

LỰA CHỌN MÔI TRƯỜNG TỐI ƯU ĐỂ NUÔI TRỒNG VI TẢO LỤC *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* GIÀU ASTAXANTHIN

ĐẶNG ĐIỂM HỒNG, ĐINH ĐỨC HOÀNG,
NGUYỄN THỊ THỦY, HOÀNG THỊ LAN ANH

Viện Công nghệ sinh học

Haematococcus pluvialis là loài vi tảo nước ngọt, đơn bào, sinh sản vô tính bằng cách nhân đôi thuộc ngành Tảo lục Chlorophyta, lớp Chlorophyceae, bộ Volvocales, họ Haematococcaceae, chi *Haematococcus*. Loài tảo này có vòng đời phức tạp với 2 dạng tế bào. Trong điều kiện thuận lợi, phần lớn là các tế bào sinh dưỡng màu xanh có hai roi, có thành tế bào, kích thước từ 10-20 μm , có khả năng chuyển động. Khi điều kiện môi trường không thuận lợi (thiếu dinh dưỡng, cường độ chiếu sáng cao, nhiệt độ cao...), tế bào tảo chuyển sang dạng nang bào tử hình cầu, mất roi, không có khả năng chuyển động. Ở giai đoạn này, đường kính tế bào tảo tăng mạnh từ 10-20 μm lên 40-50 μm , thành tế bào dày và một lượng lớn astaxanthin (4-6% trọng lượng khô) có thể được tích lũy [4, 7].

Từ những năm 1930, tảo *H. pluvialis* đã được biết đến rộng rãi như là nguồn cung cấp astaxanthin tự nhiên [2]. Trong những năm gần đây, loài tảo này lại thu hút sự quan tâm nghiên cứu do nhu cầu sử dụng astaxanthin ngày một tăng cao [1]. 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 [8]. Astaxanthin được sử dụng để bổ sung vào thức ăn cho một số đối tượng nuôi trồng thủy sản (NTTS) như cá hồi, tôm hùm... nhằm tăng chất lượng thịt hoặc tạo màu sắc đẹp rực rỡ cho cá cảnh, hoặc một số loại sản phẩm mỹ phẩm, dược phẩm cho người [12].

Trên thế giới, nhiều công trình nghiên cứu về điều kiện nuôi trồng tối ưu cũng như khả năng tích lũy astaxanthin ở vi tảo *H. pluvialis* trong một số điều kiện nhất định đã được công bố [3, 4, 13]. Tuy nhiên, ở Việt Nam đến nay chưa có một công trình khoa học công bố nào về nuôi trồng thành công *H. pluvialis* trong điều

kiện phòng thí nghiệm cũng như ở qui mô lớn. Trong khi đó, nhu cầu sử dụng cá hồi trong nước đang ngày càng gia tăng. Việc nuôi cá hồi thương phẩm đang gặp rất nhiều khó khăn, vì khi sản xuất thức ăn cho cá hiện nay phải nhập chất bổ sung astaxanthin từ tảo *H. pluvialis*. Khó khăn lớn nhất gặp phải khi nuôi loài tảo này là tốc độ sinh trưởng rất chậm, chu trình sống phức tạp, chuyển qua nhiều giai đoạn khác nhau, xen kẽ giữa các tế bào chuyển động và không chuyển động... [11]. Mặt khác, để sản xuất astaxanthin một cách có hiệu quả từ *H. pluvialis* đòi hỏi một quy trình công nghệ nuôi cấy 2 pha: pha đầu, tảo được nuôi trồng trong điều kiện tối ưu, các tế bào chủ yếu ở pha sinh dưỡng, có màu xanh. Sau khi đạt mật độ nhất định, tảo được chuyển sang nuôi cấy ở pha thứ 2 bất lợi về điều kiện môi trường như đói dinh dưỡng (nitơ hoặc photpho), nhiệt độ hay cường độ chiếu sáng cao.... Lúc này, tất cả tế bào từ màu xanh chuyển sang dạng nang bào, màu đỏ và chứa chủ yếu astaxanthin [9, 11].

Bài báo này trình bày một số kết quả bước đầu lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi trồng *H. pluvialis*. Kết quả thu được sẽ làm tiền đề cho việc nhân nuôi sinh khối tảo giàu astaxanthin trên qui mô lớn nhằm sử dụng trong NTTS nói chung và làm thức ăn cho cá hồi nói riêng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng tảo và điều kiện lưu giữ

Haematococcus pluvialis Flotow phân lập tại tỉnh Hoà Bình, năm 2009 được nuôi cấy và lưu giữ trên môi trường C tại phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học ở 25°C, dưới cường độ chiếu sáng 2000 lux với chu kỳ sáng tối 12: 12 giờ.

2. Điều kiện thí nghiệm

Haematoccus pluvialis Flotow được nuôi trên môi trường C. Các tế bào ở giai đoạn sinh dưỡng, có màu xanh được ly tâm ở 9000 vòng/phút trong 10'. Dịch trên được loại bỏ, thu lấy tế bào. Các tế bào được bổ sung với mật độ ban đầu là 6×10^4 tế bào (TB)/ml vào các bình tam giác 250, 500 ml, bình nhựa 1,5 lít và 10 lít chứa 150, 350 ml, 1 và 6,5 lít, tương ứng với 4 môi trường dinh dưỡng (bảng 1) bao gồm C, BG-11 cải tiến, OHM và

RM. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Ở bình tam giác 250 và 500 ml, tảo được nuôi tĩnh (lắc tay 2 lần/ngày) và chiếu ánh sáng trắng có cường độ 2 klux (đèn huỳnh quang) với chu kỳ sáng tối là 12:12 giờ. Đối với hệ thống bình nuôi 1,5 và 10 lít, tảo được sục khí với tốc độ 5 lít/phút. Bên cạnh việc chiếu sáng tự nhiên, các hệ thống bình này còn được chiếu đèn compac để đảm bảo cường độ chiếu sáng là 2,5-3,5 klux với chu kỳ sáng tối 12: 12 giờ.

Bảng 1

Thành phần dinh dưỡng của 4 môi trường: C, BG11 cải tiến, OHM và RM sử dụng trong nghiên cứu

Thành phần môi trường	Môi trường (mg/l)			
	C	BG-11 cải tiến	OHM	RM
NaNO ₃	-	1500	-	300
K ₂ HPO ₄	-	320	-	80
KH ₂ PO ₄	-	-	-	20
Ca (NO ₃) ₂	150	-	-	-
KNO ₃	100	-	410	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	30	-
β-Na ₂ glycerolphosphate	50	-	-	-
MgSO ₄ .7 H ₂ O	40	200	246	10
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	-	36	110	58,5
Axit Citric	-	6	-	-
Ammonium ferric citrate	-	6	-	-
EDTA-Na ₂	2,71	1	-	-
EDTA	-	-	-	7,5
Na ₂ CO ₃	-	100	-	-
NaCl	-	-	-	20
Vitamin B ₁₂	0,0001	-	0,0150	-
Biotin	0,0001	-	0,025	-
Thiamine-HCl	0,01	-	-	-
Thiamine	-	-	0,0175	-
H ₃ BO ₃	-	2,86	-	0,3
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,108	1,81	0,98	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	-	1,5
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,066	0,22	-	0,1
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,0075	0,39	0,12	-
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	-	-	-	0,3
CuSO ₄ .5 H ₂ O	-	0,08	0,012	0,08
Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	-	0,05	-	0,26
FeCl ₃ .6 H ₂ O	5,888	-	-	17
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,012	-	0,011	-
Trisaminomethane	500	-	-	-
Fe (III)citrate H ₂ O	-	-	2,62	-
Cr ₂ O ₃	-	-	0,075	-
SeO ₂	-	-	0,005	-

3. Tốc độ sinh trưởng của tảo

Ở tất cả các công thức thí nghiệm, mẫu được lấy 2 ngày một lần để xác định tất cả các thông số. Mật độ tế bào được xác định bằng buồng

đếm Burkler- Turk (Đức). Trọng lượng khô của tảo (TLK, g/l) được xác định bằng phương pháp sấy khô mẫu ở 80°C cho đến khi trọng lượng không đổi hoặc thông qua giá trị của mật độ quang đo được trên máy quang phổ [7].

$$\text{TLK (mg/ml)} = 3,04 \times \left\{ \frac{\text{OD}_{750} - \text{OD}_{680}}{\text{OD}_{680}} + 1,40 \right\} \times \text{OD}_{680}$$

Tốc độ sinh trưởng đặc trưng (μ /ngày) được tính theo công thức:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t_t - t_0)$$

N_t , N_0 là mật độ tế bào (TB/ml) ở thời điểm t và t_0 (ngày) [5].

4. Hàm lượng chlorophyll a, b, carotenoid

Sinh khối của tảo được nghiền với cát thủy tinh và chiết với aceton 90%. Phân dịch trong được đo ở các bước sóng 665, 645, 630 và 480 nm. Hàm lượng các sắc tố nói trên được tính theo công thức sau [14]:

5. Hàm lượng sắc tố ($\mu\text{g/l}$) = C / V

Trong đó: V là lượng thể tích dịch tảo đem lọc (lít)

$$C (\text{chlorophyll a}) = 11,6 * E_{665} - 1,31 * E_{645} - 0,14 * E_{630}$$

$$C (\text{chlorophyll b}) = 20,7 * E_{645} - 4,34 * E_{665} - 4,42 * E_{630}$$

$$C (\text{carotenoid tổng số}) = 4,0 * E_{480}$$

Với E_i : là giá trị OD đo được ở bước sóng i .

Đối với tảo *H. pluvialis*, nhiều công trình công bố đã cho thấy hàm lượng carotenoid tổng số của tế bào chủ yếu là astaxanthin hấp thụ ở bước sóng 480nm. Do vậy, hàm lượng carotenoid ở tảo *H. pluvialis* được xem chính là hàm lượng của astaxanthin [6].

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

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

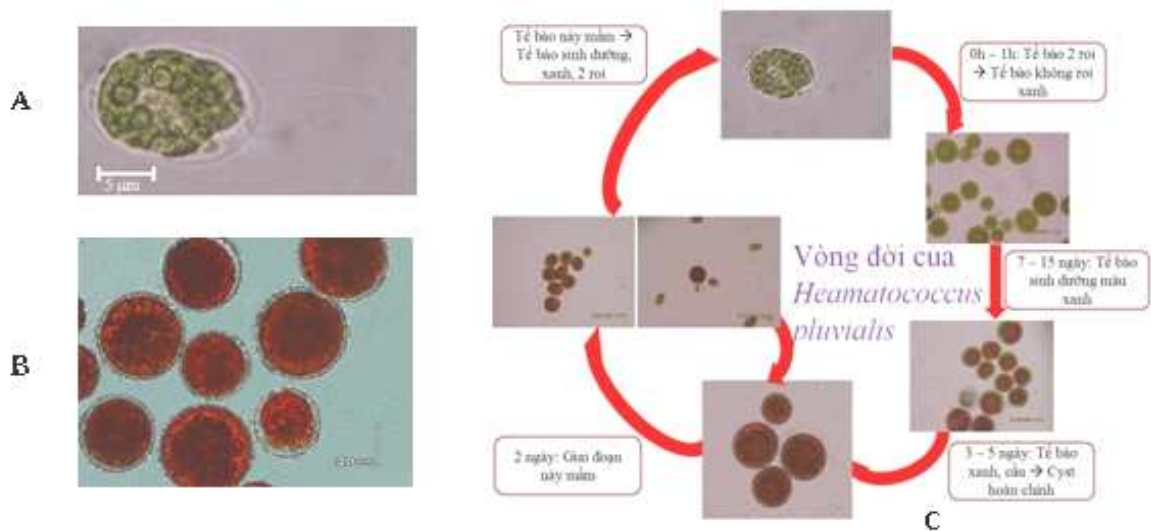
Hình thái tế bào và các giai đoạn đặc trưng của *H. pluvialis* được quan sát dưới kính hiển

vi quang học ở các độ phóng đại khác nhau và được trình bày ở hình 1.

Trong 4 môi trường được sử dụng trong nghiên cứu, tế bào của loài *H. pluvialis* đều tồn tại ở cả 2 dạng với hình thái khác nhau. Ở điều kiện môi trường thuận lợi, tế bào tảo chủ yếu ở dạng sinh dưỡng màu xanh (hình 1A), có 2 roi, chuyển động, có kích thước: dài $12,16 \pm 0,35 \mu\text{m}$, rộng $9,47 \pm 0,46 \mu\text{m}$. Trong giai đoạn này, hàm lượng chlorophyll a và protein trong tảo đạt cao. Khi điều kiện nuôi trồng không thuận lợi, tế bào tảo chuyển sang dạng nang bào tử, hình cầu, kích thước của nó tăng đột ngột, có thể đạt đến đến $38,7 \pm 2,54 \mu\text{m}$ và tế bào tảo chuyển sang màu đỏ (hình 1B), tích lũy astaxanthin tăng đáng kể. Hàm lượng chlorophyll a và protein trong tế bào ở giai đoạn này bị giảm. Các giai đoạn đặc trưng của tế bào *H. pluvialis* được thể hiện trong hình 1C.

Sinh khối tảo *H. pluvialis* được duy trì khi nuôi cấy trong môi trường C và RM ở dạng lỏng và thạch nghiêng (hình 2). Trên môi trường thạch nghiêng, tảo được cấy chuyển 3 tháng/ lần. Tần suất cấy chuyển trên môi trường lỏng ngắn hơn, khoảng 2-4 ngày/1 lần.

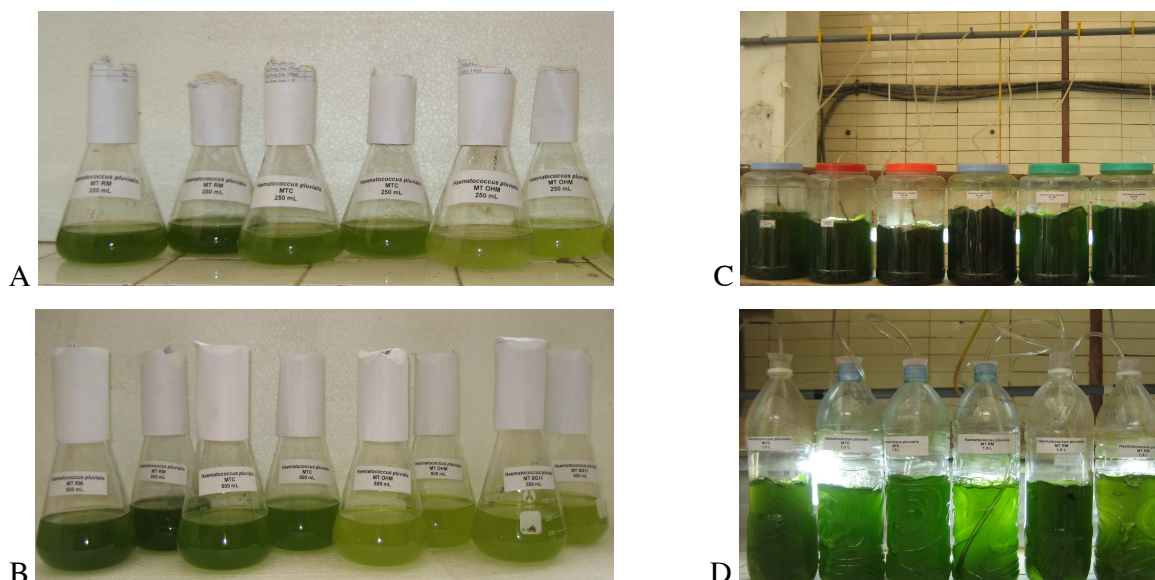
Tảo được cấy chuyển từ ống nghiệm sang các bình tam giác có thể tích 250 ml chứa 150 ml môi trường với tần suất cấy chuyển 3 ngày/lần, bổ sung môi trường mới với tỷ lệ 50%. Với quy trình này, chúng tôi đã duy trì thành công vi tảo *H. pluvialis* ở trạng thái tế bào sinh dưỡng trên môi trường C và RM lỏng đồng thời nhân nuôi thành công một lượng lớn sinh khối tảo này ở các bình tam giác 250 ml để tiếp tục thí nghiệm ở bình tam giác 500 ml và bình nhựa có thể tích 1,5 và 10 lít.



Hình 1. Hình thái tế bào *H. pluvialis*. A. Tế bào ở giai đoạn sinh dưỡng (độ phóng đại $\times 1200$); B. Tế bào ở giai đoạn nang bào, màu đỏ, chứa chủ yếu astaxanthin bên trong tế bào (độ phóng đại $\times 400$); C. Các giai đoạn khác nhau trong vòng đời tế bào *H. pluvialis*



Hình 2: Lưu giữ *H. pluvialis* trên môi trường thạch và trong môi trường lỏng C và RM



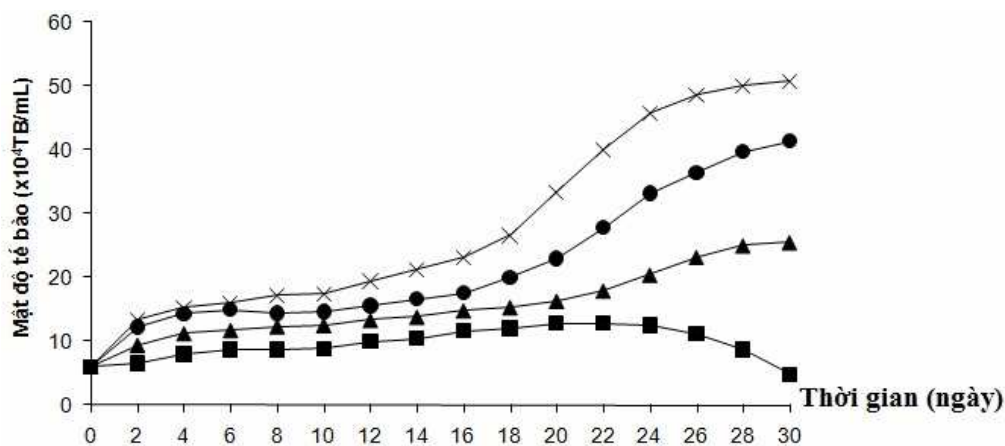
Hình 3: Nuôi trồng *H. pluvialis* trong các môi trường dinh dưỡng quy mô khác nhau: bình tam giác 250 (A), 500 ml (B), 1,5 lít (C) và 10 lít (D)

1. Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi *H. pluvialis* ở bình tam giác 250 ml

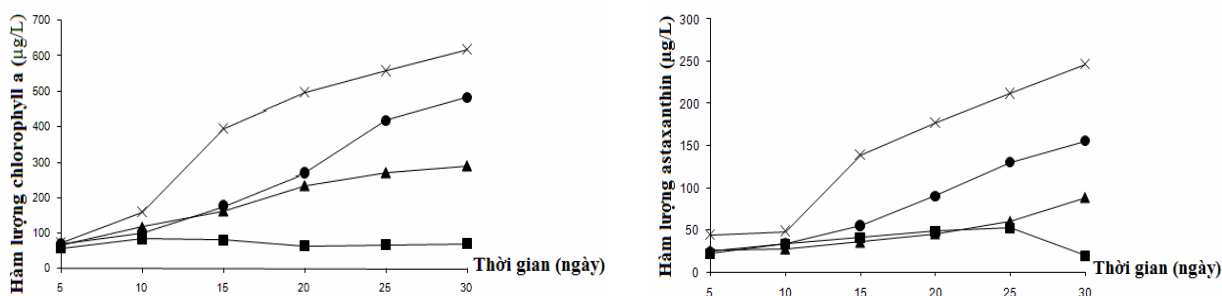
Nhiều nghiên cứu đã công bố ảnh hưởng của môi trường với các thành phần khác nhau lên sự sinh trưởng của *H. pluvialis* [4, 10]. Trong đó, sinh trưởng của tảo này phát triển kém nhất ở môi trường M1 và M6, tốt nhất ở F1 với mật độ tế bào đạt cực đại là $5,44 \times 10^4$ TB/ml. Môi trường Hong Kong cho tảo có tốc độ sinh trưởng tương tự như nuôi trên môi trường BG-11 cơ bản và BG-11 cải tiến. Mặt khác, nghiên cứu ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy khác nhau như BG-11, BG-11 cải tiến, OHM, môi trường cơ bản (C) và RM lên sinh trưởng của tảo *H. pluvialis* cho thấy tốc độ sinh trưởng của *H. pluvialis* đạt cao nhất ($9,50 \times 10^5$ TB/ml) ở môi

trường RM trong điều kiện chiếu sáng liên tục $40 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ở 25°C sau 12 ngày nuôi cấy [4]. Dựa vào các kết quả nghiên cứu đã công bố trên thế giới, chúng tôi đã chọn 4 môi trường dinh dưỡng khác nhau là C, OHM, BG-11 cải tiến và RM để nuôi thử nghiệm, nhằm tìm ra môi trường tối ưu cho loài *H. pluvialis* phân lập ở Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của 4 môi trường dinh dưỡng khác nhau lên sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis* đánh giá qua thông số mật độ tế bào (MĐTĐB) ở bình tam giác 250 ml được trình bày trên hình 4. Bên cạnh đó, sự thay đổi hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin ở loài vi tảo này cũng được trình bày ở hình 5.



Hình 4. Mật độ tế bào tảo *H. pluvialis* nuôi ở 4 môi trường C (●), BG-11 cải tiến (◻), OHM (▲) và RM (x) trong bình tam giác 250 ml



Hình 5. Sự thay đổi hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin của tảo *H. pluvialis* nuôi ở bình tam giác 250 ml trong 4 môi trường C (●), BG-11 cải tiến (◻), OHM (▲) và RM (x)

Kết quả trình bày trên hình 4 và 5 cho thấy ở bình tam giác 250 ml, môi trường RM cho mật

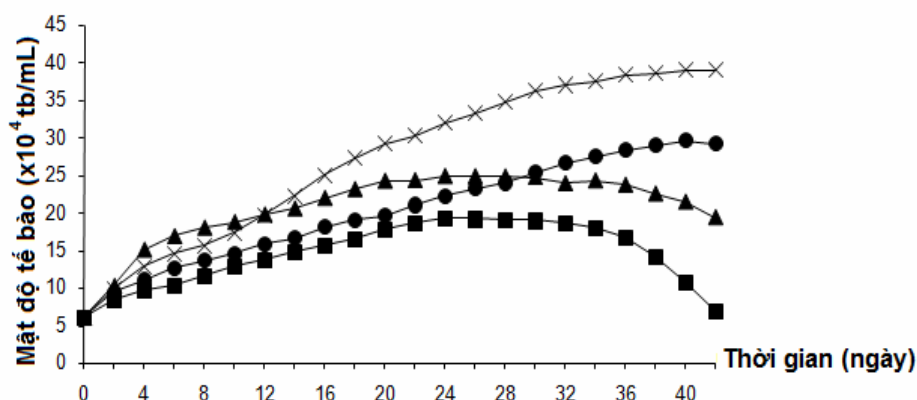
độ tế bào, hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin của tảo đạt giá trị cao nhất so với 3

môi trường còn lại sau 30 ngày nuôi cấy ($50,74 \times 10^4$ TB/ml; 617,63 $\mu\text{g/l}$, 246,21 $\mu\text{g/l}$, tương ứng). Sau môi trường RM, hiệu quả giảm dần theo thứ tự môi trường C, OHM và BG- 11 cải tiến. Tốc độ sinh trưởng đặc trưng μ đạt được 0,062; 0,049; 0,042 và 0,033/ngày, tương ứng với môi trường RM, C, OHM và BG-11 cải tiến và μ đạt giá trị cực đại cũng tại thời điểm mật độ tế bào của tảo đạt giá trị cực đại.

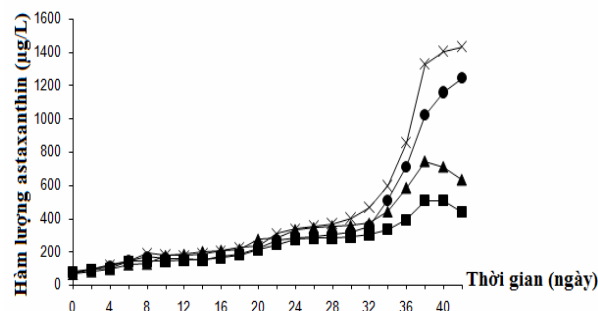
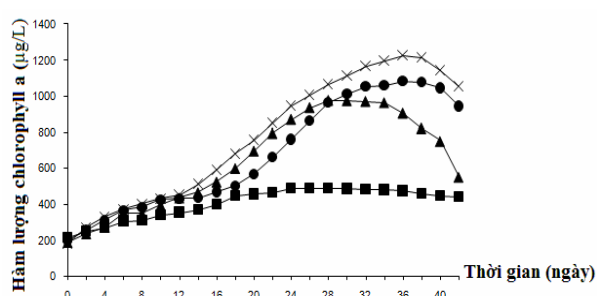
2. Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi *H. pluvialis* ở bình tam giác 500 ml

Sự thay đổi của các thông số nghiên cứu như MĐTB và hàm lượng sắc tố của tảo *H. pluvialis* trên bình tam giác 500 ml với 4 môi trường dinh dưỡng khác nhau được trình bày trên hình 6 và 7, tương ứng. Môi trường RM vẫn cho sinh trưởng của tảo tốt nhất, sau đó giảm dần theo thứ tự $\text{RM} > \text{C} > \text{OHM} > \text{BG- 11}$ cải tiến sau 30 ngày nuôi (MĐTB đạt cực đại là $39,00 \times 10^4$ TB/ml; hàm lượng chlorophyll a: 743,82 $\mu\text{g/l}$, hàm

lượng astaxanthin: 399,15 $\mu\text{g/l}$). Tốc độ sinh trưởng đặc trưng μ đạt giá trị cực đại 0,192, 0,123, 0,108 và 0,079/ngày, tương ứng với các môi trường RM, C, OHM và BG-11 cải tiến cũng tại thời điểm mật độ đạt giá trị cực đại. Tuy nhiên, cần nhấn mạnh rằng động học quá trình thay đổi hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin theo thời gian có đặc điểm: sau 30 ngày nuôi cấy, hàm lượng chlorophyll a sau khi đạt giá trị cực đại sẽ bắt đầu giảm dần, tương ứng hàm lượng astaxanthin trong tế bào tảo lại đột ngột tăng mạnh làm cho tỷ lệ astaxanthin/chlorophyll a tăng từ giá trị trung bình 0,4-0,45 lên 3-3,15 trong môi trường RM. Điều này cho thấy sau 30 ngày nuôi cấy, tế bào tảo hầu hết đã chuyển sang nang bào - giai đoạn tích lũy cao astaxanthin. Ngoài ra, theo nhiều công trình đã công bố việc chuyển tế bào từ dạng sinh dưỡng sang nang bào còn có thể được điều khiển bằng quá trình nuôi cấy 2 pha ngoài việc kéo dài thời gian nuôi cấy như trên [4, 5].



Hình 6. Sự thay đổi mật độ tế bào *H. pluvialis* nuôi trong bình tam giác 500 ml với 4 môi trường C (●), BG-11 cải tiến (■), OHM (▲) và RM (x)



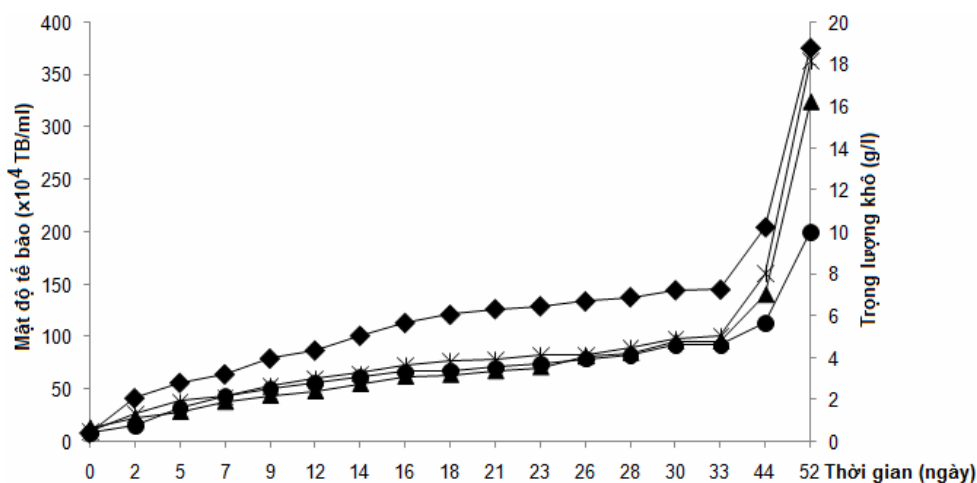
Hình 7. Sự thay đổi hàm lượng sắc tố chlorophyll a (A) và astaxanthin (B) của tảo *H. pluvialis* ở bình tam giác 500ml trong 4 môi trường C (●), BG-11 cải tiến (▪), OHM (▲) và RM (x)

3. Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi *H. pluvialis* ở bình 1,5 lít

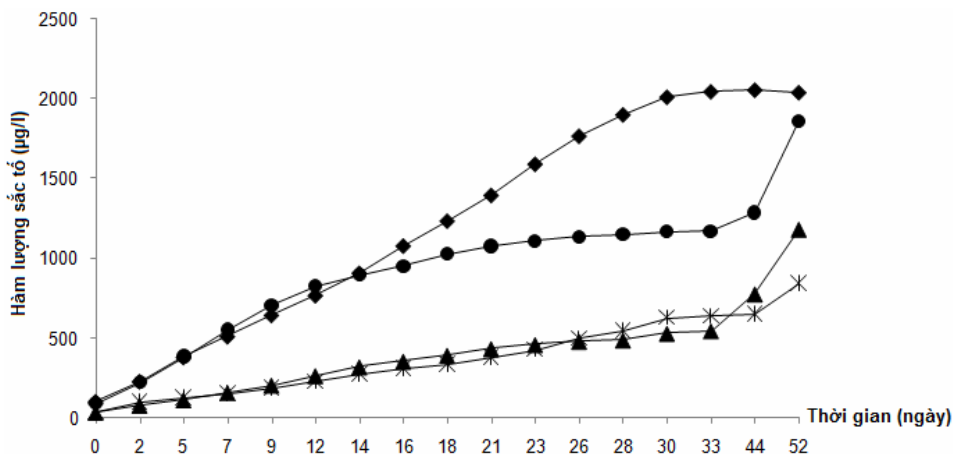
Dựa trên các kết quả thu được ở bình tam giác 250 và 500 ml, chúng tôi chỉ lựa chọn hai môi trường là RM và C để tiếp tục nuôi ở quy mô 1,5 lít. Sự thay đổi các thông số MĐTB, hàm lượng sắc tố ở *H. pluvialis* được nuôi trong môi trường RM và C ở bình nuôi 1,5 lít được trình bày trên hình 8 và 9. Kết quả cho thấy sau 30 ngày nuôi cấy, MĐTB, TLK, hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin ở tảo đạt được $144,9 \times 10^4$ và $91,75 \times 10^4$ TB/ml; 4,92 và 4,79 g/l; 2010 và 1169,15 $\mu\text{g/l}$; 630 và 530 $\mu\text{g/l}$, tương ứng trên môi trường RM và C. Sau 52 ngày nuôi cấy, các giá trị này đạt được $375,10 \times 10^4$ và $200,1 \times 10^4$ TB/ml; 18,138 và 16,92 g/l;

2038,49 và 1862 $\mu\text{g/l}$; 844,8 và 1182 $\mu\text{g/l}$, tương ứng với môi trường RM và C.

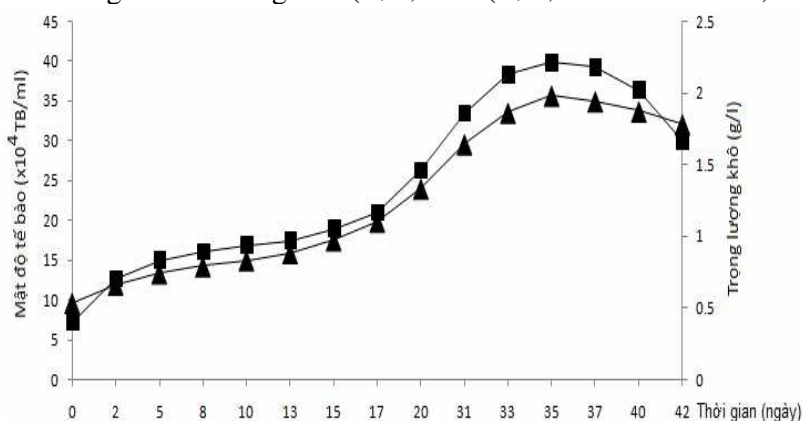
Như vậy, ở thể tích bình nuôi 1,5 lít, tảo phát triển trong môi trường RM vẫn tốt hơn so với môi trường C. Điều này cũng được khẳng định qua thông số tốc độ sinh trưởng đặc trưng μ . μ đạt giá trị 0,234/ngày và 0,213/ngày tại thời điểm mật độ tế bào đạt cực đại tương ứng với môi trường RM và C. Ngoài ra, do môi trường C có chứa 3 loại vitamin gồm vitamin B1 (thiamine HCl), vitamin B12 (cyanocobalamin) và vitamin H (biotin) nên giá thành của môi trường này cao hơn khoảng 3 lần so với RM. Do vậy, khi tiến hành nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* trên các thể tích bình nuôi lớn hơn, môi trường RM sẽ là giải pháp tốt sau này nhằm giảm chi phí sản xuất sinh khối tảo giàu astaxanthin.



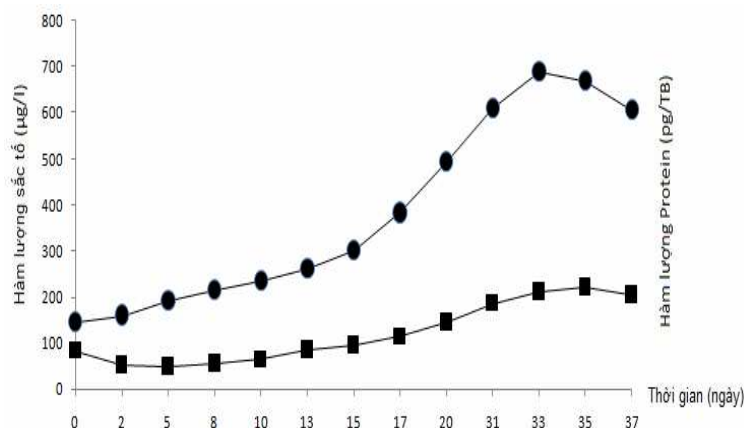
Hình 8. Sự thay đổi mật độ tế bào và trọng lượng khô của tảo *H. pluvialis* nuôi trong 2 môi trường RM (◆, *) và C (●, ▲) ở thể tích bình nuôi 1,5 lít



Hình 9. Sự thay đổi hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin của tảo *H. pluvialis* nuôi trong 2 môi trường RM (◆, ✱) và C (●, ▲) ở thể tích bình 1,5 lít



Hình 10. Sự thay đổi mật độ tế bào (■) và trọng lượng khô (▲) của *H. pluvialis* nuôi trong môi trường RM ở thể tích bình nuôi 10 lít



Hình 11. Sự thay đổi hàm lượng sắc tố chlorophyll a (●) và astaxanthin (■) của *H. pluvialis* nuôi trong môi trường RM ở thể tích bình nuôi 10 lít

4. Lựa chọn môi trường tối ưu để nuôi *H. pluvialis* ở bình 10 lít

Dựa trên những kết quả thu được ở bình nuôi 1,5 lít, khi nuôi *H. pluvialis* ở bình nuôi 10 lít, chúng tôi sử dụng môi trường RM. Sự thay đổi MĐTB, TLK, hàm lượng sắc tố của tảo *H. pluvialis* được trình bày trên hình 9, 10. Kết quả cho thấy sau 30 ngày nuôi cấy, MĐTB tảo đạt $38,3 \times 10^4$ TB/ml, TLK - 1,86 g/l, hàm lượng chlorophyll a - 689,06 µg/l; hàm lượng astaxanthin - 212,1 (g/l. Trong điều kiện thí nghiệm này, tốc độ sinh trưởng đạt trung bình 0,321/ngày từ 30 ngày nuôi cấy.

Hình 3 minh họa việc nuôi trồng *H. pluvialis* ở các quy mô khác nhau: bình tam giác 250-500 ml, 1,5 và 10 lít.

Các kết quả nghiên cứu trình bày ở trên cho

thấy lần đầu tiên ở Việt Nam, chúng tôi đã nuôi trồng thành công *H. pluvialis* ở các quy mô khác nhau: bình tam giác 250-500 ml, bình nhựa có thể tích 1,5 và 10 lít. So sánh 4 môi trường dinh dưỡng đã được sử dụng cho thấy, tảo sinh trưởng có mật độ tế bào, trọng lượng khô tế bào, hàm lượng sắc tố chlorophyll a và astaxanthin đạt giá trị cao nhất trong môi trường RM so với 3 môi trường C, OHM và BG-11 cải tiến.

Tốc độ sinh trưởng đặc trưng ở các môi trường khác nhau là tương tự với mật độ tế bào cực đại đạt được trong môi trường đó. Điều này có ý nghĩa các tế bào vào pha cân bằng với khoảng thời gian gần như nhau và vì vậy môi trường nuôi cho mật độ tế bào đạt cao nhất cũng chính là môi trường cho tốc độ sinh trưởng đặc trưng cao nhất. Ở bình nuôi 10 lít, tốc độ sinh trưởng đặc trưng của *H. pluvialis* (0,321/ngày) đạt được cao hơn so với công bố của tác giả Tjahjono và cs., 1994 [15] (0,25/ngày ở môi trường cơ bản dưới điều kiện nuôi cấy tạt dưỡng sử dụng sodium acetat). Tuy nhiên, giá trị này vẫn thấp hơn so với công bố của Kobayashi và cs., 1992 [9] với tốc độ sinh trưởng đặc trưng 0,58/ngày khi tảo được nuôi cấy trong bình tam giác trong môi trường cơ bản dưới điều kiện nuôi cấy tạt dưỡng.

Tuy nhiên, việc so sánh tốc độ sinh trưởng đặc trưng cũng như mật độ tế bào cực đại của *H. pluvialis* còn phụ thuộc rất nhiều vào dạng bể nuôi như bể hở hay kín, hệ kín hình trụ thẳng đứng hay theo các tấm.... Điều này đã được chứng minh trong công bố của Imamoglu và cs., 2010 [5]. Ngoài ra, theo công bố của Ranjbar và cs., 2008 [13], loài vi tảo lục này được nuôi trong điều kiện quang tự dưỡng, trong các hệ thống ống hình trụ đứng, có bổ sung nguồn dinh dưỡng đặc biệt là nitrat có mật độ tế bào đạt được 5 triệu TB/ml sau 300 giờ nuôi cấy với hàm lượng astaxanthin đạt 390 mg/l sau khi bổ sung nitrate có nồng độ nhỏ hơn 4mM ở pha 2 (các giá trị nêu trên cao hơn vài lần so với kết quả đã được công bố trên đối tượng này trước đó). Như vậy, để có thể nuôi vi tảo *H. pluvialis* đạt mật độ 4-6 triệu TB/ml, sinh khối tảo giàu astaxanthin chiếm 4-6% TLK trong điều kiện thí nghiệm của Việt Nam, còn rất nhiều vấn đề cần đặt ra để nghiên cứu như tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy tảo này (nhiệt độ, pH, cường độ ánh sáng, vai trò của sục không khí, tối ưu hoá

nguồn cacbon, nitơ, sử dụng nguồn CO₂ để nuôi trồng sinh khối tảo này); quy trình công nghệ nuôi cấy tảo này 2 pha nhằm sản xuất sinh khối tảo giàu hàm lượng astaxanthin; giảm giá thành sản phẩm qua việc tìm kiếm phương pháp tối ưu, rẻ tiền, dễ thực hiện đối với việc thu sinh khối tảo, điều khiển quá trình sản xuất sinh khối tảo giàu astaxanthin thông qua nghiên cứu vòng đời của tế bào....

III. KẾT LUẬN

Lần đầu tiên ở Việt Nam chúng tôi đã nuôi trồng thành công vi tảo lục nước ngọt *H. pluvialis* giàu astaxanthin phân lập từ tỉnh Hoà Bình ở các cấp độ khác nhau như sau:

Trong 4 môi trường dinh dưỡng đã sử dụng trong nghiên cứu, môi trường RM là tốt nhất cho tảo sinh trưởng so với 3 môi trường còn lại là C, OHM, và BG-11 cải tiến. Ở bình tam giác 250 ml và 500 ml sau 30 ngày nuôi cấy, trong môi trường RM tảo đạt mật độ tế bào (tế bào/ml), hàm lượng chlorophyll a và astaxanthin (µg/l) cũng như có tốc độ sinh trưởng đặc trưng (µ/ngày) là cao nhất là 50,74 × 10⁴, 39 × 10⁴; 246,21, 399,15; 617,63, 743,82; 0,062, 0,192 tương ứng ở bình tam giác 250 ml, 500 ml.

Ở hệ thống nuôi 1,5 lít, tảo sinh trưởng trên môi trường RM vẫn tốt hơn so với môi trường C với mật độ tế bào 144,90 × 10⁴TB/ml; trọng lượng khô 4,92 g/l; hàm lượng astaxanthin 630 µg/l; hàm lượng chlorophyll a 2010 µg/l; µ - 0,234/ngày sau 30 ngày nuôi cấy.

Ở hệ thống bình nuôi 10 lít, tảo sinh trưởng trong môi trường RM có mật độ tế bào đạt 38,3 × 10⁴ TB/ml; trọng lượng khô 1,86 g/l; hàm lượng astaxanthin 212,10 µg/l; hàm lượng chlorophyll a 689,06 µg/l, µ - 0,321/ ngày sau 30 ngày nuôi cấy.

Để có thể nuôi trồng thành công vi tảo nói trên đạt mật độ tế bào 4-6 × 10⁶TB/ml, sinh khối tảo giàu astaxanthin chiếm đến 4-6% trọng lượng khô làm thức ăn tươi sống cho cá hồi, cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn nữa về tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy, vòng đời của tế bào cũng như quy trình công nghệ nuôi cấy 2 pha loài vi tảo này....

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. Ngoài ra, nhóm tác giả cũng xin được cảm ơn phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ để lưu mẫu trong quá trình nuôi trồng vi tảo *Haematococcus pluvialis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ana S. C. et al.**, 2003: Biol. Res., 36: 343-357.
2. **Elliquot A. M.**, 1934: Arch Prostistenk, 82: 250-272.
3. **Fabregas J. et al.**, 2000: Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 530-535.
4. **Imamoglu E. et al.**, 2007: International Journal of Natural and Engineering Sciences, 1(3): 5-9.
5. **Imamoglu E. et al.**, 2010: Appl. Biochem. Biotechnol., 160 (3): 764-772.
6. **Jeffrey S. W. et al.**, 1997: Phytoplankton Pigments in Oceanography. UNESCO, Paris: 37-84.
7. **Katsuda T. et al.**, 2008: J. Bioscience and Bioengineering, 105(3): 216-220.
8. **Kittikaiwan P. et al.**, 2007: Carbohydrate Polymer, 70: 378-385.
9. **Kobayashi M. et al.**, 1992: J. Fermentation and Bioengineering, 74: 61-63.
10. **Kobayashi M. et al.**, 1997: J. Fermentation and Bioengineering, 84(1): 94-97.
11. **Kobayashi M. et al.**, 1991: J. Fermentation and Bioengineering, 71(5): 335-339.
12. **Lorenz R. T. et al.**, 2000: Tibtech, 18: 160-165.
13. **Ranjbar R. et al.**, 2008: Biochemical Engineering J., 39: 575-580.
14. **Strickland J. D. H. et al.**, 1977: Fish Res. Bd. Can. Bull., 167: 311.
15. **Tjahjono A. E. et al.**, 1994: Biotechnol. Lett., 16: 133-139.

CHOOSING OPTIMAL MEDIUM FOR CULTIVATION OF RICH - ASTAXANTHIN GREEN MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

DANG DIEM HONG, DINH DUC HOANG,
NGUYEN THI THUY, HOANG THI LAN ANH

SUMMARY

Microalgae have a large biotechnology potential for production of a variety of compounds such as polysaccharides, lipids, proteins, carotenoids, pigments, vitamins, steroids. Recently, *Haematococcus pluvialis* has been widely studied as one of the best sources of ketocarotenoid pigment - astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione), which holds high antioxidant activity approximately 10 times greater than other carotenoids, such as zeaxanthin, lutein, canthaxanthin and β -carotene, and over 500 times greater than α -tocopherol. For this reason, this alga is used for the pigmentation of cultured fish and shellfish, a food

additive in the food industry, a superior antioxidant in the cosmetic industry, and an antiaging reagent as precursor of vitamin A, an anticancer agent through singlet oxygen quenching, and an immunomodulator in the pharmaceutical industry.

Haematococcus pluvialis is unicellular fresh water microalga, green-colored, biflagellate, and motile in its vegetative stage. It belongs to Chlorophyta phylum, Chlorophyceae class, Volvocales order, Haematococcaceae family and *Haematococcus* genus. During the *H. pluvialis* life cycles, green vegetative cells mobile with two flagella grow both in the light and heterotrophically in the dark. Environmental stress induces encystment and morphological changes from motile vegetative cells to resting immotile aplanospores. When exposed to prolonged stress, *H. pluvialis* cell undergo enhanced carotenogenesis during the maturation of cyst cells. Astaxanthin could be accumulated up to 4-6% of dry cell weight. The massive accumulation of astaxanthin in cyst cell under light in extreme environmental condition (nutrient limitation, high light intensity, high temperature, oxidative stress and salt stress) has been investigated by several authors. The techniques on *H. pluvialis* cultures for astaxanthin production have been dramatically advanced in some countries. Currently, the use of two-stage processes for astaxanthin production has been fully reported.

In this report, we have presented the effect of different culture media including C, modified BG-11, OHM and RM on the growth rate of *H. pluvialis* which was isolated from Hoa Binh province, Vietnam in different scales. Among four media, RM medium is the best for *H. pluvialis* cultivation expressed by maximal cell density (cells/ml): 50.74×10^4 , 39×10^4 , 144.90×10^4 and 38.3×10^4 ; chlorophyll a content ($\mu\text{g/l}$): 617.63, 743.82, 2010 and 689.06 and astaxanthin content ($\mu\text{g/l}$): 246.21, 399.15, 630 and 212.10; specific growth rate (μ/day): 0.062, 0.192, 0.234 and 0.321, in 250 ml, 500 ml Erlenmeyer flask, 1.5 liter and 10 liter bottles, respectively after 30 days of cultivation. In cases of 1.5 and 10 liter bottles, dried weight was reached 4.92 and 1.86 g/l, respectively. In addition, the obtained results have indicated that cultivative process from test - tubes to 250 ml Erlenmeyer flasks with frequently in 2-4 days per time by supplementing 50% of refresh medium is necessary to maintain vegetative stage of cell for long time. In Vietnam, it is the first report on successful cultivation of green microalgae *H. pluvialis* - a potential source for astaxanthin which is a natural pigment used for food and pharmaceutical industries in the world in general and for salmon farming in particularly.

Key words: Aquaculture, astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, microalgae.

Ngày nhận bài: 7-4-2010