

ẢNH HƯỞNG KẾT HỢP CỦA NỒNG ĐỘ NITRATE VÀ CHẾ ĐỘ CHIẾU SÁNG LÊN SINH TRƯỞNG CỦA VI TẢO *Haematococcus pluvialis*

Đặng Diễm Hồng*, Đinh Thị Ngọc Mai, Bùi Đình Lâm, Lưu Thị Tâm, Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Thị Thơm, Đinh Đức Hoàng, Hoàng Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu

Viện Công nghệ sinh học, *ddhong60vn@yahoo.com

TÓM TẮT: Vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* được biết đến rộng rãi như là nguồn cung cấp astaxanthin tự nhiên. Nhiều vi sinh vật như nấm, địa y, vi khuẩn, vi tảo khác cũng có khả năng tổng hợp astaxanthin nhưng hàm lượng astaxanthin ở *H. pluvialis* được xem là cao nhất. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng kết hợp của nồng độ nitrate và chế độ chiếu sáng lên sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* khi nuôi ở bình nhựa thể tích 10 lít. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi nồng độ nitrate trong môi trường nuôi cấy tăng lên gấp 4 lần thì mật độ tế bào cực đại tăng 25%, đạt $0,95 \times 10^6$ TB/ml. Đồng thời, nuôi cấy *H. pluvialis* trong môi trường có nồng độ nitrate cao và kết hợp với việc điều chỉnh chế độ chiếu sáng, làm mới môi trường đã được chứng minh là phương pháp hiệu quả để đạt mật độ tế bào cao. Mật độ tế bào cực đại của *H. pluvialis* đạt $3,2 \times 10^6$ TB/ml sau 22 ngày nuôi ở môi trường RM -4X (nồng độ NaNO_3 là 1200 mg/l), chiếu kết hợp ánh sáng trắng và UV với cường độ chiếu tương ứng là 4,3 klux và 1,4 klux, chu kỳ sáng tối 16:8 giờ trong đó 10 giờ chiếu ánh sáng trắng và 6 giờ chiếu ánh sáng trắng kết hợp UV là 6 giờ. Ở công thức chiếu sáng với cường độ 2,5 klux, chu kỳ sáng tối 12:12 và công thức chiếu sáng với cường độ cao (4,3 klux), chu kỳ sáng tối 16:8 giờ, mật độ tế bào cực đại đạt tương ứng là $0,9 \times 10^6$ TB/ml và $1,8 \times 10^6$ TB/ml sau 19 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, chế độ chiếu sáng, làm mới môi trường, nitrate.

MỞ ĐẦU

Astaxanthin (3, 3'- dihydroxy β , β carotene - 4,4 - dione) là một sắc tố, dẫn xuất của β -carotene, có giá trị kinh tế cao được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản và công nghiệp thực phẩm, thực phẩm chức năng. Hoạt tính chống oxy hóa của chúng cao hơn gấp 10 lần so với các loại carotenoit khác như β -carotene, zeaxanthin, lutein, canthaxanthin và cao hơn gấp 500 lần so với α -tocopherol [20]. Bên cạnh đó, do khả năng ngăn chặn một số loại ung thư, kích thích hệ thống miễn dịch cao hơn so với β -carotene và α -tocopherol nên hiện nay, ứng dụng của astaxanthin còn được mở rộng trong lĩnh vực y dược học [14, 16, 20]. Mặc dù một số loài vi sinh vật như nấm men *Phaffia rhodozyma* có khả năng tổng hợp astaxanthin nhưng hàm lượng astaxanthin nội bào của chúng rất thấp [1, 4]. Trong khi đó, vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* có khả năng tích lũy astaxanthin lên tới trên 4% sinh khối khô [10]. Vì vậy, hiện nay sản xuất astaxanthin từ loài vi tảo này đang được đặc biệt quan tâm nghiên cứu [2, 5, 6, 13, 19]. Tuy nhiên, việc sản xuất astaxanthin hiệu quả từ loài vi tảo này còn gặp

những khó khăn bởi vì chúng có tốc độ sinh trưởng thấp và nhạy cảm với sự thay đổi của điều kiện nuôi cấy. Hầu hết tế bào vi tảo đều duy trì ở trạng thái sinh dưỡng, tích lũy rất ít hoặc không tích lũy astaxanthin khi nuôi ở điều kiện thích hợp. Tuy nhiên, dưới điều kiện stress, tế bào chuyển sang dạng bào nang không chuyển động và khi được kích thích phù hợp tế bào tảo có thể tích lũy một lượng lớn astaxanthin. Vì vậy, điều kiện cho tế bào sinh trưởng và tổng hợp astaxanthin là rất khác nhau. Việc xác định rõ ràng pha sinh trưởng tế bào và pha tổng hợp astaxanthin là cần thiết để đạt được mật độ tế bào và hàm lượng astaxanthin cao.

Hiện nay, có 2 quy trình công nghệ nuôi trồng được áp dụng để sản xuất astaxanthin từ *H. pluvialis* là quy trình nuôi cấy một pha và hai pha. Tuy nhiên, mật độ tế bào vi tảo đạt được theo mô hình một pha là rất thấp [17]. Quy trình nuôi cấy hai pha trong đó ở pha đầu tảo được nuôi cấy dưới điều kiện tối ưu để đạt mật độ tế bào cực đại, sau đó chuyển tảo vào pha sau với các điều kiện thuận lợi cho sự tích lũy astaxanthin đã được chứng minh là hiệu quả và

phù hợp để sản xuất astaxanthin ở quy mô thương mại [10]. Việc tăng mật độ tế bào vi tảo trong pha đầu góp phần quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả sản xuất astaxanthin từ *H. pluvialis* [11, 12]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả đạt được trong việc nuôi cấy *H. pluvialis* mật độ cao trong bình nhựa thể tích 10 lít bằng cách kết hợp các yếu tố như nồng độ nitrate cao, chế độ chiếu sáng và làm mới môi trường trong quá trình nuôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng tảo và điều kiện lưu giữ

Chủng vi tảo *Haematococcus pluvialis* Flotow sử dụng trong nghiên cứu được phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học phân lập tại tỉnh Hòa Bình, Việt Nam năm 2009. Tảo được lưu giữ và nhân giống sơ cấp trong môi trường C có thành phần như trong công bố của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2010) [11]; cường độ chiếu sáng 2,5 klux, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ ở 25°C.

Phương pháp

Ảnh hưởng của nồng độ nitrate lên sự sinh trưởng của H. pluvialis

H. pluvialis Flotow nuôi cấy trong môi trường C có các tế bào chủ yếu ở trạng thái sinh dưỡng (chiếm 80-90% so với tổng số tế bào) được sử dụng làm giống ban đầu của thí nghiệm. Dịch tảo được ly tâm ở 6.000 v/p trong 5 phút để thu tế bào, sau đó hòa tan sinh khối tế bào vào môi trường thí nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành ở bình nhựa 10 lít chứa 4 lít môi trường với mật độ tảo ban đầu là $0,5-0,6 \times 10^6$ tế bào (TB)/ml, sục khí 5 lít/phút, cường độ chiếu sáng 2,5 klux, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ và nhiệt độ được duy trì ổn định ở $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Sự sinh trưởng của *H. pluvialis* được so sánh trong 2 loại môi trường có nồng độ nitrate khác nhau: (1) đối chứng là môi trường RM có chứa 300 mg/l NaNO_3 [11] được kí hiệu là RM-1X; (2) môi trường RM có nồng độ nitrate tăng gấp 4 lần (hàm lượng NaNO_3 tăng từ 300 mg/l lên 1200 mg/l) và các thành phần còn lại giữ nguyên được ký hiệu là RM -4X. Sinh trưởng của tảo được đánh giá thông qua mật độ tế bào.

Ảnh hưởng kết hợp của chế độ chiếu sáng và nồng độ nitrate lên sinh trưởng của H. pluvialis

Thí nghiệm được tiến hành ở bình nhựa 10 lít chứa 4 lít môi trường với mật độ tế bào ban đầu $0,5-0,6 \times 10^6$ TB/ml, chế độ sục khí 5 phút/lít, nhiệt độ được duy trì ổn định ở $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* được so sánh trong 3 công thức: (1) ĐC: tảo được nuôi cấy trong môi trường RM -4X, cường độ chiếu sáng 2,5 klux, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ; (2) TN: tảo được nuôi cấy trong môi trường RM -4X, cường độ chiếu sáng 4,3 klux, chu kỳ sáng tối 16:8 giờ; (3) TN+UV: tảo được nuôi cấy trong môi trường RM -4X, chiếu kết hợp ánh sáng trắng (4,3 klux) và UV (1,4 klux), chu kỳ sáng tối 16:8 giờ theo thứ tự sau: 5 giờ chiếu ánh sáng trắng, 6 giờ chiếu ánh sáng trắng kết hợp UV và cuối cùng là 5 giờ chiếu ánh sáng trắng.

Bắt đầu từ ngày nuôi thứ 15, 500 ml dịch nuôi tảo ở cả 3 công thức được rút ra hàng ngày, ly tâm loại bỏ môi trường và tế bào thu hồi được hòa tan trở lại vào bình nuôi ban đầu, đồng thời bổ sung thêm 500 ml môi trường RM-4X mới. Việc bổ sung môi trường mới theo cách nêu trên tương đương với phương pháp nuôi trồng theo kiểu “perfusion”.

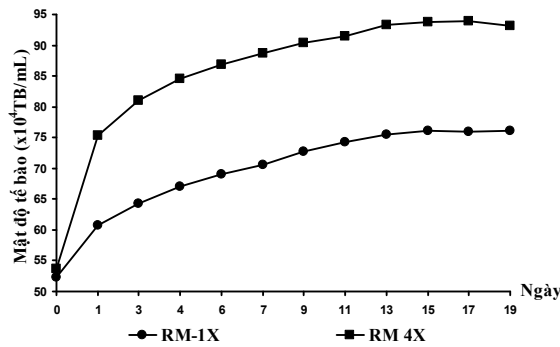
Sinh trưởng của tế bào tảo được đánh giá thông qua mật độ tế bào, hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, astaxanthin) và protein nội bào. Hàm lượng sắc tố và protein nội bào được xác định theo công bố của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2010), Đinh Đức Hoàng và nnk. (2011) [11, 12].

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và thống kê ANOVA một thành phần.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ nitrate lên sinh trưởng của H. pluvialis

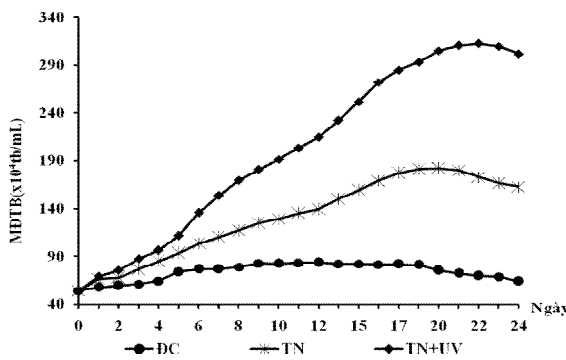
Theo công bố của nhiều tác giả trên thế giới thì nitrate đã được xem là một trong những nguồn nitơ tốt nhất cho sinh trưởng của *H. pluvialis* [23]. Đồng thời, nồng độ nitrate thích hợp trong môi trường cũng giúp kéo dài trạng thái sinh dưỡng của tế bào vi tảo [19]. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành so sánh sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường RM có nồng độ NaNO_3 300 mg/l (RM-1X) và 1.200 mg/l (RM-4X). Kết quả nghiên cứu được chỉ ra trên hình 1.



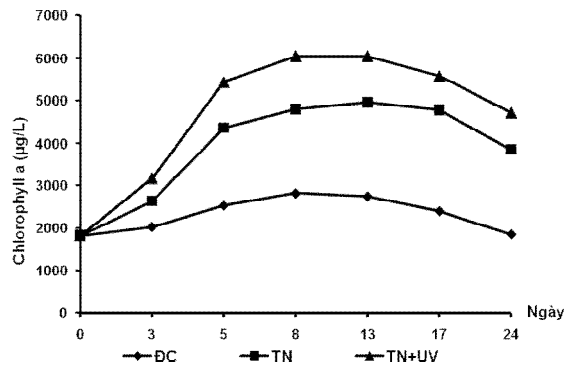
Hình 1. Thay đổi mật độ tế bào của tảo *H. pluvialis* khi được nuôi cấy trong môi trường (RM-1X) và RM-4X

Kết quả được chỉ ra trên hình 1 đã cho thấy, trong môi trường RM-1X (công thức đối chứng), mật độ tế bào *H. pluvialis* đạt cao nhất là $0,76 \times 10^6$ TB/ml sau 15 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, *H. pluvialis* sinh trưởng trong môi

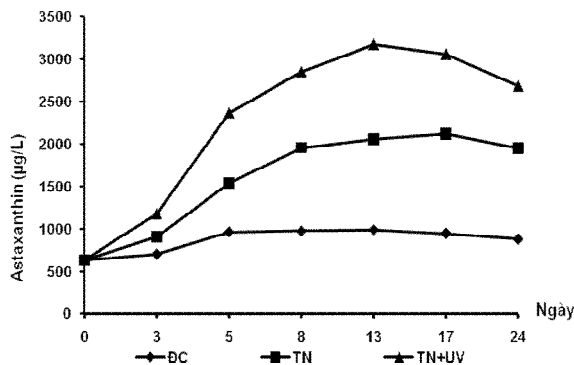
trường RM-4X đạt mật độ cao nhất là $0,95 \times 10^6$ TB/ml sau 17 ngày nuôi cấy. Như vậy, việc tăng nồng độ nitrate trong môi trường nuôi đã kích thích sự sinh trưởng của vi tảo và làm tăng mật độ tế bào cực đại lên 25%.



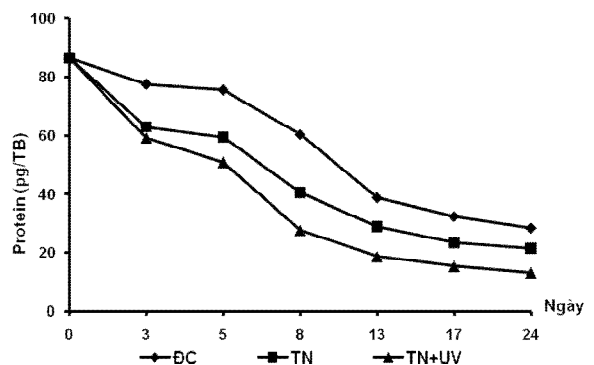
Hình 2. Thay đổi mật độ tế bào của *H. pluvialis* khi được nuôi cấy ở các chế độ chiếu sáng khác nhau



Hình 3. Thay đổi hàm lượng chlorophyll a của *H. pluvialis* khi được nuôi cấy ở các chế độ chiếu sáng khác nhau



Hình 4. Thay đổi hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* khi được nuôi cấy ở các chế độ chiếu sáng khác nhau



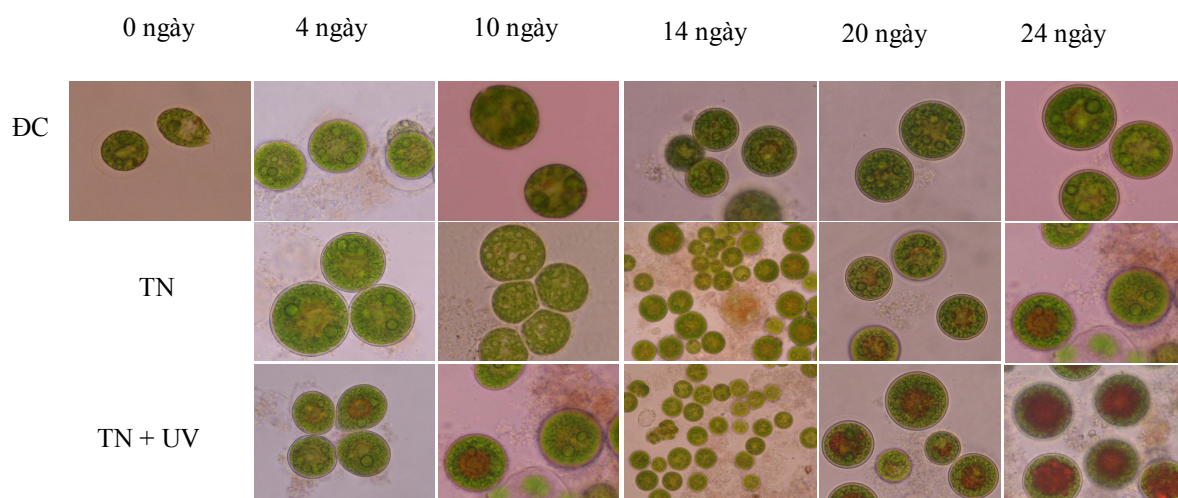
Hình 5. Thay đổi hàm lượng protein của *H. pluvialis* khi được nuôi cấy ở các chế độ chiếu sáng khác nhau

Ảnh hưởng kết hợp của chế độ chiếu sáng và nồng độ nitrate lên sinh trưởng của H. pluvialis

Trong quy trình nuôi cấy hai pha, việc tăng tối đa mật độ tế bào cực đại của *H. pluvialis* trong pha đầu đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả sản xuất astaxanthin từ loài vi tảo này. Tuy nhiên, dưới các điều kiện nuôi cấy thông thường rất khó đạt mật độ tế bào tảo cao. Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để tìm ra điều kiện thích hợp nhất cho sinh trưởng của *H. pluvialis* như tối ưu nguồn nitơ, cường độ ánh sáng, tốc độ sục khí [7] hay nuôi cấy theo phương thức dị dưỡng [13], tạp dưỡng [10]... Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã kết hợp các điều kiện như nồng độ nitrate cao trong môi trường, điều chỉnh chế độ chiếu sáng (bao gồm quang chu kỳ, chất lượng ánh sáng khác nhau) và làm mới môi trường trong quá trình nuôi để làm tăng mật độ cực đại của *H. pluvialis* trong bình hờ 10 lít. Kết quả về mật độ tế bào, hàm lượng chlorophyll a, astaxanthin, protein nội bào và sự thay đổi hình thái tế bào ở 3 công thức (cùng có hàm lượng nitrate cao và làm mới môi trường

trong quá trình nuôi) có chế độ chiếu sáng khác nhau được chỉ ra trên hình 2, 3, 4, 5 và 6.

Kết quả được chỉ ra trên hình 2 cho thấy, công thức thí nghiệm chiếu ánh sáng trắng kết hợp với UV (TN+UV) cho mật độ tế bào *H. pluvialis* đạt cao nhất với giá trị là $3,2 \times 10^6$ TB/ml sau 22 ngày nuôi cấy. Ở các công thức chiếu sáng với chu kỳ sáng tối 12:12 (ĐC) và công thức chiếu sáng với cường độ cao (4,3 klux), chu kỳ sáng tối 16:8 (TN), mật độ tế bào cực đại đạt tương ứng là $0,9 \times 10^6$ TB/ml và $1,8 \times 10^6$ TB/ml sau 19 ngày nuôi cấy. Như vậy, việc tăng cường độ chiếu sáng từ 2,5 lên 5,7 klux, kéo dài thời gian chiếu sáng từ 12 lên 16 giờ và chiếu kết hợp UV đã có hiệu quả tích cực đến sự tăng mật độ tế bào cực đại của *H. pluvialis* (tăng lên 3,6 lần, từ $0,9 \times 10^6$ TB/ml lên $3,2 \times 10^6$ TB/ml). Đồng thời, chế độ chiếu ánh sáng cao kết hợp với UV khi môi trường nuôi có hàm lượng nitrate cao cũng không gây biến dị đến hình dạng tế bào vi tảo. Sự không khác biệt về hình thái tế bào giữa các công thức thí nghiệm được thể hiện rõ trên hình 6.



Hình 6. Hình thái tế bào *H. pluvialis* ở các công thức chiếu sáng khác nhau dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại $\times 400$ lần

Kết quả nghiên cứu được chỉ ra trên hình 3 đã cho thấy, hàm lượng chlorophyll a đạt cực đại ở công thức TN+UV là $6.000 \mu\text{g/L}$ sau 13 ngày nuôi cấy và giảm dần ở các ngày tiếp theo. Ở các công thức ĐC và TN, hàm lượng chlorophyll a đạt cực đại tương ứng là $4.700 \mu\text{g/L}$ sau 17 ngày nuôi và $2.800 \mu\text{g/L}$ sau 8

ngày nuôi. Hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* ở công thức TN+UV đạt cực đại là $3.200 \mu\text{g/L}$ sau 13 ngày nuôi cấy và ở công thức TN và ĐC đạt cực đại tương ứng là $2.100 \mu\text{g/L}$ và $1.000 \mu\text{g/L}$ sau 24 ngày nuôi cấy (hình 4). Khác với xu hướng thay đổi của mật độ tế bào, hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin, hàm

lượng protein nội bào có xu hướng giảm dần trong quá trình nuôi. Hàm lượng protein nội bào giảm từ 86 pg/TB (0 ngày) xuống 17, 25, 37 pg/TB, tương ứng với các công thức thí nghiệm TN+UV, TN và ĐC sau 24 ngày nuôi (hình 5).

Nhiều công bố đã cho thấy, tia UV có ảnh hưởng quan trọng lên một số quá trình sinh hóa của tế bào tảo [3, 9, 21]. Các tác động có hại của tia UV bao gồm ức chế sinh trưởng, gây sai hỏng ADN và protein, ức chế quá trình hấp thu dinh dưỡng [8]... Tuy nhiên, bên cạnh đó các tác động có lợi của tia UV như trợ giúp sửa chữa ADN sai hỏng, tăng cường cố định cacbon và tăng cường quá trình quang hợp cũng đã được công bố [15]. Nghiên cứu của Pasini et al. (2011) [18] đã cho thấy, ở *Ulva rigida* (Chlorophyta) hàm lượng nitrate cao đã có vai trò làm giảm các ảnh hưởng bất lợi của tia UV và làm tăng khả năng phục hồi của các enzym trao đổi chất chìa khóa. Đối với *Fucus spiralis*, tia UV cũng giúp tăng cường quá trình quang hợp và kích thích sự hoạt động của hai enzym carbonic anhydrase và nitrate reductase [22]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sinh trưởng của *H. pluvialis* cũng đã tăng lên đáng kể khi được nuôi cấy trong môi trường có hàm lượng nitrate cao (1200 mg/l) và chiếu kết hợp tia UV. Mật độ cực đại của tảo đã tăng 3,6 lần so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu này cung cấp thêm những số liệu khoa học về tác động có lợi của tia UV khi môi trường nuôi có hàm lượng nitrate cao lên sinh trưởng của vi tảo *Haematococcus pluvialis*.

Vấn đề mấu chốt để đạt mật độ tế bào cao trong quá trình nuôi cấy *H. pluvialis* là phải duy trì tế bào ở trạng thái sinh dưỡng trong một thời gian dài [10]. Với mục tiêu như vậy, chúng tôi đã kết hợp nhiều yếu tố như tăng nồng độ nitrate, làm mới môi trường nuôi và điều chỉnh chế độ chiếu sáng trong quá trình nuôi *H. pluvialis* và đã thành công trong việc nâng cao mật độ của tảo lên $3,2 \times 10^6$ TB/ml. Đây là những kết quả nghiên cứu mới đối với Việt Nam. Các phương án tiếp theo nhằm nâng cao hơn nữa mật độ tế bào cực đại của *H. pluvialis* sẽ được chúng tôi công bố trong những công trình nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu nêu trên, chúng tôi rút ra một số kết luận:

Việc tăng nồng độ nitrate trong môi trường RM lên gấp 4 lần (nồng độ NaNO_3 tăng từ 300 mg/l (RM-1X) lên 1200 mg/l (RM-4X)) đã kích thích sinh trưởng của vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* và làm tăng mật độ tế bào cực đại lên 25% (từ $0,76 \times 10^6$ TB/ml ở RM-1X lên $0,95 \times 10^6$ TB/ml - RM -4X).

Bằng cách tăng nồng độ nitrate trong môi trường, điều chỉnh chế độ chiếu sáng và làm mới môi trường trong quá trình nuôi, mật độ tế bào cực đại của *H. pluvialis* trong bình hờ thể tích 10 lít đã tăng lên đáng kể. Mật độ tế bào cực đại của *H. pluvialis* đạt cao nhất là $3,2 \times 10^6$ TB/ml sau 22 ngày nuôi khi tảo được nuôi cấy trong môi trường RM -4X, chiếu kết hợp ánh sáng trắng (cường độ 4,3 klux) và UV (cường độ 1,4 klux), chu kỳ sáng tối 16:8 giờ trong đó thời gian chiếu ánh sáng trắng là 10 giờ và thời gian chiếu ánh sáng trắng kết hợp UV là 6 giờ. Trong khi đó, ở công thức chiếu sáng với cường độ 2,5 klux, chu kỳ sáng tối 12:12 và công thức chiếu sáng với cường độ cao (4,3 klux), chu kỳ sáng tối 16:8 giờ, mật độ tế bào cực đại chỉ đạt được tương ứng là $0,9 \times 10^6$ TB/ml và $1,8 \times 10^6$ TB/ml sau 19 ngày nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu công nghệ nuôi vi tảo *Haematococcus pluvialis* và công nghệ chiết xuất astaxanthin” cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn thuộc chương trình công nghệ sinh học trong thủy sản năm 2010-2012.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bon J. A., Leathers T. D., Jayaswal R. K., 1997. Isolation of astaxanthin overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Lett., 19: 109-112.
2. Borowitzka M. A., Huisman J. M., Osborn A., 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*, 1. Effects of nutrients on growth and cell type. J. Appl. Phycol., 8: 15-19.
3. Britt A. B., 2004. Repair of DNA damage induced by solar UV. Photosynth. Res., 81: 105-121.

4. Chumpolkukwong N., Kakizono T., Nagai S., Nishio N., 1997. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. J. Ferment. Bioengng., 83: 429-434.
5. Cordero B., Patino M., Arredondo B. O., Fabregas J., 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. Biotechnol. Lett., 18: 213-218.
6. Fan L., Vonshak A., Gabbay R., Hirshberg J., Cohen Z., Boussiba S., 1995. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. Plant Cell Physiol., 36: 1519-1524.
7. Goksan T., Ak I., Kihc C., 2011. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11: 377-383.
8. Guan W. and Gao K., 2008. Light histories influence the impacts of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and growth in a marine diatom, *Skeletonema costatum*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 91: 151-156.
9. Guan W. C., Li P., Jian J. B., Wang J. Y., Lu S. H., 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on photochemical efficiency of *Chaetoceros curvisetus* (Bacillariophyceae). Acta Physiol. Plant., 33: 979-986.
10. Hata N., Ogbonna J. C., Hasegawa Y., Taroda H. and Tanaka H., 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. J. Appl. Phycol., 13: 395-402.
11. Đặng Diễm Hồng, Đinh Đức Hoàng, Nguyễn Thị Thủy, Hoàng Thị Lan Anh, 2010. Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi trồng vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* giàu astaxanthin. Tạp chí Sinh học, 32(2): 43-53).
12. Đinh Đức Hoàng, Lưu Thị Tâm, Nguyễn Thị Thủy, Đặng Diễm Hồng, 2011. Nghiên cứu sự thay đổi hình thái tế bào, hàm lượng sắc tố và protein nội bào trong vòng đời của vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tạp chí Sinh học, 33(1): 59-66.
13. Kobayashi M., Kakizono T., Yamaguchi K., Nishio N., Nagai S., 1992. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. J. Ferment. Bioengng., 74: 17-20.
14. Lorenz R. T., Cysewski G. R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. TibTech., 18: 160-167.
15. Mengelt C., Prezelin B. B., 2005. UV-A enhancement of carbon fixation and resilience to UV inhibition in the genus *Pseudo-nitzschia* may provide a competitive advantage in high UV surface waters. Mar. Ecol. Prog. Ser., 301: 81-93.
16. Miki W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure. Appl. Chem., 63: 141-146.
17. Olaizola M., 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. J. Appl. Phycol., 12: 499-506.
18. Pasini A. C., Carranza V. M., Abdala R., Korbee N., Figueroa F. L., 2011. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). J. Appl. Phycol., 23: 363-369.
19. Ranjbar R., Inoue R., Shiraishi H., Katsuda T., Katoh S., 2008. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. Biochemical Engineering Journal, 39: 575-580.
20. Suh I. S., Joo H. N., Lee C. G., 2006. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. Journal of Biotechnology, 125: 540-546.

21. Vass I., Kirilovsky D., Perewoska I., Mate Z., Nagy F., Etienne A., 2000. UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the *psbA2* and *psbA3* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.*, 267: 2640-2648.
22. Vinegla B., Segovia M., Figueroa F., 2006. Effect of artificial UV radiation on carbon and nitrogen metabolism in the macroalgae *Fucus spiralis* L. and *Ulva olivascens* Dangeard. *Hydrobiologia*, 560: 31-42.
23. Yuan J. P. and Chen F., 2001. Indirect photometric ion chromatographic analysis of anions in *Haematococcus pluvialis* culture media. *Biotechnol. Lett.*, 23: 757-760.

**COMBINED EFFECTS OF NITRATE CONCENTRATION AND
ILLUMINATION CONDITIONS ON THE GROWTH OF MICROALGA
*HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

**Dang Diem Hong, Dinh Thi Ngoc Mai, Bui Dinh Lam, Luu Thi Tam, Nguyen Thi Thu Thuy,
Nguyen Cam Ha, Le Thi Thom, Dinh Duc Hoang, Hoang Lan Anh, Ngo Thi Hoai Thu**

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Astaxanthin (3, 3'- dihydroxy β , β carotene - 4,4 - dione) is a biologically active pigment with applications in aquaculture, nutraceutical, pharmaceutical, and food industries. Although astaxanthin can be synthesized by plants, bacteria, a few fungi, and green algae, the amounts produced by the green microalga *Haematococcus pluvialis* surpass any other reported source. However, this microalga is not easily commercially cultivated because of the low cell growth rate, sensitivity of the cells to high hydrodynamic stress and changes in cell morphology under various environmental conditions. This work aimed to investigate the combined effects of nitrate concentration and illumination conditions on the cultivation of vegetative cells *Haematococcus pluvialis* to achieve high cell density. A 25% increase in the maximum cell density was observed as the NaNO_3 concentration in RM medium increased from 300 to 1200 mg/l. In addition, the obtained results also shown that the perfusion culture process plus increasing of nitrate concentration and controlling illumination conditions is an effective strategy for high-density cultivation of *H. pluvialis*. The maximum cell density of 3.2×10^6 cells/ml on the 22nd day yielded from a culture illuminated with 16 h light/ 8 h dark cycle in which time of illumination by fluorescent lamps is 10 hours and time of combined illumination by fluorescent lamps and UV lamps is 6 hours. The highest cell density of the culture illuminated with fluorescent lamps 2.5 klux for 12 h per day and the culture illuminated with fluorescent lamps 4.3 klux for 16 h per day reached 0.9×10^6 cells/ml and 1.8×10^6 cells/ml after 19 days of cultivation, respectively.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin, illumination conditions, nitrate, perfusion culture.

Ngày nhận bài: 18-5-2012