

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CAROTENOID CỦA *Rhodospiridium paludigenum* ĐƯỢC NUÔI CẤY TRONG MÔI TRƯỜNG CÓ DỊCH CHIẾT TỪ VỎ DỨA

Nguyễn Minh Lý*, Lê Thị Mai

Khoa Sinh-Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: nmly@ued.udn.vn

Nhận bài: 08/01/2023 Hoàn thành phân biên: 09/02/2023 Chấp nhận bài: 10/02/2023

TÓM TẮT

Carotenoid là họ sắc tố có vai trò quan trọng đối với đời sống con người và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, y dược, công nghiệp. Tuy nhiên, việc sản xuất carotenoid từ các môi trường thương mại còn có giá thành cao. Trong nghiên cứu này đã tiến hành đánh giá nghiên cứu khả năng sử dụng vỏ dứa để sản xuất carotenoid từ nấm men *Rhodospiridium paludigenum*. Kết quả cho thấy, dịch chiết từ vỏ dứa có thể thay thế hoàn toàn môi trường Hansen trong sản xuất carotenoid. Hàm lượng carotenoid đạt giá trị cao nhất là $1,332 \pm 0,006$ mg/g và $6,362 \pm 0,539$ mg/L. Bên cạnh đó, dịch chiết thu được từ chủng *R. paludigenum* có hoạt tính kháng oxy khá mạnh đạt $93,52 \pm 0,31\%$ và đồng thời có khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Salmonella* sp.

Từ khóa: Carotenoid, Kháng khuẩn, *Rhodospiridium paludigenum*, Sắc tố, Vỏ dứa

EFFECT OF SOME FACTORS ON CAROTENOID PRODUCTION BY *Rhodospiridium paludigenum* CULTURED ON MEDIUM CONTAINING PINEAPPLE PEEL EXTRACT

Nguyen Minh Ly*, Le Thi Mai

Faculty of Biology and Environmental Science, University of Danang – University of Science and Education

ABSTRACT

Carotenoids are pigments playing crucial roles in human life and are applied in many fields, such as food, medicine, and industry. However, the commercial production of carotenoids is still expensive at present. In this study, we investigated the possibility of *Rhodospiridium paludigenum* for producing carotenoids from pineapple peel. The results showed that the pineapple peel extract could replace the Hansen medium in the production of carotenoids. The highest carotenoid content was 1.332 ± 0.006 mg/g and 6.362 ± 0.539 mg/L. In addition, the extract obtained from *R. paludigenum* had highly antioxidant activity ($93.52 \pm 0.31\%$) and was found to be more effective against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella* sp.

Keywords: Antibacterial, Carotenoids, Pigment, Pineapple peel, *Rhodospiridium paludigenum*

1. MỞ ĐẦU

Carotenoid là một trong những loại sắc tố đóng vai trò quan trọng trong đời sống con người. Carotenoid được sử dụng như tiền chất vitamin A dùng trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, thuốc nhuộm tự nhiên, chất chống oxy hóa và có thể hoạt tính ức chế khối u (Baker và Guenther, 2004; Frengova và Beshkova, 2009). Mặc

dù đã có nhiều loại carotenoid tự nhiên và tổng hợp, nhưng carotenoid được khai thác từ vi sinh vật vẫn đang thu hút được nhiều sự chú ý trong những năm gần đây (Kaczor và Baranska, 2016). Đặc biệt, nấm men đỏ là một nhóm các loài nấm men có khả năng tổng hợp các sắc tố carotenoid bao gồm β -carotene, torulene và thorularodin tạo màu cho khuẩn lạc như màu vàng, cam và đỏ.

Trong số các loại nấm men đỏ sản xuất carotenoid thì *Rhodospiridium* sp. được đánh giá có ưu thế cao để có thể tổng hợp hiệu quả các phân tử này với hàm lượng cao và khả năng sinh trưởng nhanh (Bonadio và cs., 2018).

Ở hầu hết nấm men, con đường sinh tổng hợp carotenoid đều có sự biến đổi acetyl - CoA thành 3 - hydroxymethyl glutaryl - CoA (HMG-CoA) bởi HMG - CoA synthase. HMG - CoA sẽ chuyển đổi thành hợp chất C₆, mevalonic acid (MVA), tiền chất đặc biệt đầu tiên của con đường sinh tổng hợp terpenoid. MVA trải qua một chuỗi các phản ứng phosphoryl hóa bởi enzyme MVA kinase đồng thời bị decarboxyl hóa để tạo thành isopentenyl pyrophosphate (IPP). IPP biến đổi đồng phân thành dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) bằng cách gắn liên tiếp 3 phân tử IPP tạo thành DMAPP. Các phản ứng này được xúc tác bởi prenyl transferase tạo thành hợp chất C₂₀ geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP). Sự trùng hợp 2 phân tử GGPP tạo ra phytoene (hợp chất C₄₀ đầu tiên của quy trình). Cuối cùng là giai đoạn tổng hợp carotenoid từ phytoene, phytoene được chuyển thành lycopene. Lycopene được xem là tiền chất để tổng hợp nên β-carotene và torulene, sau đó torulene sẽ tham gia quá trình khử và oxy hoá nhờ sự xúc tác của enzyme oxidase để hình thành nên torularhodin (Igreja và cs., 2021). Các yếu tố dinh dưỡng (nguồn carbon, nitơ, vitamin,...) và vật lý (nhiệt độ, pH, oxy, ánh sáng,...) cũng ảnh hưởng đến sự phát triển tế bào và biểu hiện gen carotenogenesis hay quá trình sinh tổng hợp sắc tố.

Nấm men có thể tổng hợp carotenoid khi được nuôi cấy trong môi trường thương mại, chứa nhiều nguồn carbon tinh chế khác nhau, chẳng hạn như glucose, xylose, cellobiose, sucrose, glycerol và sorbitol, tuy nhiên loại môi trường này có chi phí cao.

Một số loại chất nền chi phí thấp hơn đã được nghiên cứu để sản xuất carotenoid bởi nấm men đỏ, chẳng hạn như nước mía, váng sữa, rỉ đường, rượu ngô (Galal và Ahmed, 2020). Chất thải từ trái cây là chất nền tiềm năng để sản xuất carotenoid vi sinh vật do chứa nhiều carbon và khoáng chất. Hơn nữa, vỏ trái cây cũng chứa các tiền chất carotenoid bao gồm geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) liên quan đến quá trình sinh tổng hợp carotenoid theo con đường methyl - D - erythritol - 4 - phosphate (MEP) (Loto và cs., 2012). Nhằm tìm kiếm môi trường thích hợp, tối ưu chi phí cũng như tận dụng nguồn chất thải hữu cơ có sẵn để sản xuất carotenoid, chúng tôi tiến hành nghiên cứu hiệu quả của việc sử dụng dịch chiết từ vỏ dứa để tổng hợp carotenoid bằng loài nấm men *R. paludigenum*. Đồng thời khảo sát ảnh hưởng một số yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp carotenoid của loài *R. paludigenum* được nuôi cấy trong môi trường có chứa dịch chiết từ vỏ dứa.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng nấm men *R. paludigenum* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh thuộc Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng.

Chất nền: Vỏ dứa được đun ở 100°C trong 30 phút theo tỉ lệ 1:1 (vỏ dứa : nước cất). Dịch chiết được lọc bằng màng lọc có kích thước lỗ 100 μm và được sử dụng làm môi trường lên men (Singh và cs., 2018).

2.2. Phương pháp

Phương pháp hoạt hóa và tăng sinh :

Nấm men *R. paludigenum* đã được giữ giống trong môi trường Hansen chứa 50% glycerol, bảo quản ở -20°C. Hoạt hóa bằng cách cấy ria trên môi trường Hansen và nuôi ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Từ

các khuẩn lạc đơn thu được trên đĩa thạch, chọn một khuẩn lạc đơn cho vào nuôi cấy trong bình thủy tinh tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường Hansen. Tiến hành nuôi cấy lắc ở 28°C, trong 24 giờ.

Tổng hợp carotenoid bằng nấm men R. paludigenum: Bổ sung 1 mL dịch nuôi cấy nấm men (10^6 tế bào/mL) vào các bình tam giác (thể tích 250 mL) có chứa 50 ml dịch chiết vỏ dứa theo 3 nghiệm thức khác nhau với pH = 6 và ủ ở 25°C, trong máy lắc ủ nhiệt với tốc độ lắc 120 vòng/phút trong 6 ngày. Thành phần của các nghiệm thức cụ thể như sau: nghiệm thức 1 (NT1) chỉ chứa dịch chiết vỏ dứa; nghiệm thức 2 (NT2) bao gồm dịch chiết vỏ dứa + 3 g/L KH_2PO_4 , 3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L peptone; nghiệm thức 3 (NT3) - 50 mL môi trường Hansen lỏng (50 g/L D-glucose + 3 g/L KH_2PO_4 , 3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L peptone). Kết thúc thí nghiệm tiến hành đánh giá các chỉ tiêu: sinh khối khô của nấm men, hàm lượng carotenoid, hàm lượng đường khử (Warjoto và cs., 2020).

Ảnh hưởng của pH (4, 5, 6, 7), nhiệt độ (20°C, 25°C, 30°C, 35°C), thời gian ủ (5, 6, 7, 8 ngày) cũng đã được tiến hành với các chỉ tiêu đánh giá sinh khối khô nấm men, hàm lượng carotenoid.

Tách chiết và định lượng carotenoid: Dịch nuôi cấy lỏng được ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút để thu kết tủa. Phần dịch nổi phía trên được giữ lại để xác định nồng độ đường khử. Kết tủa được rửa 2 lần bằng nước cất và đem sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi. Carotenoid được tách chiết từ sinh khối khô bằng cách sử dụng Dimethyl sulfoxide (DMSO) và acetone (Rodriguez – Amaya và cs., 2008; Fonseca và cs., 2011). Bổ sung 0,2 g sinh khối vào 3 mL DMSO và ủ trong 1 giờ, vortex trong 3 phút. Sau đó, bổ sung thêm 6 mL acetone, ly tâm ở 1800 vòng ở 25°C trong 10 phút. Thu dịch nổi (lặp lại 2-3 lần đến khi các tế

bào mất màu). Thu và gộp tất cả dịch chiết acetone và dịch nổi chứa DMSO. Thêm 10 mL NaCl 20% (w/v) và 10 mL Petroleum ether (PE). Sau khi khuấy và tách pha, lượng nước thừa được loại bỏ bằng Na_2SO_4 để thu được carotenoid. Thu dịch nổi sắc tố trong pha PE.

Tổng nồng độ carotenoid được xác định bằng phép đo quang phổ (Biospectro, SP 220, Trung Quốc) ở bước sóng 474 nm. Hàm lượng carotenoid trên 1 g sinh khối nấm men khô (mg/g) tính theo phương trình: $C = \frac{100AV}{21m}$, trong đó C- Hàm lượng carotenoid (mg/g); A- Độ hấp thụ của dịch chiết sắc tố trong dung môi PE ở bước sóng 474 nm (2100 mol/L/cm) (5); V- Thể tích dịch chiết sắc tố (mL); m- Sinh khối khô nấm men dùng để chiết (g).

Hàm lượng sắc tố tính trên thể tích dịch nuôi cấy nấm men ($\mu\text{g/L}$) tính theo công thức: $T = C \cdot m$, trong đó, T- Hàm lượng carotenoid tính trên thể tích dịch nuôi cấy (mg/L); C- Hàm lượng carotenoid tính trên gam sinh khối khô (mg/g); m- Sinh khối khô tính trên 1 lít dịch nuôi cấy (g/L).

Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá: Hoạt động loại bỏ gốc tự do được xác định bằng phương pháp khử màu ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) được mô tả bởi Re và cs. (1999). Dung dịch ABTS⁺ được chuẩn bị bằng cách cho 10 mL dung dịch ABTS 7 mM và 10 mL dung dịch $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2,45 mM. Ủ dung dịch trong tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol, điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm có mật độ quang là $0,7 \pm 0,05$. Tiến hành khảo sát hoạt động trung hòa gốc tự do ABTS⁺ bằng cách cho 10 μL dịch chiết carotenoid vào 990 μL ABTS⁺. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 6 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm. Kết quả so sánh với Vitamin C. Phần trăm bắt gốc tự do

được tính theo công thức: $[100*(A-B)]/A$, trong đó: A- giá trị OD₇₃₄ của mẫu đối chứng (thay mẫu bằng dung dịch đệm); B- giá trị OD₇₃₄ của mẫu.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn: Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Samonella typhirinum* 13.100816 cung cấp bởi khoa Y - Dược, Đại học Đà Nẵng.

Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát bằng phương pháp đục lỗ thạch. Carotenoid được hòa tan trong DMSO. Đối chứng âm được sử dụng là DMSO, đối chứng dương là chất kháng sinh tetracyclin. Hút 100 µL chất thử nghiệm cho vào lỗ thạch và ủ các đĩa petri trong 24 giờ ở 37°C. Quan sát kết quả dựa vào vòng vô khuẩn.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu: Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình. Các số liệu được xử lý và xác định ý nghĩa thống kê bằng phần mềm xử lý số liệu SPSS 22.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của dịch chiết từ vỏ dừa đến khả năng sản xuất carotenoid bởi *R. paludigenum*

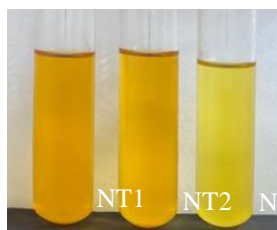
Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch chiết vỏ dừa có thể được sử dụng như chất nền cho vi khuẩn *R. paludigenum* tổng hợp carotenoid (Hình 1 và Hình 2). Sinh khối khô của nấm men sau khi nuôi cấy với môi trường có bổ sung dịch chiết vỏ dừa đạt cao

hơn so với môi trường Hansen lỏng (NT3). Tuy nhiên, chưa nhận thấy sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa NT1 và NT2 (Bảng 1).

Kết quả cho thấy rằng, từ NT1 đã thu được hàm lượng carotenoid cao nhất đạt $1,287 \pm 0,037$ mg/g và $0,448 \pm 0,284$ mg/L. Sau đó, hàm lượng giảm dần trong NT2 và NT3. Kết quả thấp nhất là $0,412 \pm 0,004$ mg/g và $1,249 \pm 0,012$ mg/L ở nghiệm thức 3. Kết quả này cũng tương đồng với dữ liệu của Cheng & Yang (2016) đã thu được, khi hàm lượng carotenoid tạo ra trong môi trường có bổ sung ri đường cao hơn so với môi trường tổng hợp YM (yeast extract 3 g, malt extract 3 g, dextrose 10 g, peptone 5 g, agar 20 g). Tuy nhiên, hàm lượng carotenoid được tạo ra trong lên men từ dịch chiết vỏ dừa trong nghiên cứu này cao hơn so với từ ri đường (2,611 mg/L). Trong nghiên cứu của Buzzini & Martin (2000) đã sử dụng nho làm chất nền để sản xuất sắc tố bằng *R. glutinis* DBVPG 6439 và thu được hàm lượng carotenoid là 5,95 mg/L, cao hơn gần 1,33 lần so với nghiên cứu của chúng tôi. Trong nghiên cứu tương tự với bã mía làm chất nền chính, Silva và cs. (2021) thu được hàm lượng carotenoid là 0,18 mg/g, thấp hơn kết quả từ vỏ dừa đến 7,2 lần. Như vậy có thể thấy sử dụng dịch chiết từ vỏ dừa cho phép tổng hợp carotenoid với hàm lượng cao gần như dịch chiết nho và cao hơn so với ri đường, bã mía.



Hình 1. Sinh khối lỏng của *R. paludigenum* ở NT1, NT2, NT3 khi tiến hành nuôi cấy ở mật độ ban đầu 10^6 tế bào/ml và lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 25°C trong 6 ngày



Hình 2. Dịch chiết carotenoid của *R. paludigenum* ở NT1, NT2, NT3

Bảng 1. Sinh khối nấm men khô, hàm lượng carotenoid của chủng *R. paludigenum*

Nghiệm thức	Sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng carotenoid	
		mg/g	mg/L
NT1	3,48±0,20 ^b	1,287±0,037 ^c	4,482±0,284 ^c
NT2	3,39±0,07 ^b	1,099±0,007 ^b	3,714±0,073 ^b
NT3	2,71±0,35 ^a	0,413±0,004 ^a	1,249±0,012 ^a

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ (Duncan test).

NT1- dịch chiết vỏ dứa; NT2- dịch chiết vỏ dứa, 3 g/L KH_2PO_4 , 3 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g/L peptone; NT3- môi trường Hansen lỏng (50 g/L D-glucose, 3 g/L KH_2PO_4 , 3 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g/L peptone).

3.2. Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp carotenoid của *R. paludigenum* từ dịch chiết vỏ dứa

3.2.1. Ảnh hưởng của pH

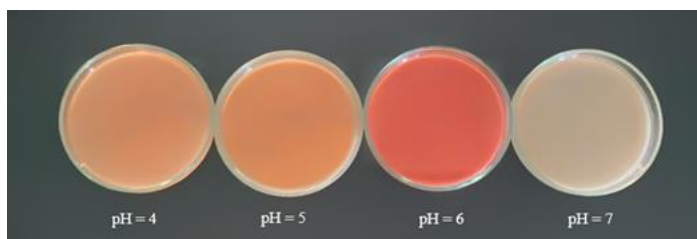
Dịch chiết từ vỏ dứa có pH thay đổi từ 4 đến 7 khi chỉnh bởi NaOH 1N và HCl 1N được cấy giống nấm men với mật độ 10^6 tế bào/ml và tiến hành nuôi cấy lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 25°C trong 6 ngày. Kết quả thu được cho thấy giá trị pH của môi trường dịch chiết vỏ dứa có ảnh hưởng đến

sinh khối và hàm lượng carotenoid của loài *R. paludigenum* (Hình 3 và Hình 4). Tại các điều kiện nuôi cấy có pH môi trường là 4,0; 5,0; 6,0 và 7,0; chủng *R. paludigenum* có khả năng sinh trưởng và tổng hợp carotenoid. Trong đó, sự gia tăng sinh khối khô và hàm lượng carotenoid cao nhất được quan sát thấy ở môi trường nuôi cấy có pH 6,0 lần lượt là $3,74 \pm 0,21$ g/L và $4,568 \pm 0,085$ mg/L. Giá trị hàm lượng carotenoid thấp nhất thu được ở môi trường là pH 7,0 ($1,95 \pm 0,5$ g/L; $0,984 \pm 0,012$ mg/L) (Bảng 2).

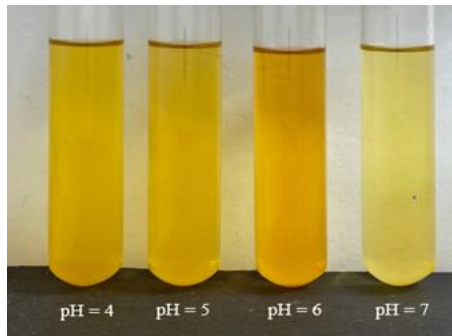
Bảng 2. Sinh khối khô, hàm lượng carotenoid của loài nấm men *R. paludigenum* ở các điều kiện pH của môi trường khác nhau

pH	Sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng carotenoid	
		mg/g	mg/L
4	2,16±0,52 ^a	0,754±0,004 ^b	1,990±0,050 ^b
5	2,64±0,11 ^b	1,160±0,007 ^c	2,506±0,047 ^c
6	3,74±0,21 ^c	1,222±0,008 ^d	4,568±0,085 ^d
7	1,95±0,50 ^a	0,506±0,002 ^a	0,984±0,012 ^a

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$. (Duncan test)



Hình 3. Sinh khối nấm men *R. paludigenum* thu được ở các mức pH môi trường 4, 5, 6, 7. Lượng sinh khối nấm men tương ứng với màu của đĩa môi trường. Màu đỏ tương: lượng sinh khối cao, màu cam: lượng sinh khối trung bình, màu cam nhạt: lượng sinh khối thấp.



Hình 4. Dịch chiết carotenoid của loài *R. paludigenum* ở các mức pH môi trường 4, 5, 6, 7.

Kết quả trên tương đồng với nghiên cứu của Warjoto và cs. (2020). Hàm lượng carotenoid cao nhất thu được ở nhóm xử lý IV (107,63 µg/g) với pH ban đầu là 6 và không bổ sung urê trong môi trường. Silva và cs. (2021) thấy rằng sinh khối khô và hàm lượng carotenoid cao nhất đã được tìm thấy đối với loài *R. minuta* ở pH = 6,5 và *R. mucilaginoso* ở pH = 6 với hàm lượng lần lượt là 28±0,01 mg/L; 72,8±0,026 µg/g và 37±0,002 mg/L; 236,8±0,013 µg/g. Nghiên cứu của Tarangini và cs. (2014) cho rằng pH khác nhau, sự tăng trưởng sinh khối của *R. rubra* được xác định ở pH môi trường từ 5 đến 9 và sản xuất sắc tố đã được quan sát chỉ ở mức pH môi trường là 6 và 7.

Kết quả cho thấy rằng sản xuất sắc tố từ dịch chiết vỏ dừa bởi loài *R. paludigenum* phụ thuộc nhiều vào pH môi trường nuôi cấy. *R. paludigenum* thích ứng với môi trường acid yếu, ở các giá trị pH rất thấp, hoặc cao sẽ ức chế sự phát triển của nấm men cũng như khả năng sinh tổng hợp carotenoid. Các kết quả trước đó của Allahkarami và cs. (2021) cho rằng pH kiềm hoạt động như một tác nhân gây stress và làm thay đổi tốc độ trao đổi chất và hấp

thụ chất dinh dưỡng dẫn đến tăng cường hoạt động các gen chuyển hóa glucose của tế bào và do đó tăng cường tổng hợp polysaccharide thay vì carotenoid. Trong điều kiện pH ban đầu là 4, có sự giảm đáng kể sinh khối được tạo ra. Ở pH thấp tế bào nấm men buộc phải tổng hợp carotenoid nhưng do sinh khối thấp nên hàm lượng carotenoid bị giảm (Cheng và cs., 2016). Vì vậy, giá trị pH môi trường là 6 được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.

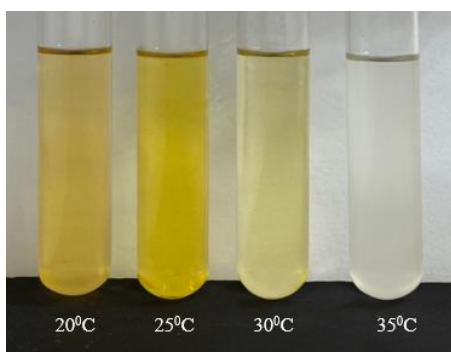
3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Tiến hành khảo sát các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau với chế độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 25°C trong 6 ngày để tìm ra nhiệt độ thích hợp nhất cho quá trình sản xuất carotenoid của loài *R. paludigenum*. Kết quả cho thấy *R. paludigenum* đều sinh trưởng và sản xuất carotenoid ở tất cả các mức nhiệt độ khảo sát (Hình 5). Tuy nhiên, nhiệt độ thích hợp để sản xuất sinh khối và carotenoid của *R. paludigenum* là 25°C lần lượt đạt được là 4,00±0,15 g/L và 5,033±0,063 µg/L. Ở nhiệt độ 35°C sinh khối và hàm lượng carotenoid là thấp nhất chỉ ở mức là 0,61±0,01 g/L và 0,362±0,005 µg/L (Bảng 3).

Bảng 3. Sinh khối khô, hàm lượng carotenoid ở các mức nhiệt độ nuôi cấy của *R. paludigenum*

Nhiệt độ (°C)	Sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng carotenoid	
		mg/g	mg/L
20	1,43±0,04 ^b	1,216±0,002 ^c	1,096±0,019 ^b
25	4,00±0,15 ^d	1,271±0,013 ^d	5,033±0,063 ^c
30	1,99±0,26 ^c	0,674±0,002 ^b	1,342±0,092 ^b
35	0,61±0,01 ^a	0,589±0,001 ^a	0,362±0,005 ^a

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0.05$ (Duncan test)



Hình 5. Dịch chiết carotenoid của loài *R. paludigenum* ở các mức nhiệt độ nuôi cấy khác nhau. Những kết quả này cao hơn gấp 2 lần so với kết quả của Cheng và Yang (2016). Hàm lượng carotenoid theo báo cáo cũng cao nhất ở 25°C nhưng chỉ đạt 2,506 mg/L. Hàm lượng carotenoid thấp nhất là 1,630 mg/L ở 31°C. Nhiệt độ cao không có lợi cho quá trình tổng hợp β -carotene và torulene nhưng thích hợp cho torularhodin (Cheng và cs., 2016). Chandi và cs. (2011) lý giải rằng, nhiệt độ trên 30°C có thể gây ra sự biến tính của các enzyme liên quan đến quá trình tạo carotenoid.

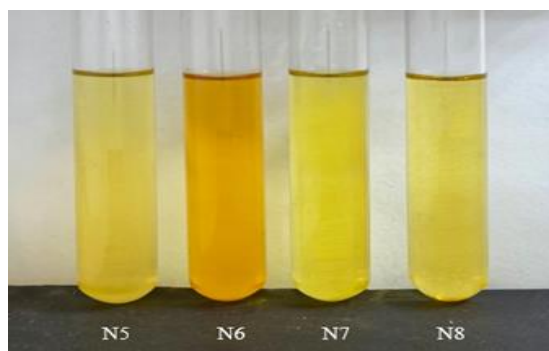
3.3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Qua kết quả khảo sát nhận thấy hàm lượng carotenoid của *R. paludigenum* đạt tối đa sau 6 ngày nuôi cấy, với hàm lượng là $1,332 \pm 0,006$ gần với giai đoạn suy vong khi sinh khối bắt đầu giảm sau đó (Bảng 4, Hình 6). Điều này có thể giải thích, khi vào pha suy vong do thiếu chất dinh dưỡng, do các chất độc hại hoặc do các lysosome của tế bào giải phóng làm phân hủy các tế bào chết dẫn tới sinh khối giảm.

Bảng 4. Sinh khối khô, hàm lượng carotenoid ở các mức thời gian nuôi cấy khác nhau từ *R. paludigenum*

Thời gian nuôi cấy (ngày)	Sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng carotenoid	
		mg/g	mg/L
5	$2,92 \pm 0,05^b$	$0,979 \pm 0,004^b$	$2,859 \pm 0,039^b$
6	$4,78 \pm 0,41^c$	$1,332 \pm 0,006^d$	$6,362 \pm 0,539^c$
7	$3,21 \pm 0,01^b$	$1,126 \pm 0,003^c$	$3,617 \pm 0,011^b$
8	$2,06 \pm 0,10^a$	$0,942 \pm 0,002^a$	$1,940 \pm 0,100^a$

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.



Hình 6. Dịch chiết carotenoid của chủng *R. paludigenum* ở các mức thời gian nuôi cấy

Kết quả này tương đồng với báo cáo về sản xuất caroten bằng *R. toruloides* được nuôi cấy trong môi trường chiết xuất từ chất thải rau (Singh và cs., 2018). Trong giai đoạn tăng trưởng ban đầu, không quan sát thấy sản xuất carotenoid trong môi trường chiết từ chất thải rau hoặc môi trường cơ sở (glucose 5 g/L; Na₂HPO₄ 6 g/L; NaCl 5 g/L; KH₂PO₄ 3 g/L; NH₄Cl 2 g/L; MgSO₄ 0,1 g/L; chiết xuất nấm men 2 g/L; thạch 1,6% (w/v); pH 5,5) vì nó là chất chuyển hóa thứ cấp. Sau 45 giờ nuôi cấy, quá trình sản xuất carotenoid bắt đầu khi quá trình nuôi cấy đạt đến giai đoạn tăng trưởng tĩnh. Sản xuất carotenoid tối đa được quan sát thấy sau 72 giờ và 100 giờ tăng trưởng ở môi trường nuôi cấy được chiết xuất từ chất thải thực vật và môi trường cơ sở tương ứng là $62 \pm 1,70$ mg/L và $57 \pm 2,18$ mg/L. Theo Lee và cs. (2014) những thay đổi về trao đổi chất ở *R. toruloides* trong các giai đoạn tăng trưởng khác nhau, tức là giai đoạn logarit hoặc mũ (ngày 1 và 4), pha tĩnh (ngày 7) và pha tĩnh muộn (ngày 12). Trong giai đoạn cuối tĩnh, phần lớn dòng chuyển hóa từ acetyl-CoA hướng đến quá trình sinh tổng hợp acid béo và carotenoid, chứ không phải là chu trình acid tricarboxylic (TCA) và con đường chuyển hóa amino acid. Tuy nhiên, sự biểu hiện của carotenoid như là chất chuyển hóa thứ cấp có thể được điều chỉnh bởi các cơ chế phân tử khác nhau có thể dẫn đến các kết quả đa dạng có thể xảy ra trong

một số điều kiện nhất định (Warjoto và cs., 2020).

3.3. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn của carotenoid được tổng hợp bởi *R. paludigenum* lên men từ dịch chiết vỏ dừa

3.3.1. Khả năng bắt gốc tự do ABTS

Gốc tự do là các nguyên tử hoặc phân tử có lớp quỹ đạo ngoài cùng chứa một điện tử đơn lẻ. Do vậy, các gốc tự do có khả năng oxy hóa rất cao. Các chất chống oxy hóa sẽ cho đi một electron mà gốc tự do cần để tạo nên nguyên tử bền vững, từ đó làm giảm khả năng phản ứng với những nguyên tử/phân tử khác. Điều đặc biệt là chất chống oxy hóa vẫn giữ được tính ổn định của chúng sau khi cho bớt một điện tử mà không trở thành gốc tự do mới.

Hoạt động chống oxy hóa của một hoạt chất bất kỳ phụ thuộc vào khá nhiều yếu tố như hàm lượng lipid, nồng độ chất chống oxy hóa, nhiệt độ, oxygen, sự có mặt của các chất chống oxy hóa và các thành phần khác trong thực phẩm như nước và protein. Ở đây chúng tôi sử dụng ABTS⁺ là một gốc tự do ổn định và có khả năng nhận điện tử hoặc hydrogen để trở thành phân tử không ổn định nhằm khảo sát khả năng chống oxy hóa của các carotenoid thu nhận. Vitamin C được sử dụng như là chất chuẩn đối chứng. Kết quả kháng oxy hóa của dịch chiết carotenoid từ *R. paludigenum* được trình bày trong Bảng 5.

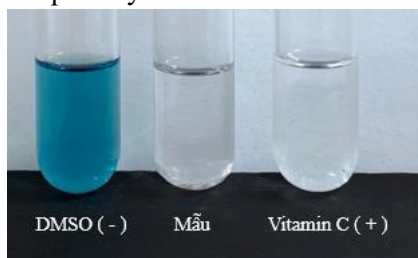
Bảng 5. Hoạt tính kháng oxy hoá của dịch chiết carotenoid từ *R. paludigenum*

Mẫu	Mật độ quang	Hiệu suất (%)
Mẫu đối chứng (-)	$0,745 \pm 0,010^b$	$0,000 \pm 0,000^b$
Mẫu carotenoid	$0,048 \pm 0,005^a$	$93,520 \pm 0,320^a$
Vitamin C (+)	$0,061 \pm 0,002^a$	$91,810 \pm 0,280^a$

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0.05$.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu carotenoid thu nhận từ nấm *R.paludigenum* có khả năng kháng oxi hóa cao, hiệu suất bắt gốc tự do đạt 93,52% tương đương với mẫu đối chứng Vitamin C. Kết quả này

cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Trần Quang Vinh và cs. (2020) khả năng bắt gốc tự do mẫu Astaxanthin là 88,907% và Vitamin C là 81,135%.

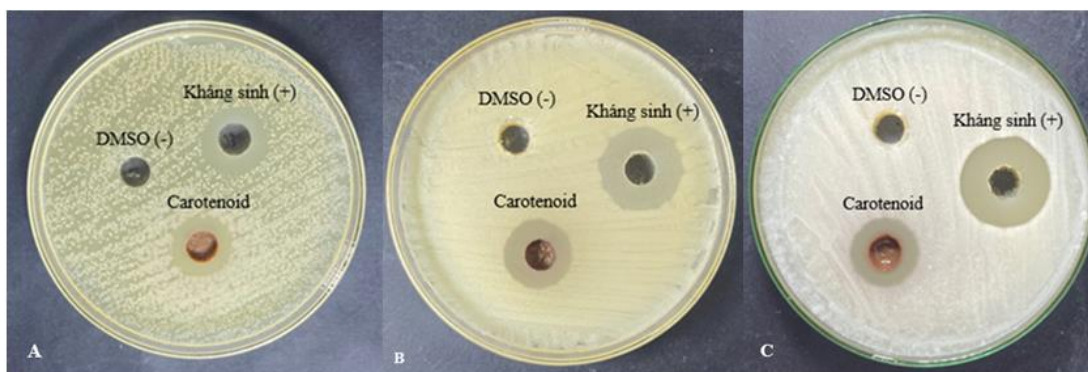


Hình 7. Sự thay đổi màu ABTS⁺ của mẫu

3.3.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết carotenoid bởi *Rhodospiridium paludigenum* từ dịch vỏ dứa

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch chiết carotenoid bởi *R. paludigenum* và bằng DMSO lên các loài vi khuẩn *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Samonella typhirinum* 13.100816 cho thấy,

dịch chiết carotenoid có khả năng kháng khuẩn và ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Vòng vô khuẩn từ 8 - 12 mm. Điều này chứng tỏ hoạt tính của carotenoid thu nhận bằng DMSO kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn. Đối chứng âm DMSO không tạo vòng vô khuẩn (đường kính vòng vô khuẩn bằng 0 mm), đối chứng dương tạo vòng vô khuẩn rộng và rõ (đường kính vòng vô khuẩn từ 13 - 18 mm) (Hình 8).



Hình 8. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết carotenoid từ *R.paludigenum*

(A): *Escherichia coli* (ATCC 25922), (B): *Samonella typhirinum* 13.100816, (C): *Pseudomonas aeruginosa*

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết từ vỏ dứa có thể được sử dụng như chất nền để tăng cường khả năng tổng hợp carotenoid từ nấm men *R. paludigenum*. Điều kiện nuôi cấy tối ưu để tổng hợp carotenoid là 225°C, sau 6 ngày ở pH môi trường là 6,0. Hàm lượng carotenoid đạt giá trị cao nhất là 1,332±0,006 mg/g và

6,362±0,539 mg/L. Dịch chiết thu được từ *R. paludigenum* có hoạt tính kháng oxy khá mạnh đạt 93,52±0,32% và đồng thời có khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Samonella typhirinum* 13.100816. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở khoa học cho việc sử dụng vỏ dứa để sản xuất carotenoide, giúp giảm chi phí sản xuất

hợp chất này, cũng như tận dụng phụ phẩm nông nghiệp và bảo vệ môi trường.

TÀI LIỆU KHAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Trần Quang Vinh, Dương Quốc Cường, Ngô Đại Nghiệp và Hoàng Nghĩa Sơn. (2021). Nghiên cứu tách chiết và khảo sát tính oxy hóa, kháng khuẩn của dịch chiết Astaxanthin từ *Rhodospiridium* sp. bằng DMSO. *Tạp chí Khoa học Đại học Tây Nguyên*, 47, 86-92.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Allahkarami, S., Sepahi, A.A., Hosseini, H., & Razavi, M.R. (2021) Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of *in vitro* carotenoid production. *Biotechnol. Rep.*, 32, e00687.

Baker, R., & Guenther, C. (2004), The role of carotenoids in consumer choice and the likely bene Wts from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10), 484-488.

Bonadio, M.P., de Freitas, L.A., & Mutton, M.J.R. (2018), Carotenoid production in sugarcane juice and synthetic media supplemented with nutrients by *Rhodotorula rubra* 102. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 872-878.

Buzzini, P., & Martin, A. (2000), Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agroindustrial origin. *Bioresource Technology*, 71(1), 41-44.

Chandi, G.K., & Gill, B.S. (2011), Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: a review. *International Journal of Food Properties*, 14, 503-513.

Cheng, Y.T., & Yang, C.F. (2016), Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270-275.

Domínguez-Bocanegra, A.R. & Torres-Muñoz, J.A. (2004), Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(3), 249-52.

Forman, M.R., Hursting, S.D., Umar, A., & Barret, J.C. (2004), Nutrition and cancer prevention: a multi-disciplinary perspective

on human trials. *Annual Review of Nutrition*, 24, 223-254.

Frengova, G.I., & Beshkova, D.M. (2009), Carotenoids from *Rhodospiridium* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 163-180.

Galal, G. F., & Ahmed, R.F. (2020), Using of some agro-industrial wastes for improving carotenoids production from yeast *Rhodotorula glutinis* 32 and bacteria *Erwinia uredovora* DSMZ 30080. *Microbiology Research Journal International*, 30(1), 15-25.

Igreja, W.S., Maia, F.A., Lopes, A.S., & Chisté, R.C. (2021), Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8819.

Kaczor, A., & Baranska, M. (2016), Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology. Wiley-Blackwell, 320pp.

Lee, J.J.L., Chen, L., Shi, J., Trzcinski, A., & Chen, W.N. (2014), Metabolomic profiling of *Rhodospiridium toruloides* grown on glycerol for carotenoid production during different growth phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10203-10209.

Loto, I., Gutiérrez, M.S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2012), Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (CYP61) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 12(1), 235.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999), Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical. Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Silva, T.M., da Silva Neto, A.B., & Teixeira, J.M. (2021), Optimization of pigment production by *Rhodotorula minuta* URM 5197 and *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*). *Agrarian and Biological Sciences*, 10(17), e152101724311.

Singh, G., Sinha, S., Bandyopadhyay, K.K., Lawrence, M., & Paul, D. (2018), Triaxenic growth of an oleaginous red yeast *Rhodospiridium toruloides* on waste 'extract'

- for enhanced and concomitant lipid and β -carotene production. *Microbial Cell Factories*, 17,182.
- Shakeri, S., Khoshbasirat, F., & Maleki M. (2021), *Rhodospiridium* sp. DR37: a novel strain for production of squalene in optimized cultivation conditions. *Biotechnology for Biofuels*,14, 95.
- Silva, T. M., da Silva Neto, A.B., Teixeira, J.M., Cerqueira-Silva, C.B.M, Gualberto, S.A., & de Freitas, J.S. (2021), Optimization of pigment production by *Rhodotorula minuta* URM 5197 and *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*). *Research, Society and Development*, 10(17), e152101724311.
- Tarangini, K. & Mishra, S. (2014), Carotenoid production by *Rhodotorula* sp. on fruit waste extract as a sole carbon source and optimization of key parameters. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 33(3), 89-99.
- Warjoto, R.E., Jennifer, J., & Lay B.W. (2020), Carotenoid Production by *Rhodospiridium paludigenum* Using Orange Peel Extract as Substrate. *Journal of Biology & Biology education*, 12(3), 319-328.