

# Gây đột biến nấm men *Rhodospiridium toruloides* tăng cường sinh astaxanthin bằng tác nhân ethyl methanesulfonate và đánh giá khả năng bắt gốc 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl của astaxanthin

Trần Thị Tuyết Nhung, Ngô Đại Nghiệp\*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Astaxanthin là một carotenoid có giá trị về mặt kinh tế, đã được Tổ chức Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp thuận để dùng làm chất tạo màu trong thực phẩm. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là thu nhận các chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides* đột biến tăng cường sinh astaxanthin bằng tác nhân hoá học gây đột biến ngẫu nhiên là ethyl methanesulfonate (EMS). EMS đã chỉ ra hiệu quả gây đột biến ở các nồng độ được khảo sát là 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 và 6,0% trong việc tác động lên nấm men tăng cường sinh astaxanthin. Trong số các chủng đột biến được sàng lọc, chủng nấm men được đột biến bởi EMS nồng độ 3,5% cho khả năng tích lũy astaxanthin cao hơn nhiều so với chủng bố mẹ (tăng gấp 4,7 lần). Chủng nấm men đột biến E4 có thời gian sinh trưởng ở pha lag ngắn khoảng 2 giờ, pha log khoảng 32 giờ nuôi cấy, pha ổn định kéo dài trong 35 giờ và bắt đầu vào pha suy vong sau 70 giờ nuôi cấy. Thời điểm thu nhận astaxanthin tốt nhất là sau 96 giờ nuôi cấy trong môi trường Hansen, hàm lượng astaxanthin tích lũy là 1719  $\mu\text{g/L}$ . Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết thô astaxanthin được thu nhận từ chủng đột biến E4 có khả năng bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ( $\text{IC}_{50} = 9,106 \mu\text{g/mL}$ ) cao gấp 10,6 lần so với vitamin E và mở ra hướng ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp dược phẩm, dinh dưỡng thực phẩm chức năng, cũng như các chế phẩm sử dụng trong công nghiệp nuôi trồng thủy hải sản.

**Từ khoá:** astaxanthin, *Rhodospiridium toruloides*, ethyl methanesulfonate, DPPH

## MỞ ĐẦU

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ -carotene-4,4'-dione) là một trong các sắc tố thuộc nhóm keto-carotenoid, đã được Tổ chức Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration-FDA) chấp thuận để dùng làm hợp chất tạo màu trong thực phẩm, thức ăn trong nuôi trồng thủy sản<sup>1</sup>. Ngoài ra, astaxanthin có hoạt tính kháng oxy hoá mạnh, chống lại tế bào ung thư, bảo vệ neuron thần kinh, giúp phòng các bệnh lý tim mạch, bảo vệ võng mạc, chống lại sự thoái hoá điểm vàng do tuổi tác, bảo vệ da khỏi tác hại của tia cực tím, giúp làm tăng sức chịu đựng và phòng những tổn thương về cơ và xương<sup>2,3</sup>. Do vậy, astaxanthin hiện nay được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp dược phẩm, dinh dưỡng thực phẩm chức năng và mỹ phẩm.

Nguồn thu nhận astaxanthin được cung cấp chủ yếu trong tự nhiên từ động vật giáp xác, vi khuẩn, tảo và nấm men hoặc được tổng hợp từ các hợp chất có nguồn gốc từ công nghệ hoá dầu<sup>4</sup>. Trong đó, quá trình tổng hợp hoá học cho sản lượng astaxanthin lớn nhưng nhược điểm là gây ô nhiễm môi trường, đáng chú ý hơn nữa là cần xem xét ở mức độ an toàn và chức

năng sinh học của các loại astaxanthin tổng hợp<sup>5</sup>. Để giải quyết các vấn đề trở ngại này, việc thu nhận astaxanthin từ nguồn tự nhiên, đặc biệt là các vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin phát triển nhanh chóng. Trong các loài vi sinh vật có khả năng tổng hợp astaxanthin, vi tảo *Haematococcus pluvialis* là loài được nghiên cứu kỹ nhất do có thể tích lũy một lượng lớn astaxanthin (1,5–5,0% trên tổng trọng lượng khô). Tuy vi tảo *H. pluvialis* có hàm lượng astaxanthin cao nhưng ứng dụng trên quy mô công nghiệp bị hạn chế do kỹ thuật nuôi cấy đòi hỏi chi phí cao và tế bào tăng trưởng chậm. Chính vì vậy, nỗ lực tìm kiếm đối tượng nghiên cứu mới là nấm men được xem là giải pháp tổng hợp astaxanthin ở quy mô công nghiệp hiệu quả hơn tảo lục<sup>6</sup>.

*Rhodospiridium toruloides* là loài nấm men có khả năng sử dụng cơ chất lignocellulose để lên men, đồng thời có khả năng tạo và tích tụ hàm lượng lipid cao trong sinh khối, sinh tổng hợp carotenoid, enzyme có giá trị cho ngành công nghiệp hoá dầu và dược phẩm<sup>6-8</sup>. Những năm gần đây, nấm men được xem là đối tượng thu nhận astaxanthin đầy tiềm năng do hàm lượng astaxanthin tích lũy trên khối lượng sinh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

### Liên hệ

Ngô Đại Nghiệp, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: ndnghep@hcmus.edu.vn

### Lịch sử

- Ngày nhận: 11-06-2021
- Ngày chấp nhận: 29-10-2021
- Ngày đăng: 20-11-2021

DOI: 10.32508/stdjns.v5i4.1086



### Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Trích dẫn bài báo này:** Nhung T T T, Nghiệp N D. Gây đột biến nấm men *Rhodospiridium toruloides* tăng cường sinh astaxanthin bằng tác nhân ethyl methanesulfonate và đánh giá khả năng bắt gốc 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl của astaxanthin. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(4):1670-1678.

khối lớn và thời gian nuôi cấy ngắn hơn so với vi tảo. Nấm men *R. toruloides* được công bố là một nguồn hứa hẹn sinh tổng hợp carotenoid đầy tiềm năng do có khả năng sử dụng các nguồn carbon có giá thành thấp, nguồn cung dồi dào để sinh trưởng và tốc độ phát triển nhanh<sup>6,8</sup>. Tuy nhiên chủng *R. toruloides* hoang dại cho hàm lượng tích lũy astaxanthin thấp, dẫn đến việc bị hạn chế trong ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Do đó việc nghiên cứu tăng cường hiệu quả sinh astaxanthin của chủng *R. toruloides* thông qua tạo và tuyển chọn các chủng đột biến mang tính khoa học và thực tiễn cao. Đã có nhiều công bố chứng minh rằng các tác nhân đột biến hoá học có khả năng ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp astaxanthin của nấm men<sup>8,9</sup>.

Trong nghiên cứu này, tác nhân ethyl methanesulfonate được sử dụng để gây đột biến trên chủng nấm men *R. toruloides* nhằm tăng cường sinh astaxanthin so với chủng gốc ban đầu. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu theo hướng cải biến di truyền chủng *R. toruloides* để tạo ra chủng đột biến dùng làm nền tảng sản xuất hợp chất khác nhau đã được tiến hành trên thế giới<sup>8,9</sup>. Tuy nhiên ở Việt Nam và trên thế giới chưa có công bố nào liên quan đến việc sử dụng tác nhân ethyl methanesulfonate để tạo ra chủng đột biến của *R. toruloides* có khả năng tăng cường sinh astaxanthin. Ngoài việc tạo và tuyển chọn chủng đột biến tăng cường sinh astaxanthin so với chủng gốc *R. toruloides* được phân lập từ tác giả Ngô Đại Nghiệp và cộng sự<sup>10</sup>, hoạt tính kháng oxy hoá của astaxanthin thu nhận từ chủng nấm men đột biến cũng được tiến hành thử nghiệm kiểm chứng bằng phương pháp DPPH.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu thí nghiệm

Nấm men *R. toruloides* chủng hoang dại được phân lập tại các tỉnh miền Đông Nam bộ, lưu giữ giống trong glycerol 20% ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  tại phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh. Các chủng nấm men được đột biến trong nghiên cứu này được sàng lọc và tuyển chọn ngẫu nhiên dựa trên màu sắc của khuẩn lạc so với màu sắc của chủng nấm men hoang dại (mẫu đối chứng). Sau khi sàng lọc, 150 chủng nấm men, thu nhận được 18 chủng (kí hiệu từ E1 đến E18) có hàm lượng astaxanthin cao hơn so với chủng hoang dại.

Môi trường dùng để lên men *R. toruloides* là môi trường Hansen lỏng (pH 6) chứa thành phần gồm: 50 g/L glucose, 10 g/L peptone, 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và 3

g/L  $\text{MgSO}_4$ . Môi trường nhân giống được tiến hành trong bình tam giác (dung tích 250 mL) chứa 100 mL môi trường Hansen bổ sung 5% tỉ lệ giống nấm men *R. toruloides*, nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 96 giờ.

### Đột biến nấm men *R. toruloides* ngẫu nhiên bằng EMS

Tế bào nấm men sau khi nuôi đạt mật độ tế bào khoảng  $10^8$  tế bào/mL được xử lý với EMS<sup>11</sup>. Dịch huyền phù tế bào (1 mL) được ủ với EMS ở các nồng độ khác nhau gồm 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 và 6%, vortex nhẹ sau đó ủ lắc trong 30 phút, sau đó sinh khối tế bào được rửa lại 3 lần với nước cất để loại bỏ EMS. Dịch tế bào sau xử lý (100  $\mu\text{L}$ ) được cấy trang trên đĩa chứa môi trường Hansen thạch và được ủ ở nhiệt độ phòng trong tối 7 ngày. Tỉ lệ sống của tế bào sau xử lý với EMS được đếm dựa trên số lượng khuẩn lạc mọc trên các đĩa petri. Tiến hành tuyển chọn những khuẩn lạc nấm men có màu sắc thay đổi so với chủng hoang dại, nuôi trên môi trường Hansen lỏng trong 4 ngày ở nhiệt độ phòng, lắc 200 vòng/ phút để xác định hàm lượng sinh khối và astaxanthin.

### Xây dựng đường cong tăng trưởng và xác định thời điểm thu nhận astaxanthin thích hợp của chủng nấm men đột biến

Xây dựng tương quan tuyến tính giữa giá trị  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  và mật độ tế bào log N/mL<sup>12</sup>. Dung dịch nuôi cấy nấm men được pha loãng thành các huyền phù có độ đục đo ở  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  theo một dãy các giá trị 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0. Từ các huyền phù có độ đục như trên, pha loãng và đếm tế bào nấm men bằng buồng đếm hồng cầu. Tính mật độ tế bào (N/mL) và dựng đường tương quan tuyến tính giữa giá trị  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  và mật độ tế bào log N/mL.

Cấy huyền phù tế bào nấm men vào 100 mL môi trường và nuôi ở điều kiện nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Ly tâm thu sinh khối vào các giai đoạn tăng trưởng khác nhau (pha log, cuối pha log, đầu pha ổn định, pha ổn định và pha suy tàn). Tách chiết sắc tố từ sinh khối khô đã thu được và xác định hàm lượng astaxanthin.

### Xác định tỉ lệ tế bào sống sót

Tỉ lệ tế bào nấm men *R. toruloides* sống sót được tính theo công thức (1):

$$\text{Tỉ lệ sống sót} = (\text{Cs/Cc}) \times 100 \text{ (1)}$$

Trong đó Cs và Cc tương ứng là tổng số tế bào đếm được sau khi xử lý với tác nhân gây đột biến và mẫu đối chứng (mẫu không xử lý với tác nhân gây đột biến)<sup>13</sup>

### Xác định khối lượng sinh khối

Các chủng nấm men đã đột biến được nuôi cấy trong erlen chứa 100 mL môi trường Hansen lỏng được lắc 200 vòng/ phút, ở nhiệt độ phòng trong 96 giờ. Thu sinh khối sau 96 giờ nuôi cấy bằng cách ly tâm 4000 vòng/ phút, trong 5 phút, bỏ dịch nổi. Rửa phần cặn tế bào với nước cất (lặp lại hai lần) ly tâm 4000 vòng/ phút (5 phút), thu sinh khối và sấy khô ở 60 °C đến khi khối lượng không đổi. Ghi nhận khối lượng sinh khối khô tính theo g/L, sinh khối này được sử dụng để xác định hàm lượng astaxanthin<sup>13</sup>.

### Tách chiết và xác định hàm lượng astaxanthin

Hàm lượng astaxanthin được xác định dựa trên phương pháp của Fang và Chang<sup>14</sup> An và cộng sự<sup>15</sup>, có sửa đổi cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Nghiền 0,2g sinh khối khô trong 3 mL DMSO 55°C, ủ 30 phút. Vortex 1 phút, ly tâm 4000 vòng/phút, trong vòng 5 phút, thu dịch nổi chứa DMSO. Thêm vào phần cặn 5 mL acetone, vortex kỹ rồi ly tâm 4000 vòng/ phút, trong 5 phút, thu dịch nổi (chiết với acetone 2-3 lần cho đến khi phần cặn hết sắc tố). Gộp tất cả dịch chiết acetone và dịch nổi chứa DMSO, thêm vào ether dầu hỏa (tỷ lệ 1:2 so với tổng dịch chiết), 10 mL nước cất, nếu không tách pha thêm 5 mL NaCl bão hòa, thu pha ether dầu hỏa phía trên chứa sắc tố. Thêm nước vào dịch chiết sắc tố (tỷ lệ 1:1), bỏ pha nước (chứa acetone và DMSO), thu dịch chiết sắc tố trong pha ether dầu hỏa (lớp phía trên). Lặp lại bước này 3-5 lần để loại bỏ hoàn toàn DMSO. Định lượng astaxanthin bằng phương pháp đo độ hấp thụ của dung dịch chiết sắc tố.

Cho dịch chiết sắc tố bay hơi hoàn toàn ở nhiệt độ phòng, hòa tan sắc tố trong 10 mL ether dầu hỏa. Đo độ hấp thụ của dung dịch chiết sắc tố ở bước sóng 468 nm, với mẫu đối chứng là ether dầu hỏa.

Tính hàm lượng astaxanthin ( $\mu\text{g/g}$ ) có trong mẫu theo Kelly-Harmon (1972)<sup>16</sup>:

$$X = A_{468} \cdot V \cdot 10^4 / (E_{1\text{cm}}\% \cdot G) \quad (2)$$

$A_{468}$ : độ hấp thụ của dung dịch chiết sắc tố trong dung môi PE ở bước sóng 468; V: thể tích dung dịch chiết sắc tố (mL);  $E_{1\text{cm}}\%$ : độ hấp thụ của dung dịch astaxanthin 1% trong dung môi PE (cuvette 1cm) ( $E = 2100$ ); G: trọng lượng của sinh khối nấm men (g).

### Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của astaxanthin bằng phương pháp DPPH

DPPH được hoà tan trong dung môi DMSO để đạt nồng độ 0,1 mM. Trong đó vitamin E được sử dụng làm chất đối chứng được pha ở dãy nồng độ là 20-100  $\mu\text{g/mL}$ . Mẫu cao astaxanthin được pha loãng theo

dãy nồng độ 4-20  $\mu\text{g/mL}$ . Tiến hành ủ mẫu với DPPH theo tỉ lệ 4:1 trong tối 30 phút, có lắc nhẹ, sau đó đo OD ở bước sóng 517 nm<sup>17</sup>.

Mẫu đối chứng, astaxanthin được thay thế bằng DMSO, ngoài ra thực nghiệm thêm mẫu astaxanthin đối chứng tương ứng nồng độ mẫu ủ để loại bỏ phần sai số do màu của astaxanthin và do dung môi chứa mẫu gây ra (mẫu này không ủ với thuốc thử DPPH). Tính phần trăm ức chế theo công thức sau, xây dựng đồ thị giữa nồng độ và phần trăm ức chế, từ đó tìm được giá trị  $\text{IC}_{50}$

$$\%RSA = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs sample}} \times 100 \quad (3)$$

% RSA: Phần trăm ức chế Abs control: Giá trị OD của mẫu đối chứng + giá trị OD của mẫu astaxanthin tương ứng ở các nồng độ ( không ủ với DPPH) Abs sample: Giá trị OD của mẫu đo.

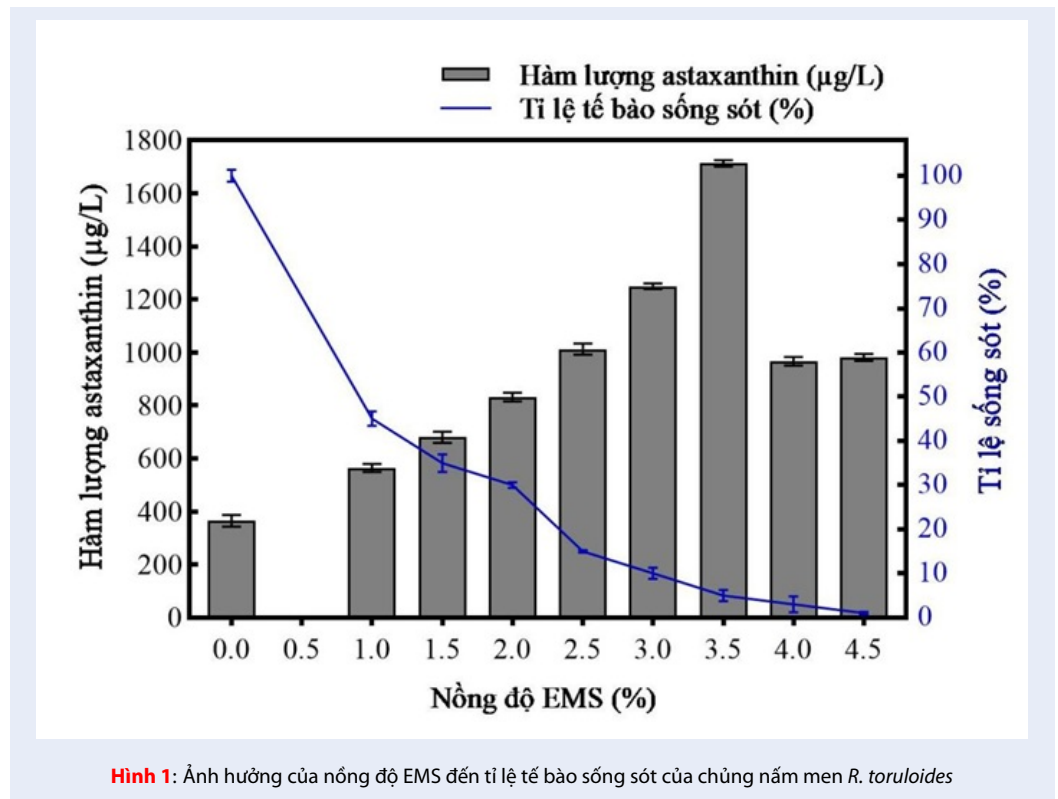
### Xử lý thống kê và phân tích dữ liệu

Các số liệu trong nghiên cứu đều được lặp lại ba lần và được biểu thị bởi độ lệch tiêu chuẩn ( $\pm$  SD - standard deviation). Phần mềm SAS phiên bản 8.2 ( SAS institute, Cary, NC, USA) được sử dụng để phân tích thống kê theo thuật toán ANOVA, Duncan test tại giá trị  $p < 0,05$ .

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tạo chủng đột biến tăng cường sinh astaxanthin của nấm men *R. toruloides* bằng EMS

Trong nghiên cứu này, chủng *R. toruloides* hoang dại đã bị đột biến bằng EMS và được sàng lọc để tìm chủng có hàm lượng astaxanthin cao nhất. Chủng *R. toruloides* hoang dại được đột biến bằng EMS với các nồng độ khác nhau và sau đó được nuôi cấy trên môi trường Hansen thạch trong 7 ngày để sàng lọc chủng có hàm lượng astaxanthin cao nhất. Sau khi được xử lý với tác nhân gây đột biến là EMS, các tế bào *R. toruloides* thay đổi màu sắc khuẩn lạc theo 2 hướng là tăng sắc tố hoặc giảm sắc tố. Khuẩn lạc của chủng *R. toruloides* hoang dại ban đầu có màu hồng cam, qua tiếp xúc với EMS đã xuất hiện những khuẩn lạc có màu đỏ hồng nổi bật, bên cạnh đó cũng có những khuẩn lạc chuyển màu nhạt dần, mất hẳn sắc tố và chỉ có màu trắng, cho thấy rằng khi xử lý đột biến với EMS có thể làm tăng hoặc giảm sự hình thành carotenoid trong *R. toruloides*. Khi tăng nồng độ EMS khi tiếp xúc với tế bào nấm men làm giảm tỉ lệ tế bào sống sót của *R. toruloides*. Kết quả từ Hình 1 cho thấy tỉ lệ sống sót của chủng nấm men *R. toruloides* hoang dại đã giảm đáng kể khi tăng nồng độ EMS nhưng đồng thời cũng



tăng tích trữ astaxanthin trong tế bào. Kết quả này chỉ ra rằng việc sản xuất astaxanthin được tăng cường để bảo vệ các tế bào chống lại tác nhân alkyl hoá<sup>18</sup>.

EMS gây đột biến ngẫu nhiên trong vật liệu di truyền bằng cách thay thế nucleotide; đặc biệt là alkyl hóa guanine và chúng gây ra các đột biến điểm<sup>19,20</sup>. Nhóm ethyl của EMS phản ứng với guanine trong DNA, tạo lên sự bất thường điểm O6-ethylguanine. Trong quá trình sao chép DNA, các DNA polymerase xúc tác cho quá trình bắt cặp thymine, thay vì cytosine, đối diện điểm O6-ethylguanine. Sau các lần nhân đôi tiếp theo, cặp gốc G:C có thể trở thành cặp A:T (đột biến chuyển đổi)<sup>18,21</sup>. Đây là một chất đột biến mạnh được sử dụng trong nhiều nghiên cứu phòng thí nghiệm trên đối tượng vi sinh vật. EMS có khả năng gây đột biến điểm trên DNA từ đó thay đổi tình trạng bên ngoài của nấm men và được di truyền qua thế hệ sau<sup>21</sup>. Kết quả cho thấy, tế bào nấm men *R.toruloides* nhạy cảm với EMS và có khả năng hình thành các chủng đột biến để thích ứng với các stress khi tiếp xúc với loại hóa chất này. Để sàng lọc chủng đột biến tăng cường sinh astaxanthin, hơn 150 tế bào đột biến đã được chọn lọc từ các đột biến ngẫu nhiên để nuôi cấy. Trong số đó, 18 chủng được tuyển chọn là có khả năng tăng cường sinh astaxanthin và những chủng này cho thấy hàm lượng sinh

khối, hàm lượng astaxanthin cao hơn đáng kể so với chủng hoang dại (Bảng 1). Trong số tất cả các chủng đột biến được tuyển chọn, chủng E4 có hàm lượng astaxanthin cao nhất ( $1719,9 \pm 88,3 \mu\text{g/L}$ ). Hàm lượng astaxanthin của chủng E4 cao hơn 4,7 lần so với chủng hoang dại (Bảng 2). Hiện nay, tác nhân EMS cũng được sử dụng nhiều để gây đột biến nấm men đã được công bố trên các tạp chí quốc tế. Theo Calo và cộng sự (1995)<sup>20</sup> đã công bố, khi gây đột biến tế bào nấm men *P. rhodozyma* đã xuất hiện một số chủng đột biến có khả năng sản sinh carotenoid mà đặc biệt là astaxanthin đến  $514,6 \mu\text{g/g}$ , trong khi chủng hoang dại là  $357,9 \mu\text{g/g}$ ; tức tăng gấp 1,5 lần. Tương tự, An và cộng sự (1989)<sup>18</sup> cũng đưa ra kết quả khi sử dụng EMS đột biến chủng *P. rhodozyma* cho hàm lượng astaxanthin cao gấp 1,5 lần chủng hoang dại ( $600 \mu\text{g/g}$  so với chủng ban đầu là  $400 \mu\text{g/g}$ ). Trong tất cả các chủng nấm men đã được đột biến EMS thì chủng E4 (khuẩn lạc thu nhận khi xử lý với EMS nồng độ 3,5%) cho khả năng tăng cường sinh astaxanthin cao nhất, do vậy chủng E4 sẽ được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo của nghiên cứu này.

**Bảng 1: Hàm lượng sinh khối và astaxanthin của các chủng nấm men đột biến bằng EMS**

Chủng	Hàm lượng sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng astaxanthin ( $\mu\text{g/g}$ sinh khối khô)	Hàm lượng astaxanthin ( $\mu\text{g/L}$ )
E1	3,258 $\pm$ 0,483 <i>g,h,i,j</i>	259,00 $\pm$ 36,6 <i>a,b,c</i>	834,7 $\pm$ 71,7 <i>e,f,g,h,i</i>
E2	4,423 $\pm$ 0,353 <i>b,c,d,e,f,g</i>	197,46 $\pm$ 12,92 <i>c,d,e,f,g,h</i>	873,0 $\pm$ 81,8 <i>e,f,g,h,i</i>
E3	2,070 $\pm$ 0,285 <i>j</i>	288,70 $\pm$ 34,7 <sup>a</sup>	593,4 $\pm$ 65,5 <i>g,h,i,j</i>
E4	5,779 $\pm$ 0,493 <sup>a</sup>	298,17 $\pm$ 10,01 <sup>a</sup>	1719,9 $\pm$ 88,3 <sup>a</sup>
E5	4,576 $\pm$ 0,282 <i>a,b,c,d,e,f</i>	181,03 $\pm$ 14,96 <i>f,g,h</i>	831,1 $\pm$ 117,3 <i>e,f,g,h,i</i>
E6	5,100 $\pm$ 0,200 <i>a,b,c</i>	208,70 $\pm$ 32,3 <i>b,c,d,e,f,g,h</i>	1067 $\pm$ 196 <sup>b,c,d,e,f</sup>
E7	3,433 $\pm$ 0,651 <i>f,g,h,i</i>	166,75 $\pm$ 6,43 <i>g,h</i>	572,9 $\pm$ 111,3 <i>g,h,i,j</i>
E8	4,700 $\pm$ 0,173 <i>a,b,c,d,e</i>	156,00 $\pm$ 23,4 <sup>h</sup>	735,1 $\pm$ 131,6 <i>f,g,h,i</i>
E9	3,045 $\pm$ 0,189 <i>h,i,j</i>	184,80 $\pm$ 23,9 <i>e,f,g,h</i>	565,4 $\pm$ 104,5 <i>h,i,j</i>
E10	3,609 $\pm$ 0,188 <i>e,f,g,h,i</i>	237,00 $\pm$ 17,4 <i>a,b,c,d,e,f</i>	853,1 $\pm$ 26,4 <sup>e,f,g,h,i</sup>
E11	5,367 $\pm$ 0,252 <i>a,b</i>	188,73 $\pm$ 10,49 <sup>d,e,f,g,h</sup>	1013,8 $\pm$ 90,1 <i>c,d,e,f,g</i>
E12	4,600 $\pm$ 0,624 <i>a,b,c,d,e,f</i>	179,37 $\pm$ 13,54 <i>f,g,h</i>	822,4 $\pm$ 100,5 <i>e,f,g,h,i</i>
E13	4,894 $\pm$ 0,255 <i>a,b,c,d</i>	254,60 $\pm$ 27,1 <i>a,b,c,d</i>	1250 $\pm$ 198 <i>b,c,d,e</i>
E14	5,506 $\pm$ 0,809 <i>a,b</i>	257,40 $\pm$ 23,9 <i>a,b,c</i>	1430 $\pm$ 341 <sup>a,b,c</sup>
E15	5,317 $\pm$ 0,425 <i>a,b,c</i>	273,90 $\pm$ 28,7 <i>a,b</i>	1461 $\pm$ 243 <sup>a,b</sup>
E16	5,375 $\pm$ 0,222 <i>a,b</i>	251,70 $\pm$ 24,0 <i>a,b,c,d,e</i>	1356 $\pm$ 187 <i>a,b,c,d</i>
E17	4,089 $\pm$ 0,259 <i>c,d,e,f,g,h</i>	236,31 $\pm$ 3,32 <i>a,b,c,d,e,f</i>	966,2 $\pm$ 61,1 <sup>d,e,f,g,h</sup>
E18	3,830 $\pm$ 0,305 <i>d,e,f,g,h,i</i>	231,00 $\pm$ 36,7 <i>a,b,c,d,e,f,g</i>	891 $\pm$ 195 <sup>e,f,g,h,i</sup>
WT	2,777 $\pm$ 0,0003 <sup>l</sup>	131,664 $\pm$ 0,010 <sup>u</sup>	365,63 $\pm$ 0,42 <sup>p</sup>

WT: Chủng hoang dại. Giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a, b, c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,005$ ).

**Bảng 2: Chủng đột biến có khả năng sinh astaxanthin cao nhất ứng khi xử lý với EMS**

Chủng	Hàm lượng sinh khối khô (g/L)	Hàm lượng astaxanthin ( $\mu\text{g/g}$ sinh khối khô)	Hàm lượng astaxanthin ( $\mu\text{g/L}$ )
E4	5,779 $\pm$ 0,493	298,17 $\pm$ 10,01	1719,9 $\pm$ 88,3
WT	2,777 $\pm$ 0,0003	131,664 $\pm$ 0,010	365,63 $\pm$ 0,42

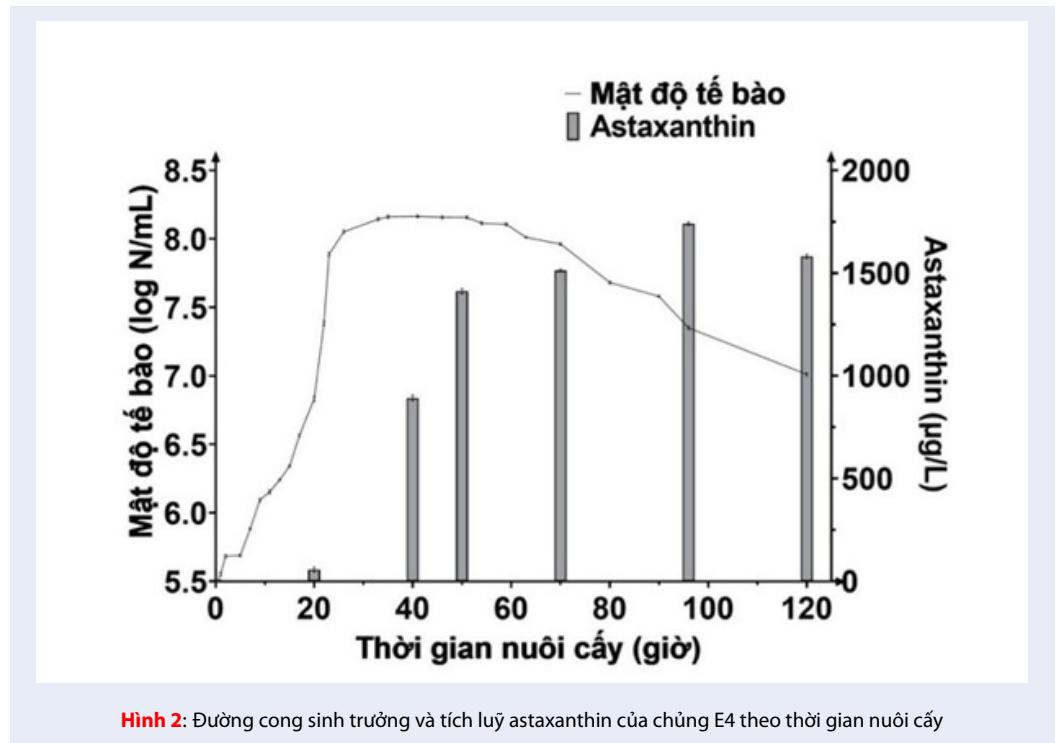
WT: Chủng hoang dại.

### Đường cong tăng trưởng và thời điểm thu nhận astaxanthin thích hợp của chủng đột biến E4

Đường cong sinh trưởng và hàm lượng astaxanthin thu nhận được của chủng E4 được thể hiện ở Hình 2. Chủng E4 bắt đầu pha log sau 2 giờ và sau 32 giờ nuôi cấy đi vào pha ổn định, pha ổn định kéo dài trong vòng 35 giờ và bắt đầu vào pha suy vong sau 70 giờ nuôi cấy. Chủng E4 bắt đầu tổng hợp astaxanthin sau khi kết thúc pha log, hàm lượng astaxanthin tích lũy nhiều hơn ở pha ổn định và tăng đáng kể vào pha suy vong. Thời điểm thu astaxanthin tốt nhất là sau 70 giờ tại thời điểm các tế bào nấm men đang ở gần cuối pha

cân bằng và đạt cực đại là sau 96 giờ nuôi cấy lúc này sinh khối đạt giá trị cao nhất và hàm lượng astaxanthin tích lũy cao nhất đạt 1719  $\mu\text{g/L}$ .

Theo nghiên cứu của tác giả Ngô Đại Nghiệp và cộng sự (2015), chủng nấm men *R. toruloides* hoang dại ban đầu được sử dụng cho các thử nghiệm đột biến. Ở nghiên cứu này có số liệu về đường cong sinh trưởng như sau: pha lag trong 12 giờ đầu, pha log vào giờ thứ 12 đến giờ thứ 24, pha ổn định từ giờ thứ 26 đến giờ thứ 64 và pha suy tàn từ sau 64 giờ<sup>12</sup>. Chủng đã đột biến E4 cho thấy khả năng thích ứng nhanh hơn trong môi trường nuôi cấy (thời gian pha lag ngắn), thời gian pha log và pha ổn định của chủng đột biến dài



Hình 2: Đường cong sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của chủng E4 theo thời gian nuôi cấy

hơn chủng hoang dại như vậy cho thấy khả năng sinh trưởng tốt hơn chủng hoang dại, tạo tiềm năng thu nhận được khối lượng sinh khối lớn hơn (sinh khối thu nhận của chủng E4 là  $5,779 \pm 0,493$  g/L). Trong nghiên cứu này, chủng đã đột biến E4 cũng tích lũy astaxanthin từ cuối pha log, tăng nhanh ở pha ổn định và đạt tối đa sau 96 giờ nuôi ở pha suy tàn. Astaxanthin cũng như các chất thuộc carotenoid là nhóm hợp chất thứ cấp với vai trò bắt các gốc tự do, chống sự oxy hóa tế bào<sup>22</sup>, do vậy, chúng chỉ tích lũy nhiều khi quần thể tế bào bắt đầu đi vào pha cân bằng và pha suy vong, khi điều kiện môi trường dần trở nên bất lợi để bảo vệ tế bào tránh khỏi tác động từ các gốc tự do, tăng khả năng chống chịu và duy trì sự sống cho tế bào. Trong nghiên cứu của Lina và cộng sự (2015) về sự sinh trưởng của chủng nấm men *X. dendrorhous* hoang dại và đột biến XR4 cũng cho thấy sự sinh tổng hợp của carotenoid bắt đầu từ pha ổn định, sau đó tăng hàm lượng ở cuối pha ổn định và vào pha suy tàn trong khoảng 87 giờ nuôi cấy<sup>23</sup>.

### Hoạt tính kháng oxy hóa của astaxanthin thu nhận từ chủng đột biến E4 theo phương pháp DPPH

Astaxanthin có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhờ vào cấu trúc phân tử đặc biệt. Trong nghiên cứu này, cao chiết thô astaxanthin của chủng nấm men hoang dại và chủng E4 sau khi thu nhận, được thực hiện

khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH. DPPH có khả năng tạo ra các gốc tự do bền, khi cho các hợp chất thử nghiệm vào hỗn hợp này, nếu hợp chất có khả năng làm trung hoà hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH ở bước sóng 517 nm<sup>17</sup>.

Giá trị  $IC_{50}$  của cao thô astaxanthin thu nhận từ chủng E4 là  $9,106 \pm 1,01$  µg/mL thấp hơn gấp 10,6 lần so với vitamin E ( $IC_{50} = 85,91 \pm 0,91$  µg/mL) và không khác biệt so với cao chiết astaxanthin được thu nhận từ chủng hoang dại ( $9,702 \pm 0,87$  µg/mL) (Bảng 3). Kết quả cho thấy, astaxanthin thu nhận từ chủng đột biến vẫn giữ được hoạt tính kháng oxy hoá. Cao chiết thô astaxanthin thu nhận từ chủng nấm men đột biến *R. toruloides* E4 cũng thể hiện khả năng kháng oxy hóa vượt trội so với các carotenoid khác theo một số báo cáo đã công bố. Astaxanthin là 1 xanthophyll với 1 nhóm hydroxyl -OH và 1 nhóm ketone C=O trên vòng  $\beta$ -ionone đã làm cho hoạt tính kháng oxy hóa của astaxanthin thay đổi so với các carotenoid khác<sup>17,24</sup>. Việc đưa nhóm hydroxyl vào cấu trúc carotene, thí dụ như lutein, không dẫn đến sự thay đổi đáng kể trong hoạt tính kháng oxy hóa so với các hydrocarbon carotenoid. Tuy nhiên ở astaxanthin cho thấy sự có mặt của nhóm ketone kích hoạt nhóm hydroxyl tạo điều kiện thuận lợi cho việc chuyển hydrogen đến các gốc peroxy. Để giải thích hoạt tính kháng oxy hóa cao của astaxanthin so với

**Bảng 3: Giá trị IC<sub>50</sub> của vitamin E và cao chiết thô astaxanthin**

	Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Vitamin E	85,91 ± 0,91
Cao chiết thô astaxanthin (chủng E4)	9,106 ± 1,01
Cao chiết thô astaxanthin (chủng hoang dại)	9,702 ± 0,87

các carotenoid khác, các nhà khoa học đã đề xuất rằng trong dung dịch astaxanthin thoát ra ở trạng thái cân bằng, phụ thuộc vào dung môi, với dạng enol của ketone dẫn đến hệ thống polyene liên hợp và *ortho*-dihydroxyl sở hữu một nguyên tử hydrogen có khả năng hoạt động như một tác nhân phá vỡ chuỗi phản ứng gốc tự do theo cách tương tự như nhóm hydroxyl của vitamin E<sup>25</sup>. Với hoạt tính kháng oxy hóa vượt trội cùng với cấu trúc đặc biệt giúp astaxanthin có thể nằm trong màng tế bào, kết quả kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH là tiền đề để thực hiện các khảo sát liên quan đến việc kháng lại các tác nhân stress, oxy hóa lipid, protein trên màng tế bào gây ra các bệnh về lão hóa.

### KẾT LUẬN

Bài nghiên cứu báo cáo về các chủng đột biến của nấm men *R.toruloides* có khả năng tăng cường sinh astaxanthin bằng cách sử dụng tác nhân EMS. Các chủng đột biến được tạo ra tích lũy astaxanthin lớn hơn so với chủng bố mẹ. Trong số các chủng được tuyển chọn chủng đột biến được xử lý bằng EMS nồng độ 3,5% cho hàm lượng astaxanthin cao nhất (298,17 ± 10,01 µg/g sinh khối khô và 1719,9 µg/L). Thời điểm thu nhận astaxanthin thích hợp nhất đối với chủng E4 là 96 giờ nuôi cấy lắc 200 vòng/phút, 30°C, tỉ lệ giống bổ sung là 5% (mật độ giống ban đầu là 10<sup>8</sup> tế bào/mL). Cao chiết thô astaxanthin được thu nhận từ chủng đột biến E4 có khả năng bắt gốc tự do DPPH (IC<sub>50</sub> = 9,106 µg/mL) cao gấp 10,6 lần so với vitamin E.

### DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

DMSO: Dimethyl sulfoxide  
 DNA: Deoxyribose Nucleic Acid  
 DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
 EMS: Ethyl methanesulfonate  
 NTG: N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
 OD: Optical density (mật độ quang)  
 WT: Wild Type (loại hoang dại)  
 IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration

### XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

### ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Trần Thị Tuyết Nhung thực hiện các thí nghiệm, thu thập, xử lý và viết bản thảo.

Ngô Đại Nghiệp đưa ra ý tưởng, chỉnh sửa bản thảo, thảo luận các kết quả nghiên cứu và hoàn chỉnh bản thảo.

### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số B2019-18-03.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease, *The American Journal of Cardiology*. 2008;101(10):S58-S68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.010>.
- Jiang W, Zhao H, Zhang L, Wu B, Zha Z. Maintenance of mitochondrial function by astaxanthin protects against bisphenol A-induced kidney toxicity in rats, *Biomedicine*. 2020;121:109629. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109629>.
- Wu Y, Yan P, Liu X, Wang Z, Tang Y, Chen T, Zhao X. Combinatorial expression of different β-carotene hydroxylases and ketolases in *Escherichia coli* for increased astaxanthin production, *Journal of Industrial Microbiology*. 2019;46(11):1505-1516. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02214-1>.
- Brotosudarmo THP, Limantara L, Setiyono E. Structures of astaxanthin and their consequences for therapeutic application, *International Journal of Food Science*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1155/2020/2156582>.
- Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Ianora A, Brunet C, C. On the neuroprotective role of astaxanthin: new perspectives?, *Marine Drugs*. 2018;16(8):247. Available from: <https://doi.org/10.3390/md16080247>.
- Park Y-K, Nicaud J-M, Ledesma-A-R. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications, *Trends in Biotechnology*. 2018;36(3):304-317. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.013>.
- Lopes HJS, Bonturi N, Kerkhoven EJ, Miranda EA, Lahtvee P-J. C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*, *Applied Microbiology*. 2020;104(6):2639-2649. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10386-5>.
- Wen Z, Zhang S, Odoh CK, Jin M, Zhao ZK. *Rhodospiridium toruloides* - A potential red yeast chassis for lipids and beyond, *FEMS Yeast Research*. 2020;20(5):foaa038. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa038>.
- Zhuang X, Kilian O, Monroe E, Ito M, Tran-G.M.B, Liu F, Davis R W, Mirsiaghi M, Sundstrom E, Pray T. Monoterpene production by the carotenogenic yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Microbial Cell Factories*. 2019;18(1):1-15. Available from: [10.1186/s12934-019-1099-8](https://doi.org/10.1186/s12934-019-1099-8).

10. Nghiep ND, Khánh BTP, et al. Sàng lọc một số chủng vi sinh vật phân lập từ miền Đông Nam Bộ có khả năng sinh tổng hợp astaxanthin, Tạp chí Khoa học và Công Nghệ. 2014;52:502–507.
11. Kucsera J, Pfeiffer I, Takeo K. Biology of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*), *Mycoscience*. 2000;41(3):195–199. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02489671>.
12. Le VKT, Vo THT, Ngo DN. Investigation of astaxanthin production from yeast *Rhodospiridium* sp, *British Microbiology Research Journal*. 2015;9(5). Available from: <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/19368>.
13. Tran TN, et al. Enhancing astaxanthin biosynthesis by *Rhodospiridium toruloides* mutants and optimization of medium compositions using response surface methodology, *Processes*. 2020;8(4):497. Available from: <https://doi.org/10.3390/pr8040497>.
14. Fang TJ, Cheng YS. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions, *Journal of Fermentation*. 1993;75(6):466–469. Available from: [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90099-T](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90099-T).
15. Ni H, Chen Q, He G, Wu G, Yang Y. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*, *Journal of Zhejiang University Science B*. 2008;9(1):51–59. Available from: <https://doi.org/10.1631/jzus.B061261>.
16. Kelley CE, Harmon W. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products, *Fishery Bulletin*. 1972;111.
17. Jiménez-E A, Jiménez-Jiménez I, Sánchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, *Journal of the Science of Food*. 2000;80(11):1686–1690. Available from: [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000901\)80:11<1686::AID-JSFA694>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1686::AID-JSFA694>3.0.CO;2-Y).
18. An G-H, Schuman DB, Johnson EA. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content, *Applied Environmental Microbiology*. 55(1):116-124. . 1989;PMID: 16347815. Available from: <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.116-124.1989>.
19. Araya-Garay JM, Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Sánchez-Pérez A, Villa TG. Construction of a novel *Pichia pastoris* strain for production of xanthophylls, *AMB Express*. 2012;2(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-24>.
20. Calo P, Miguel T, Velázquez JB, Villa TG. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*, *Biotechnology Letters*. 1995;17(6):575–578. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00129380>.
21. Stachowiak B. Efficiency of selected mutagens in generating *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains hyperproducing astaxanthin, *Polish Journal of Microbiology*. 2013;62(1):67–72. PMID: 23829079. Available from: <https://doi.org/10.33073/pjm-2013-008>.
22. Schroeder WA, Johnson EA. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage, *Journal of Industrial Microbiology*. 1995;14(6):502–507. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01573965>.
23. Castelblanco-MLM, Barbachano-Torres A, Ponce-Noyola T, Ramos-Valdivia AC, García-Rojas CMC, Flores-Ortiz C. M, Barahona-Crisóstomo SK, Baeza-Cancino ME, Alcázar-Gorman J, Cifuentes-Guzmán V.H. Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin-overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain, *Archives of Microbiology*. 2015;197(10):1129–1139. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1153-9>.
24. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids, *Pure Appl. Chem*. 1991;63(1):141–146. Available from: <https://doi.org/10.1351/pac199163010141>.
25. Naguib Y, MA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids, *Journal of Agricultural*. 2000;48(4):1150–1154. PMID: 10775364. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf991106k>.



# Mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* using ethyl methanesulfonate for enhancing astaxanthin production and evaluation scavenging activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl of astaxanthin

Tran Thi Tuyet Nhung, Ngo Dai Nghiep\*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

Astaxanthin is a valuable carotenoid which has been approved as a food coloring by the US Food and Drug Administration. This work aimed to attain *Rhodospiridium toruloides* mutants for enhanced astaxanthin accumulation using ethyl methanesulfonate mutagenesis (EMS). EMS treatment was shown efficient at different investigated concentration included 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 and 6.0% in affecting the yeast for enhanced astaxanthin production. Among the screened mutants, E4 (1719.9  $\mu\text{g/L}$ ), an EMS-induced mutant at 3.5% concentration, exhibited the highest astaxanthin production which was significantly higher than that of the wild strain (increased 4.7 times). A mutant yeast strain E4 showed a short lag phase of about 2 hours, then 32 hours of log phase, 35 hours of stationary phase and then entered to death phase after 70 hours of inoculation. The best time to collect astaxanthin was after 96 hours of inoculation in Hansen broth, the accumulated astaxanthin content was 1719  $\mu\text{g/L}$ . Crude extract of astaxanthin from mutant strain E4 had the scavenging capacity of DPPH free radicals ( $\text{IC}_{50} = 9.106 \mu\text{g/mL}$ ) 10.6 times higher than that of vitamin E and their's application direction in the pharmaceutical industry, nutritional supplements, as well as bioproduct used in the aquaculture industry.

**Key words:** astaxanthin, *Rhodospiridium toruloides*, ethyl methanesulfonate, DPPH

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam.

## Correspondence

**Ngo Dai Nghiep**, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam.

Email: ndnghiep@hcmus.edu.vn

## History

- Received: 11-06-2021
- Accepted: 29-10-2021
- Published: 20-11-2021

DOI : 10.32508/stdjns.v5i4.1086



## Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Cite this article:** Nhung T T T, Dai-Nghiep N. **Mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* using ethyl methanesulfonate for enhancing astaxanthin production and evaluation scavenging activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl of astaxanthin.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(4):1670-1678.