$ . Ly tâm 10.000 vòng trong 5 phút, bỏ cặn lấy dịch chiết. Lấy 0,5 mL dịch chiết cho vào ống 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 517 nm. Khả năng chống oxy hóa (I%) được tính dựa trên khả năng khử gốc tự do của DPPH theo công thức sau [13]:

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

#### **Xử lí số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lí bằng Microsoft office Excel và phân tích oneway ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với độ tin cậy 95%. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình (Mean)  $\pm$  Sai số chuẩn (SE).

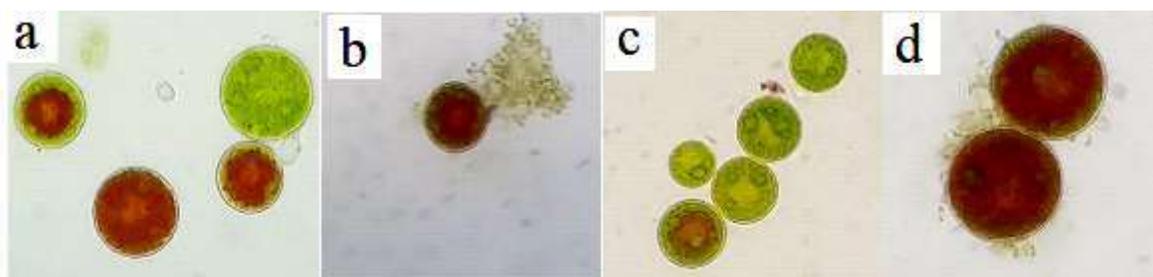
### **Kết quả và bàn luận**

#### **Hàm lượng carotenoid của *H. pluvialis***

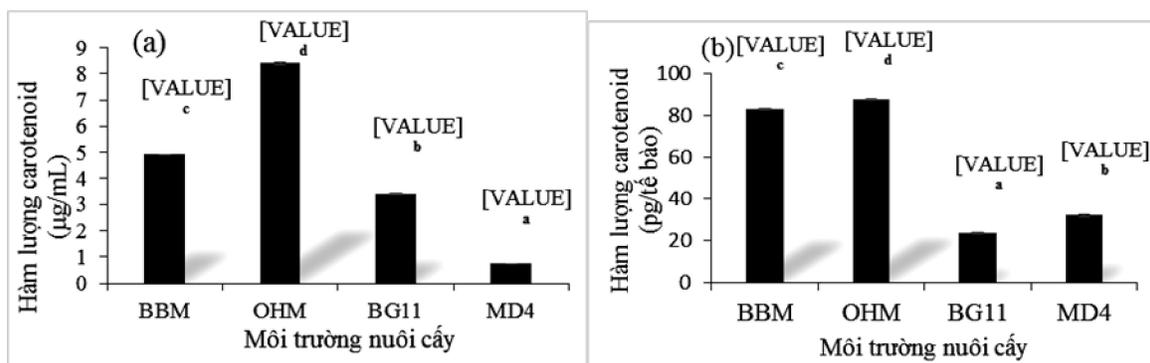
Ở môi trường BBM và OHM, hàm lượng carotenoid của *H. pluvialis* đạt giá trị cao hơn môi trường BG11, MD4. Trong đó, vi tảo nuôi cấy trên môi trường OHM tích lũy carotenoid cao hơn so với các môi trường còn lại ( $p < 0,05$ ) (hình 2). Kết quả cho thấy các tế bào *H. pluvialis* nuôi cấy ở môi trường BBM, OHM và MD4 tế bào chuyển màu cam đỏ toàn bộ tế bào, tế bào còn màu xanh ở môi trường BG11. Tuy nhiên, ở môi trường MD4 mật độ tế bào thấp nên dẫn đến hàm lượng carotenoid thấp (hình 1). Thành phần dinh dưỡng trong môi trường đặc biệt là nitơ và phosphor là yếu tố quan trọng ảnh hưởng lên sự tích lũy carotenoid của tế bào

*H. pluvialis*. Theo Collins và CS. (2011) các tế bào *H. pluvialis* trong điều kiện nuôi cấy hạn chế nitrate, sau 24 giờ carotenoid được hình thành tạo thành một vùng đỏ ở trung tâm tế bào, sau 5 ngày tế bào chuyển sang dạng bào tử, vùng màu đỏ lan rộng và chiếm cả tế bào. Carotenoid được xác định trong các tế bào *H. pluvialis* chủ yếu là astaxanthin [14]. Nguồn nitrat dồi dào trong môi trường BG11 (1500 mg/L) giúp kéo dài

giai đoạn tăng trưởng sinh dưỡng của *H. pluvialis*. Trong khi đó, môi trường MD4 thành phần dinh dưỡng đa lượng trong môi trường thấp, tế bào chuyển sang giai đoạn bào tử và tích lũy astaxanthin sớm. Vì vậy ở hai môi trường BG11 và MD4 tế bào *H. pluvialis* đạt hàm lượng carotenoid thấp. Môi trường OHM phù hợp cho nuôi cấy tích lũy carotenoid của *H. pluvialis*.



**Hình 1.** Hình thái tế bào *H. pluvialis* nuôi cấy trên môi trường BBM (a), OHM (b), BG11 (c) và MD4 (d)

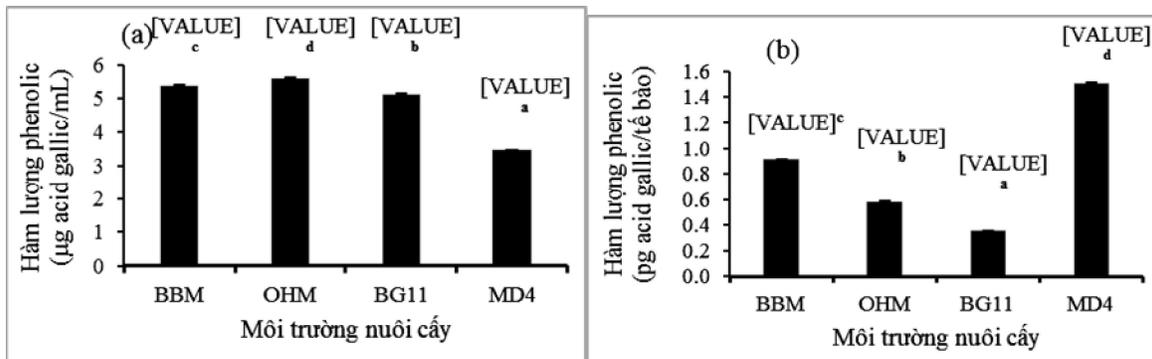


**Hình 2.** Hàm lượng carotenoid trên thể tích (µg/mL)(a), trên tế bào (pg/tế bào)(b) của vi tảo *Haematococcus pluvialis*

### Hàm lượng phenolic của *H. pluvialis*

Hàm lượng phenolic của vi tảo *H. pluvialis* được thể hiện ở hình 3. Hàm lượng phenolic trên đơn vị thể tích (µg/mL) đạt giá trị cao khi nuôi cấy ở các môi trường BBM, OHM và BG11. Trong đó, môi trường OHM *H. pluvialis* tích lũy các hợp chất phenolic cao nhất ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, hàm lượng phenolic trên tế bào (pg/tế bào) ở môi trường MD4 đạt giá trị cao nhất do trong môi trường MD4 mật độ tế bào thấp, tế bào chuyển dạng

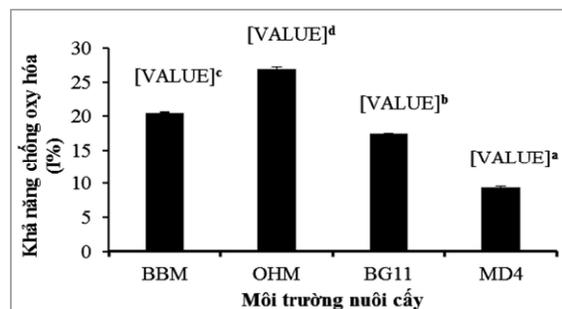
bào tử màu đỏ cam tổng hợp astaxanthin nhanh hơn các môi trường còn lại (hình 1). Các hợp chất phenolic là một trong những loại chất chống oxy hóa tự nhiên quan trọng nhất và ngày càng nhận được sự quan tâm của người tiêu dùng cũng như các nhà sản xuất thực phẩm vì lợi ích sức khỏe của chúng. Hàm lượng phenolic chứa trong các hạt oleoresin của tế bào *H. pluvialis* khoảng 74,08 mg acid gallic/g cao hơn so với kết quả dịch chiết trực tiếp từ tế bào vi tảo [15].



**Hình 3.** Hàm lượng phenolic tổng trên thể tích (µg/mL)(a), trên tế bào (pg/tế bào)(b) của *Haematococcus pluvialis*

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

Khả năng chống oxy hóa (%) của *H. pluvialis* nuôi cấy ở môi trường OHM cao hơn so với ở môi trường BBM, BG11 và MD4 ( $p < 0,05$ ). Kết quả cho thấy khả năng chống oxy hóa của *H. pluvialis* tương quan dương với hàm lượng carotenoid và phenolic. Kết quả cho thấy khả năng chống oxy hóa của *H. pluvialis* tương quan dương với hàm lượng carotenoid và phenolic. *H. pluvialis* là một vi tảo tích lũy lượng lớn astaxanthin, chất có hoạt tính chống oxy hóa cao. Theo Cerón và CS. (2006), hoạt tính chống oxy hóa là chức năng của cả carotenoid và acid béo, hoạt tính chống oxy hóa của astaxanthin diester cao hơn 60% so với astaxanthin monoester và gấp đôi astaxanthin tự do. Các tế bào *H. pluvialis* có màu đỏ tích lũy nhiều astaxanthin có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn tế bào màu xanh ở giai đoạn tăng trưởng sinh dưỡng [16]. Như vậy vi tảo *H. pluvialis* tích lũy các hợp chất chống oxy hóa cao khi được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy OHM và thấp ở các môi trường BBM, BG11 và MD4.



**Hình 4.** Khả năng chống oxy hóa trên thể tích (µg/mL)(a), trên tế bào (pg/tb)(b) của *H. pluvialis* trên các môi trường nuôi cấy

#### Kết luận

Vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* có tiềm năng tích lũy các hợp chất chống oxy hóa carotenoid và phenolic khi nuôi cấy trên các môi trường BBM, OHM, BG11 và MD4. Trong đó, môi trường OHM thích hợp cho *H. pluvialis* tích lũy các hợp chất chống oxy hóa hơn môi trường BBM, BG11 và MD4. Khả năng chống oxy hóa của *H. pluvialis* có mối tương quan dương với hàm lượng carotenoid và phenolic khi nuôi cấy trên các môi trường nuôi cấy khác nhau.

#### Tài liệu tham khảo

1. Shah M. et al. (2016), "Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products", 7, pp. 531.
2. Sarada R. et al. (2006), "An efficient method for extraction of astaxanthin from green

- alga *Haematococcus pluvialis*", *J. Agric Food Chem.*, 54 (20), pp. 7585-7588.
3. Olaizola, M. (2000), "Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000 - liter outdoor photobioreactors", *Journal of Applied Phycology*, 12 (3 - 5), pp. 499-506.
  4. Kobayashi M. et al. (1997), "Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48 (3), pp. 351-356.
  5. Ceron M. C. et al. (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), pp. 1112-1119.
  6. Goiris K. et al. (2012), "Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content", *Journal of Applied Phycology*, 24 (6), pp. 1477-1486.
  7. Boussiba S. (2000), "Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response", *Physiologia Plantarum*, 108 (2), pp. 111-117.
  8. Ilavarasi A. et al. (2011), "Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production", *Biotechnology*, 10 (6), pp. 540-545.
  9. Fábregas J. et al. (2001), "Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*", *J. Biotechnol.*, 89 (1), pp. 65-71.
  10. Andersen R. A. (2005), *Algal Culturing Techniques*, Academic Press. pp. 596.
  11. Tran D. et al. (2014), "Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30 (1), pp. 317-322.
  12. Prieto A., J. Pedro Canavate and M. Garcia - Gonzalez (2011), "Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes", *J. Biotechnol.*, 151 (2), pp. 180-185.
  13. Albayrak S. et al. (2010), "Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey", *Food Chemistry*, 119 (1), pp. 114-122.
  14. Collins A. M. et al. (2011), "Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis*, Chlorophyceae", *PLoS One*, 6 (9), e24302.
  15. Ruiz - Domínguez M. C. et al. (2019), "Determining the potential of *Haematococcus pluvialis* oleoresin as a rich source of antioxidants", *Molecules*, 24 (22), pp. 4073.
  16. Cerón M. C. et al. (2007), "Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (5), pp. 1112.