

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ NITRATE LÊN SINH TRƯỞNG CỦA VI TẢO LỤC *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

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

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *ddhong60vn@yahoo.com

TÓM TẮT: Astaxanthin là một sắc tố tự nhiên được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản, công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và thực phẩm chức năng. Nhiều vi sinh vật như nấm, địa y, vi khuẩn cũng có khả năng tổng hợp astaxanthin nhưng vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* được xem là đối tượng tiềm năng nhất cho sản xuất astaxanthin thương mại. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nitrate trong môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng của *H. pluvialis* ở cấp độ bình tam giác 250 ml. Các nồng độ nitrate thí nghiệm gồm 219, 438, 876, 1314, 1752, 2190 mg/L, trong đó nồng độ nitrate 876 mg/L (tức nồng độ nitrate cao gấp 4 lần so với môi trường RM cơ bản) được xác định là thích hợp nhất cho sinh trưởng của loài vi tảo này. Tại nồng độ nitrate thích hợp nêu trên, mật độ tế bào, hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin đạt cao nhất là $1,74 \times 10^6$ TB/ml, 2081 $\mu\text{g/L}$, 1053 $\mu\text{g/L}$, tương ứng. Tỷ lệ tế bào sinh dưỡng ở nồng độ nitrate này cao hơn so với các nồng độ khác và hàm lượng protein có xu hướng giảm dần theo thời gian nuôi cấy ở tất cả các công thức thí nghiệm.

Từ khóa: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, nồng độ nitrate, nuôi cấy hai pha, vi tảo.

MỞ ĐẦU

Astaxanthin là một sắc tố tự nhiên thuộc họ carotenoit và chúng là một trong số những carotenoit chính được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản [15]. Bên cạnh vai trò làm chất tạo màu cho các động vật thủy sinh, đặc biệt là cá hồi và cá cảnh, sắc tố này còn có một số hoạt tính sinh học quan trọng khác bao gồm hoạt tính chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch và chống ung thư [9, 20]. Hiện nay, hầu hết astaxanthin thương mại là các sản phẩm tổng hợp hóa học. Tuy nhiên, do nhu cầu sử dụng các sản phẩm tự nhiên tăng nhanh và giá thành cao của các sản phẩm nhân tạo nên việc tìm kiếm và khai thác nguồn astaxanthin tự nhiên đang được đặc biệt quan tâm [14]. Trong số những sinh vật tích lũy astaxanthin thì vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* được xem là đối tượng tiềm năng nhất [1].

Sự tổng hợp astaxanthin ở *H. pluvialis* liên quan đến quá trình giảm hoặc ngừng sinh trưởng và chuyển trạng thái tế bào từ dạng sinh dưỡng sang dạng bào xác [21]. Mặc dù tính khả thi của công nghệ nuôi trồng một pha cho sản xuất astaxanthin đã được chứng minh [5] nhưng quy trình phổ biến nhất hiện nay được áp dụng

là sự tách biệt của pha sản xuất sinh khối và tích lũy astaxanthin. Sự tích lũy astaxanthin có thể được cảm ứng trong các điều kiện như thiếu hụt nitơ, photpho, dư thừa acetate, cường độ ánh sáng cao hoặc bổ sung các tiền chất carotenoit khác nhau [10, 11, 18, 22]. Trong khi đó, nuôi cấy *H. pluvialis* mật độ cao có thể đạt được bằng cách tối ưu môi trường và điều kiện nuôi cấy [19]. *H. pluvialis* có tốc độ sinh trưởng thấp và tế bào sinh dưỡng dễ dàng chuyển sang dạng bào xác tích lũy astaxanthin khi điều kiện môi trường không thuận lợi. Vì vậy, nuôi cấy *H. pluvialis* mật độ cao vẫn đang là thách thức lớn đối với các nhà nghiên cứu.

Bên cạnh nhiệt độ và ánh sáng thì nguồn dinh dưỡng (bao gồm nitơ) cũng có ảnh hưởng quan trọng lên sinh trưởng của *H. pluvialis*. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nitrate trong môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng của loài vi tảo này ở cấp độ bình tam giác 250 ml. Đây được xem là cách tiếp cận phổ biến và hiệu quả để tìm ra điều kiện tối ưu nhất cho sinh trưởng của tảo.

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 và RM, cường độ chiếu sáng 2 klux, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ ở 25°C. Thành phần môi trường C và RM theo công bố của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2010) [13].

Phương pháp

Haematococcus pluvialis nuôi cấy trong môi trường C và RM có các tế bào ở trạng thái sinh dưỡng chiếm 80-90% tổng số tế bào được sử dụng làm giống ban đầu của thí nghiệm. Dịch tảo được ly tâm ở 6000 v/p trong 5 phút để thu tế bào, sau đó hòa tan sinh khối tế bào vào môi trường RM có các nồng độ nitrate khác nhau. Thí nghiệm được tiến hành ở cấp độ bình tam giác 250 ml chứa 150 ml môi trường với mật độ tảo ban đầu là $0,5-0,6 \times 10^6$ tế bào (TB)/ml, nhiệt độ 25°C, cường độ chiếu sáng 2,5 klux, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ. Sinh trưởng của tảo được so sánh trong môi trường RM với các nồng độ nitrate khác nhau. Đối chứng là môi trường RM cơ bản có thành phần như sau (mg/L): NaNO_3 -300, K_2HPO_4 -80, KH_2PO_4 -20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -10, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -58,5, Na_2EDTA -7,5, Na_2CO_3 -20, H_3BO_3 -0,3, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -1,5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,3, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,26, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -17 (tương ứng với nồng độ nitrate là 219 mg/L, được kí hiệu là RM-[NO₃]-1X). Các môi trường thí nghiệm có nồng độ nitrate cao gấp 2 lần - 438 mg/L (được kí hiệu là RM-[NO₃]-2X), 4 lần-876 mg/L (được kí hiệu là RM-[NO₃]-4X), 6 lần-1314 mg/L (được kí hiệu là RM-[NO₃]-6X), 8 lần-1752 mg/L (được kí hiệu là RM-[NO₃]-8X) và 10 lần-2190 mg/L (được kí hiệu là RM-[NO₃]-10X) so với đối chứng.

Các thông số hàm lượng chlorophyll a, astaxanthin và protein nội bào được xác định theo công bố của Đinh Đức Hoàng và nnk. (2011), Đặng Diễm Hồng và nnk. (2010) [12, 13].

Các số liệu thu được của 3 lần lặp lại thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và phân tích biến động sai số (ANOVA) một thành phần với mức ý nghĩa $P < 0,05$.

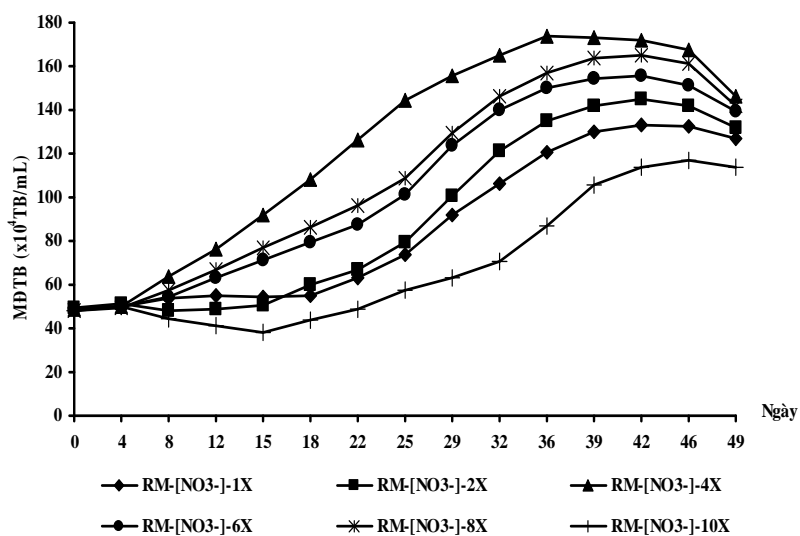
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Một số nghiên cứu cho thấy, nồng độ nitrate thích hợp trong môi trường nuôi cấy giúp kéo dài trạng thái sinh dưỡng của tế bào *H. pluvialis* [17]. Mặc dù các tế bào dạng bào xác cũng có khả năng sinh trưởng bằng cách tăng kích thước tế bào nhưng tốc độ phân chia của chúng chậm hơn nhiều so với dạng sinh dưỡng. Vì vậy có thể thấy rằng, nồng độ nitrate có ảnh hưởng quan trọng đến tốc độ phân chia tế bào của *H. pluvialis*. Việc xác định nồng độ nitrate tối ưu cho sinh trưởng của *H. pluvialis* được xem là một trong những giải pháp hiệu quả để nâng cao mật độ tế bào cực đại trong nuôi cấy loài vi tảo này.

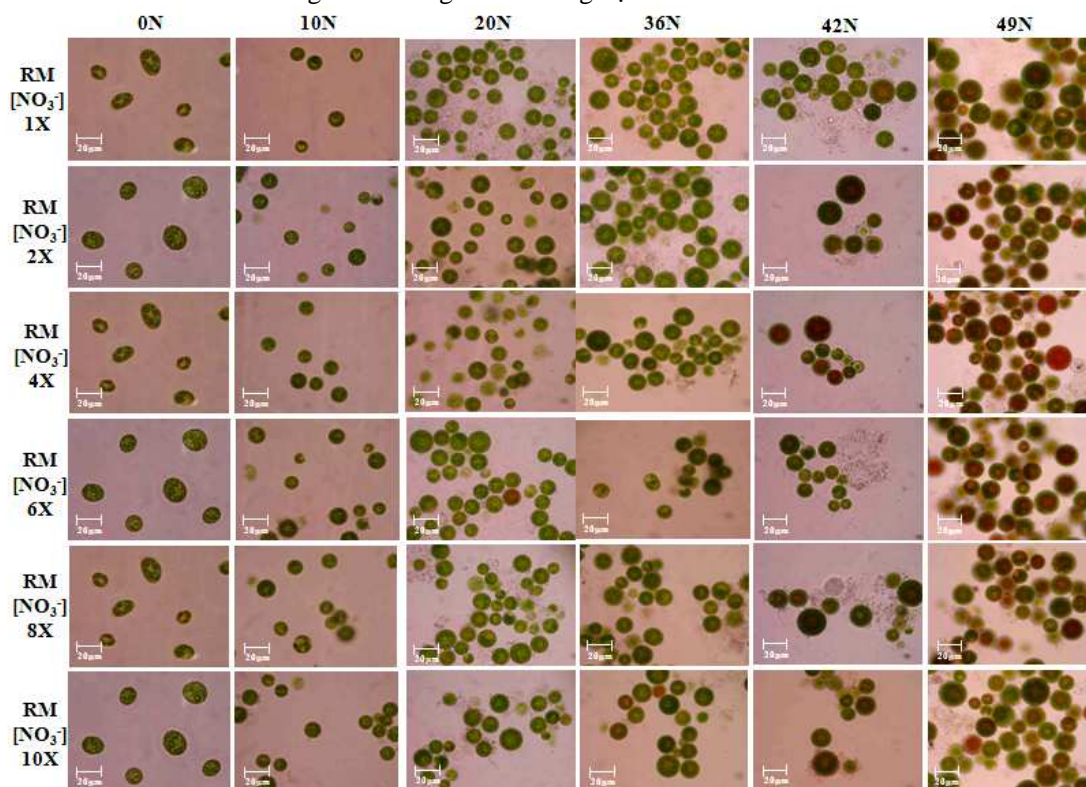
Sinh trưởng của *H. pluvialis* được so sánh trong các môi trường có nồng độ nitrate khác nhau (từ 219 mg/L đến 2190 mg/L). Kết quả nghiên cứu thu được về mật độ và sự thay đổi hình thái tế bào của tảo này được chỉ ra trên hình 1 và 2.

Kết quả nghiên cứu thu được được trình bày trên hình 1 đã cho thấy, mật độ tế bào *H. pluvialis* đạt cao nhất là $1,74 \times 10^6$ TB/ml sau 36 ngày nuôi cấy khi nồng độ nitrate trong môi trường là 876 mg/L (công thức RM [N03]-4X). Trong môi trường có nồng độ nitrate là 219, 438, 1314, 1752, 2190 mg/L (ký hiệu RM - [N03]- 1X, RM -[N03]- 2X, RM -[N03]- 6X, RM -[N03]- 8X, RM -[N03]- 10X, tương ứng), mật độ tế bào cực đại đạt được tương ứng là $1,33 \times 10^6$, $1,45 \times 10^6$, $1,56 \times 10^6$, $1,65 \times 10^6$, $1,14 \times 10^6$ TB/ml sau 42 ngày nuôi cấy. Như vậy, nuôi cấy *H. pluvialis* trong môi trường có nồng độ nitrate cao gấp 4 lần môi trường RM cơ bản (876 mg/L) cho mật độ tế bào cực đại cao nhất và thời gian đạt cực đại ngắn nhất so với các công thức thí nghiệm khác. Mật độ tế bào cực đại đạt được không tăng tuyến tính với sự tăng nồng độ nitrate và nồng độ nitrate 876 mg/L là thích hợp nhất cho sinh trưởng của chủng tảo *H. pluvialis* nghiên cứu và được xem là nồng độ bão hòa đối với chủng này. So sánh với các nghiên cứu trước của chúng tôi về nghiên cứu vòng đời và lựa chọn môi trường tối ưu cho nuôi trồng *H. pluvialis* [12, 13] thì trong nghiên cứu này mật độ tế bào cực đại đạt được trong môi trường RM là cao hơn ($1,33 \times 10^6$ so với $0,5 \times 10^6$ TB/mL). Sự khác biệt này là

do sự khác nhau về mật độ tế bào ban đầu $0,06 \times 10^6$ TB/ml ở các thí nghiệm của các tác giả khác [12, 13].



Hình 1. Thay đổi mật độ tế bào (MĐTĐ) của vi tảo *H. pluvialis* khi được nuôi cấy trong môi trường có các nồng độ nitrate khác nhau

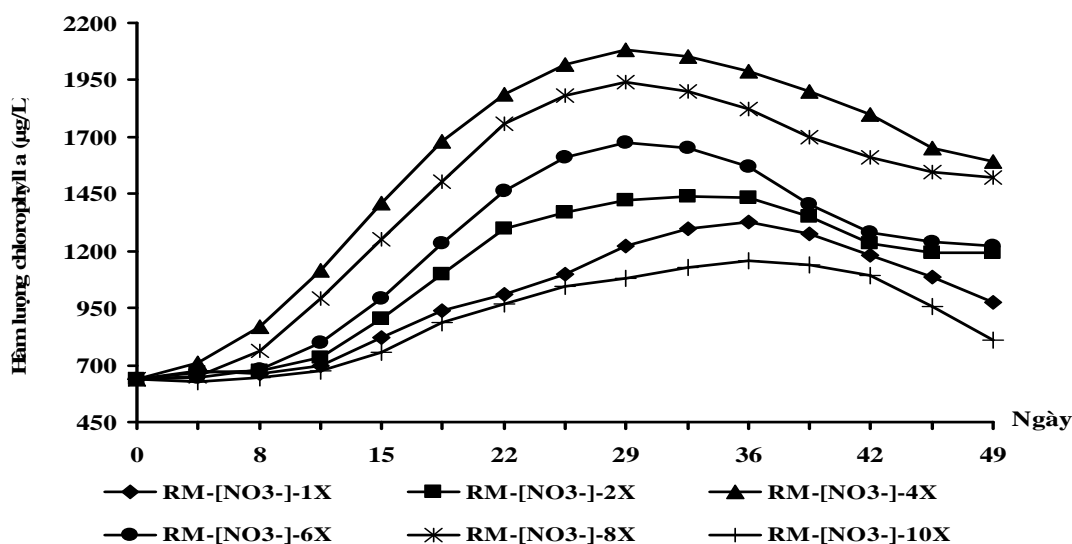


Hình 2. Hình thái tế bào vi tảo *H. pluvialis* trong các môi trường nuôi có nồng độ nitrate khác nhau dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần

Các quan sát về hình thái tế bào *H. pluvialis* theo thời gian nuôi cấy (hình 2) cũng cho thấy, ở nồng độ nitrate 876 mg/L (RM-[N03]-4X), tỷ lệ tế bào sinh dưỡng đạt được cao hơn so với các công thức khác. Các tế bào sinh dưỡng chiếm tỷ lệ cao cho đến 36 ngày nuôi cấy, sau đó chuyển dần sang dạng bào xác có tích lũy nhiều astaxanthin. Ở các công thức nitrate khác, bắt đầu từ sau 42 ngày nuôi cấy, hầu hết các tế bào đều ở dạng bào xác và sắc tố đỏ dần dần chiếm đầy tế bào.

Kết quả nghiên cứu thu được được trình bày trên hình 3 cho thấy, công thức nồng độ nitrate 876 mg/L (RM-[N03]-4X) cho hàm lượng chlorophyll a đạt cao nhất với giá trị cực đại đạt được là 2081 µg/L sau 29 ngày nuôi cấy. Trong

khi đó, ở công thức này, mật độ tế bào *H. pluvialis* đạt cao nhất sau 36 ngày nuôi. Như vậy, trong giai đoạn từ ngày thứ 29 đến 36, hàm lượng chlorophyll a giảm trong khi mật độ tế bào vẫn tăng. Điều này được giải thích có thể là do sự giảm hàm lượng chlorophyll a trong tế bào tảo *H. pluvialis* là lớn hơn so với sự tăng mật độ. Ngoài ra, cũng có thể hàm lượng chlorophyll b vẫn tăng cao trong trường hợp này nên tảo vẫn tăng mật độ tế bào. Ở các nồng độ nitrate 219, 438, 1314, 1752, 2190 mg/L (ký hiệu RM-[N03]-1X, RM-[N03]-2X, RM-[N03]-6X, RM-[N03]-8X, RM-[N03]-10X, tương ứng), hàm lượng chlorophyll a cực đại đạt được là 1328, 1432, 1570, 1823, 1157 µg/L sau 36 ngày nuôi cấy, tương ứng.



Hình 3. Thay đổi hàm lượng chlorophyll a của vi tảo *H. pluvialis* khi được nuôi cấy trong môi trường có các nồng độ nitrate khác nhau

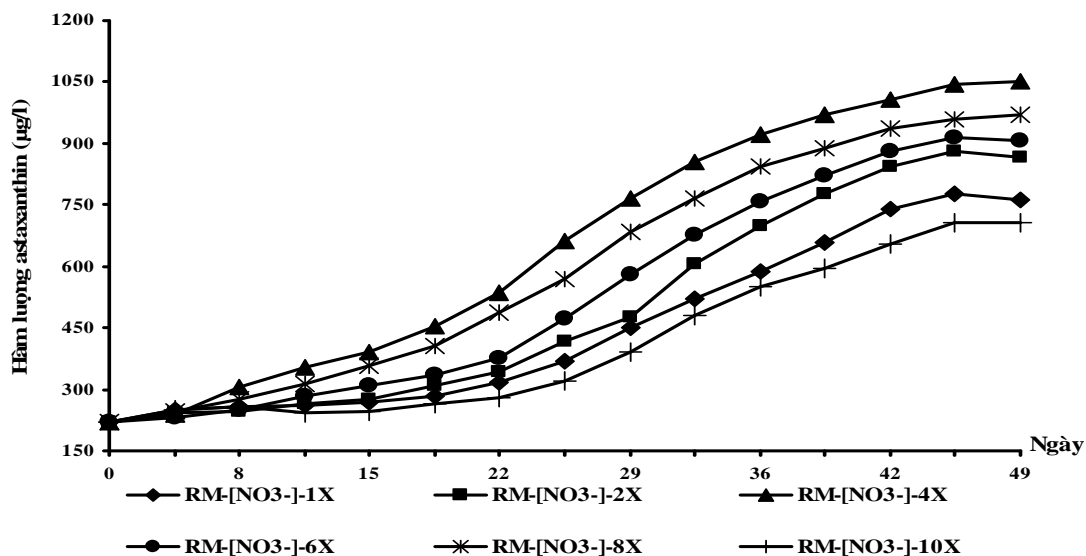
Hàm lượng astaxanthin ở tất cả các công thức nitrate khác nhau đều tăng lên theo thời gian nuôi cấy (hình 4). Sau 49 ngày nuôi, hàm lượng astaxanthin của *H. pluvialis* trong môi trường RM có nồng độ nitrate 219, 438, 876, 1314, 1752, 2190 mg/L (ký hiệu RM-[N03]-1X, RM-[N03]-2X, RM-[N03]-6X, RM-[N03]-8X, RM-[N03]-10X, tương ứng), đạt được tương ứng là 777, 882, 1053, 915, 970, 708 µg/L. Như vậy, đánh giá qua thông số hàm

lượng astaxanthin thì công thức môi trường nuôi có hàm lượng nitrate 876 mg/L vẫn đạt hàm lượng astaxanthin cao nhất.

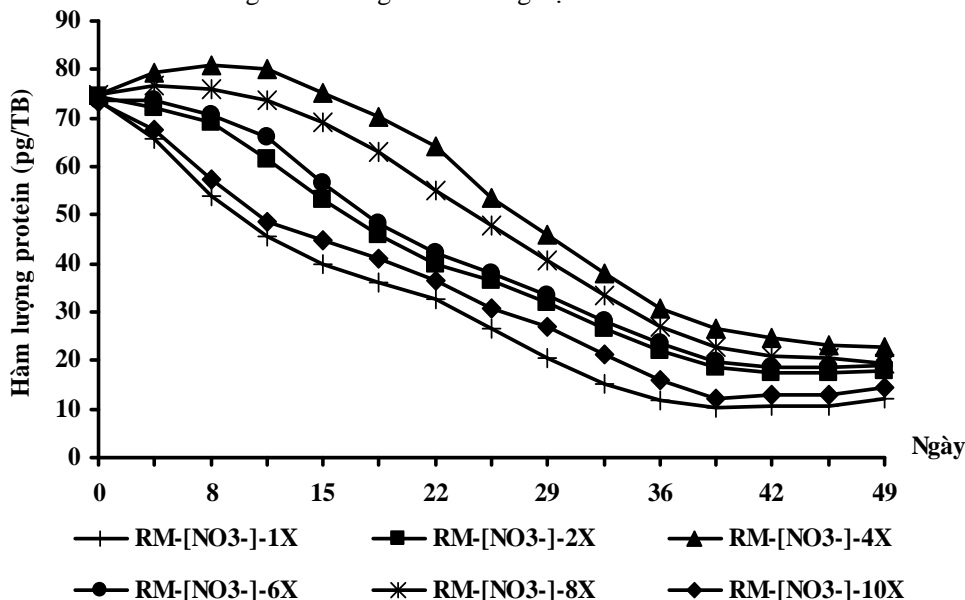
Như vậy, công thức nồng độ nitrate 876 mg/L (RM-[N03]-4X) cho mật độ tế bào, hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin đạt cao nhất. Hiện nay, quy trình nuôi cấy phổ biến để sản xuất astaxanthin thương mại từ *H. pluvialis* là nuôi cấy hai pha trong đó ở pha đầu tảo được nuôi cấy dưới điều kiện tối ưu để 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. Mục đích của nghiên cứu này của chúng tôi là xác định được hàm lượng nitrate thích hợp trong môi trường nuôi cấy để đạt mật độ tế bào cao nhất trong pha đầu và nồng độ nitrate 876 mg/L (RM-[NO₃]-4X) đã đáp ứng

được yêu cầu này. Ranjbar et al. (2008) [17] cũng đã có thông báo rằng, nhằm mục đích duy trì sự sinh trưởng sinh dưỡng của tế bào *H. pluvialis* để có được mật độ tế bào cao thì cần phải bổ sung một lượng môi trường có nồng độ đậm đặc gấp 10 lần môi trường cơ bản hoặc giữ nồng độ nitrate luôn ở mức 8 mM.



Hình 4. Thay đổi hàm lượng astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* khi được nuôi cấy trong môi trường có các nồng độ nitrate khác nhau



Hình 5. Thay đổi hàm lượng protein của vi tảo *H. pluvialis* khi được nuôi cấy trong môi trường có các nồng độ nitrate khác nhau

Ngược lại với xu hướng thay đổi của hàm lượng astaxanthin, hàm lượng protein nội bào của *H. pluvialis* giảm dần theo thời gian nuôi cấy (hình 5). Tại thời điểm 0 ngày, hàm lượng protein nội bào là 74 pg/TB. Sau 49 ngày nuôi, hàm lượng protein nội bào ở các công thức thí nghiệm có nồng độ nitrate 219, 438, 876, 1314, 1752, 2190 mg/L (ký hiệu RM -[N03]- 1X, RM -[N03]- 2X, RM -[N03]- 6X, RM -[N03]- 8X, RM -[N03]- 10X, tương ứng) giảm xuống còn 12, 18, 23, 19, 20, 14 pg/TB, tương ứng.

Nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ nitrate lên sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* cũng đã được công bố. Orosa et al. (2001) [16] nghiên cứu sự sinh trưởng của *H. pluvialis* ở các nồng độ NaNO_3 khác nhau từ 0 đến 1 g/L và sinh trưởng đạt cực đại ở nồng độ 0,15 g/L. Harker et al. (1996) [10] cũng khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaNO_3 khác nhau trong môi trường Bold's Basal Medium lên sinh trưởng của loài tảo này. Theo đó, mật độ tế bào đạt cao nhất ở nồng độ 0,25 và 0,5 g/L sau 20 và 30 ngày, tương ứng. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Goksan et al. (2011) [8] cho thấy, mật độ tế bào đạt cao nhất là $0,25 \times 10^6$ TB/ml sau 14 ngày nuôi cấy khi nồng độ nitrate trong môi trường là 1000 mg/L. Theo công bố của Dominguez-Bocanegra et al. (2004) [6] *H. pluvialis* có mật độ tế bào đạt cao nhất là $0,35 \times 10^6$ TB/ml trong môi trường BBM có nồng độ nitrate là 730 mg/L. Nghiên cứu của Del Río et al. (2005) [4] với dải nồng độ nitrate từ 105,4 mg/L đến 1283,4 mg/L cho thấy nồng độ nitrate tối ưu nhất được xác định là 806 mg/L và mật độ tế bào cực đại đạt được ở nồng độ này là $2,3 \times 10^6$ TB/ml. Một nguồn nitrate khác cũng được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng *H. pluvialis* là KNO_3 . Borowitzka et al. (1991) [2] đã công bố rằng, mật độ tế bào cực đại đạt được khi nồng độ KNO_3 từ 0,5-1,0 g/L. Chen (1997) [3] và Fabregas et al. (2000) [7] cũng đã xác định nồng độ KNO_3 tối ưu là 0,37 và 0,41 g/L, tương ứng. Như vậy, mật độ tế bào *H. pluvialis* cực đại đạt được trong nghiên cứu của chúng tôi ($1,74 \times 10^6$ TB/ml) là tương đối cao so với các công bố khác. Đồng thời, chúng tôi nhận thấy rằng, nồng độ nitrate tối ưu cho sinh trưởng của *H. pluvialis* là khác nhau giữa các điều kiện

nghiên cứu khác nhau đã được công bố. Sự không giống nhau này có thể là do sự khác nhau về chủng tảo với bản chất di truyền và nguồn gốc của chúng khác nhau tạo nên.

KẾT LUẬN

Nồng độ nitrate là một nhân tố quan trọng trong việc cảm ứng tảo *H. pluvialis* tăng sinh mật độ tế bào. Nồng độ nitrate thích hợp cho sinh trưởng của tảo là 876 mg/L (tức nồng độ nitrate cao gấp 4 lần so với môi trường RM cơ bản). Khi nuôi *H. pluvialis* trong môi trường có nồng độ nitrate 876 mg/L, giá trị mật độ tế bào cực đại đạt được cao nhất là $1,74 \times 10^6$ TB/ml sau 36 ngày nuôi. Tại nồng độ nitrate này, tỷ lệ tế bào sinh dưỡng cũng đạt cao hơn so với các công thức khác. Hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin đều đạt giá trị cao nhất là 2081 và 1053 $\mu\text{g/L}$, tương ứng. Hàm lượng protein lại có xu hướng giảm dần theo thời gian nuôi cấy ở tất cả các công thức thí nghiệm.

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 cho Phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aflalo C., Meshulam Y., Zarka A., Boussiba S., 2007. On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnol. Bioengng., 98(1): 300-305.
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., 3: 295-304.
3. Chen F., Chen H., Gong X., 1997. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions. Bioresource Technol., 62: 19-24.
4. Del Río E., Acien F. G., García-Malea M. C.,

- Rivas J., Molina-Grima E., Guerrero M. G., 2005. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Biotechnol. Bioengng.*, 91(7): 808-815.
5. Del Río E., Acien F. G., García-Malea M. C., Rivas J., Molina-Grima E., Guerrero M. G., 2008. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioengng.*, 100(2): 397-402.
 6. Dominguez-Bocanegra A.R., Guerrero L. I., Martinez J. F., Tomasini C. F., 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.*, 92: 209-214.
 7. Fabregas J., Dominguez A., Regueiro M., Maseda A., Otero A., 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 530-535.
 8. Goksan T., Ak I., Kihc C., 2011. Growth characteristic 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.
 9. Guerin M., Huntley M. E., Olaizo M., 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.*, 21: 210-216.
 10. Harker M., Tsavalos A. J., Young A. J., 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.*, 55: 207-214.
 11. Hata N., Ogonna J. C., Hasegawa Y., Taroda H., Tanaka H., 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *J. Appl. Phycol.*, 13: 395-402.
 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. 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.
 14. Lorenz R. T., G. R. Cysewski G. R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnol.*, 18(4): 160-167.
 15. Meyers S. P., 1994. Developments in world aquaculture, feed formulation, and role of carotenoid. *J. Pure. Appl. Chem.*, 66(5): 1069-1076.
 16. Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J., 2001. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnol. Lett.*, 23: 373-378.
 17. 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. *Biochem. Eng. J.*, 39: 575-580.
 18. Sarada R., Tripathi U., Ravishankar G. A., 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process. Biochem.*, 37: 623- 627.
 19. Suh I. S., Joo H. N., Lee C. G., 2006. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *J. Biotechnol.*, 125: 540-546.
 20. Tanaka T., Makita H., Ohnishi H., 1995. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring Xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Rev.*, 55: 4059-4064.

21. Tocquin P., Fratamico A., Franck F., 2012. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N:P ratio on vegetative growth. J. Appl. Phycol., 24: 365-373.
22. Wang B., Zarka A., 2003. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active protective process under high irradiance. J. Phycol., 39: 1116-1124.

**EFFECT OF NITRATE CONCENTRATION
ON GROWTH OF GREEN MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*
UNDER LABORATORY CONDITIONS**

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

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Astaxanthin is a pigment that belongs to the family of carotenoids and it is one of the major carotenoids supplied in aquaculture. In addition to its role in the coloration of aquatic animals, this pigment possesses several important bioactivities, including antioxidation, enhancement of immune response on anticancer activities. Although astaxanthin can be synthesized by plants, bacteria, a few fungi, and green algae, *Haematococcus pluvialis* is the current best source of natural astaxanthin. Although the feasibility of continuous production of astaxanthin by vegetative motile cells has been recently demonstrated, the most common production process consists in separating the biomass production phase culture and the astaxanthin accumulation phase one. In addition to light and temperature, nutrients (including N) play important role in the cell division and in the accumulation of astaxanthin of *H. pluvialis*. This work aimed to investigate effects of nitrate concentration on growth of microalga *H. pluvialis*. The highest cell density was 1.74×10^6 cells/mL after the 36th days of cultivation at RM medium contained nitrate concentration of 876 mg/L. At this concentration, the ratio of vegetative cells was higher than other nitrate concentrations. Chlorophyll a and astaxanthin contents yielded 2081 and 1053 $\mu\text{g/L}$, respectively. In addition, protein content tended to decrease during cultivation process at all tested nitrate concentrations.

Keywords: Astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, nitrate concentration, microalgae, two phase culture.

Ngày nhận bài: 28-5-2012