

Bài báo nghiên cứu

**ẢNH HƯỞNG CỦA ÁNH SÁNG TỪ LIGHT EMITTING DIODE
LÊN SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY ASTAXANTHIN
CỦA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ĐƯỢC NUÔI TRONG
TWIN-LAYER POROUS SUBSTRATE PHOTOBIOREACTOR PHƯƠNG NGHIÊNG****Đỗ Thành Trí^{1,2*}, Lại Thị Lan Anh¹, Tôn Nữ Thùy An³,
Lê Thuợng Chi⁴, Bùi Thị Thu Hiền⁵, Trần Hoàng Dũng³**¹Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam²Trường Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam³Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam⁴Trường Đại học Văn Lang, Việt Nam⁵Viện Nghiên cứu Hải sản, Hải Phòng, Việt Nam*Tác giả liên hệ: Đỗ Thành Trí – Email: tridt@hcmue.edu.vn

Ngày nhận bài: 05-6-2020; ngày nhận bài sửa: 28-8-2020, ngày chấp nhận đăng: 22-9-2020

TÓM TẮT

Vi tảo *Haematococcus pluvialis* hiện nay được nuôi để thu astaxanthin tự nhiên trong các hệ thống nuôi huyền phù hoặc cố định. Khi nuôi tảo theo kiểu quang tự dưỡng, hệ thống chiếu sáng ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin trong tế bào. Trong nghiên cứu này, hệ thống twin-layer porous substrate photobioreactor được sử dụng để nuôi cố định *H. pluvialis* với chiếu sáng bằng Light Emitting Diode (LED) đơn sắc màu đỏ hoặc lam hoặc kết hợp đỏ và lam đồng thời. Các chu kỳ sáng/tối khác nhau của LED đỏ và lam được áp dụng và lựa chọn dựa trên tiêu chí sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo. Sự kết hợp ánh sáng LED đỏ và lam ở cường độ sáng 300-400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cho kết quả tăng sinh khối khô và tích lũy astaxanthin cao nhất, với chế độ chiếu sáng 24 giờ sáng:0 giờ tối cho kết quả sinh khối khô vi tảo đạt 111,6 g.m^{-2} và tích lũy astaxanthin 1,3% chỉ sau 10 ngày nuôi. Việc sử dụng ánh sáng đơn sắc từ LED cho thấy hiệu quả về năng lượng và có khả năng ứng dụng cho việc nuôi cấy tảo cố định trong các hệ thống twin-layer porous substrate photobioreactor quy mô lớn hơn.

Từ khóa: Astaxanthin; *Haematococcus pluvialis*; Light Emitting Diode; hệ thống quang sinh học chất nền xốp

1. Giới thiệu

Astaxanthin đang được chú ý nghiên cứu bởi hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn hẳn những carotenoid khác. Astaxanthin được tìm thấy từ nhiều nguồn khác nhau như phế liệu giáp xác thủy sản, nấm men... và một số loài vi khuẩn (Dominguez-Bocanegra, Ponce-Noyola, & Torres-Munoz, 2007; Tsubokura, Yoneda, & Mizuta, 1999). Thực nghiệm cho

Cite this article as: Do Thanh Tri, Lai Thi Lan Anh, Ton Nu Thuy An, Le Thuong Chi, Bui Thi Thu Hien, & Tran Hoang Dung (2020). The effects of light from light Emitting Diode on the growth and astaxanthin accumulation of *haematococcus pluvialis* cultivated in the angled twin-layer porous substrate photobioreactor. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 17(9), 1597-1609.

thấy hàm lượng astaxanthin thu được trên những đối tượng này khá thấp, và không thích hợp cho quy mô lớn cũng như sản xuất thương mại. Tuy nhiên, đối với loài tảo lục *Haematococcus pluvialis* lại cho thấy khả năng tổng hợp astaxanthin với năng suất cao (chiếm 5-6% sinh khối khô (SKK)) so với các đối tượng nghiên cứu khác, cho thấy một tiềm năng nuôi cấy và sản xuất astaxanthin ở quy mô lớn (Dominguez-Bocanegra et al., 2007; Kang, An, Park, & Sim, 2006; Lorenz, & Cysewski, 2000; Zhang, Wang, Wang, & Liu, 2014).

Hiện nay, sản xuất astaxanthin ở tảo *H. pluvialis* phổ biến với mô hình nuôi cấy dạng dịch treo còn tồn tại nhiều nhược điểm như sinh khối thấp (0,05 %-0,06 % lượng dịch nuôi), tốn kém khi thu hoạch và cần nhiều công lao động (Aflalo, Meshulam, Zarka, & Boussiba, 2007; Olaizola, & Huntley, 2003; Suh, Joo, & Lee, 2006). Trong khi đó, mô hình nuôi cấy tảo cố định trong hệ thống twin-layer porous substrate photobioreactor (TL PSBR) đơn giản hơn mà lại khắc phục được những nhược điểm của mô hình nuôi cấy dạng dịch treo nhưng lại chưa phổ biến (Benstein, Cebi, Podola, & Melkonian, 2014; Li, Strous, & Melkonian, 2017; Podola, Li, & Melkonian, 2017). Hệ thống chiếu sáng thường được dùng cho kiểu nuôi cố định này là ánh sáng từ đèn natri cao áp công suất cao để kích thích sinh trưởng và chuyển pha của vi tảo *H. pluvialis* (Do et al., 2019; Kiperstok, Sebestyén, Podola, & Melkonian, 2017; Li, Podola, Schultze, & Melkonian, 2019; Schultze et al., 2015; Tran et al., 2019). Tuy nhiên, tỉ lệ ánh sáng hiệu quả cho quang hợp của loại nguồn sáng này chỉ khoảng 38% (Jou et al., 2015). Khi cường độ ánh sáng càng tăng thì nhiệt độ môi trường nuôi tăng theo tỉ lệ thuận và gây ảnh hưởng khó khăn cho việc kiểm soát nhiệt độ nuôi tảo (Kiperstok, 2016).

Nguồn sáng từ đèn LED (Light emitting diode) với các ưu điểm như tỉ lệ ánh sáng hiệu quả cho quang hợp cao (có thể đạt tới 90% (Jou et al., 2015)), ít phát sinh nhiệt, giảm tiêu tốn năng lượng hiện nay đã được sử dụng cho nuôi tảo *H. pluvialis* trong các hệ thống huyền phù (Tomohisa Katsuda, Lababpour, Shimahara, & Katoh, 2004; Lababpour, Hada, Shimahara, Katsuda, & Katoh, 2004; Lababpour et al., 2005; Xi, Kim, Roh, Choi, & Choi, 2016). Ánh sáng LED với các bước sóng thích hợp vừa kích thích sinh trưởng vừa kích thích cho sự tích lũy astaxanthin của vi tảo (Tomohisa Katsuda et al., 2004; Lababpour et al., 2004; Lababpour et al., 2005; Xi et al., 2016). Tuy nhiên, số lượng nghiên cứu ứng dụng LED để nuôi và sản xuất astaxanthin từ *H. pluvialis* trên hệ thống nuôi TL PSBR vẫn còn rất ít.

Trong nghiên cứu này, hệ thống TL PSBR được sử dụng để nuôi tăng sinh khối cũng như tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* trong kiểu nuôi tự dưỡng nhờ ánh sáng từ đèn LED. Các thí nghiệm được tiến hành để lựa chọn màu (quang phổ) ánh sáng LED phù hợp và chu kì sáng/tối để kích thích sinh trưởng và chuyển pha của vi tảo trong màng sinh học (biofilm) khi được nuôi cố định.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Dòng vi tảo và nuôi cấy huyền phù trước khi cố định vi tảo

Dòng vi tảo *H. pluvialis* CCAC 0125 được cung cấp bởi bộ sưu tập tảo Đại học Cologne (Culture Collection of Algae at the University of Cologne), Đức. Môi trường BG-11 được sử dụng để nuôi huyền phù vi tảo trong các bình tam giác 500 ml, 2 l và túi PE 10 L, ở 25 ± 2 °C và chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng 40-60 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Đối với nuôi cố định vi tảo trên hệ thống quang sinh học hai lớp màng theo phương nghiêng, lượng thể tích môi trường BG-11 lớn hơn được chuẩn bị trong các bồn nhựa 40L.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

Các nghiên cứu được tiến hành trên hệ thống quang sinh học hai lớp màng quy mô $0,5 \text{ m}^2 \times 4$ theo mô tả hệ thống của Trần Hoàng Dũng và cộng sự (Tran et al, 2019). Các thí nghiệm được thực hiện gồm:

a. *Khảo sát ảnh hưởng của các loại ánh sáng LED đơn sắc*: thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức: chỉ ánh sáng LED đỏ (bước sóng ánh sáng 620-650 nm), chỉ ánh sáng LED xanh lam (bước sóng ánh sáng 430-480 nm) và ánh sáng LED đỏ + xanh lam, chế độ sáng là 14 giờ chiếu sáng và 10 giờ tối, mật độ sinh khối tảo ban đầu 7,5 g SKK/m². Bố trí các nghiệm thức trong các chamber sử dụng chung nguồn dinh dưỡng. Trong mỗi chamber, tảo được cố định thành các hình vuông để tiện cho việc thu mẫu, mỗi ô vuông có diện tích là $8 \times 8 = 64 \text{ cm}^2$. Thu mẫu tảo trong các ô vuông vào ngày 10 để xác định sinh khối khô và tỉ lệ astaxanthin. Cường độ ánh sáng lên bề mặt của biofilm được điều chỉnh ở mức 300-400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Loại ánh sáng kích thích sinh trưởng vi tảo và tích lũy astaxanthin cao nhất sẽ được chọn để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

b. *Khảo sát ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng*: Hệ thống quang sinh học hai lớp màng là hệ thống hở nên mục tiêu của thí nghiệm này là rút ngắn thời gian nuôi để hạn chế hiện tượng nhiễm. Do đó, thí nghiệm các chế độ chiếu sáng khác nhau theo hướng tăng thời gian chiếu sáng để đẩy mạnh quang hợp và sinh trưởng cũng như tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* trong thời gian ngắn (10 ngày) được tiến hành. Thí nghiệm chế độ ánh sáng có 4 nghiệm thức: (12 giờ sáng: 12 giờ tối), (16 giờ sáng: 8 giờ tối), (20 giờ sáng: 4 giờ tối) và (24 giờ sáng: 0 giờ tối). Cường độ ánh sáng đỏ + xanh lam chiếu lên bề mặt của biofilm được điều chỉnh ở mức 300-400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Mật độ tảo ban đầu trong thí nghiệm này là 7,5g SKK/m² (Do et al., 2019). Bố trí các thí nghiệm trên các chamber, tảo được cố định thành các hình vuông có diện tích 64 cm^2 . Thu mẫu tảo trong các ô vuông vào ngày 8 và ngày 10 để xác định sinh khối khô, sau đó tách chiết sắc tố và xử lý số liệu.

2.3. Cố định tảo lên màng sinh học

Phương pháp thu dịch tảo cô đặc để cố định thành biofilm: Tảo *H. pluvialis* được nuôi cấy trong các erlen 2 lít. Tảo ở pha logarit (tỉ lệ tế bào ở giai đoạn sinh dưỡng, có màu xanh và có hai roi trên 80 % khi kiểm tra bằng kính hiển vi) được li tâm với tốc độ 800 x g

trong 5 phút, bỏ dịch nổi và thu dịch tảo đặc bên dưới (Do et al., 2019; Kiperstok, 2016). Xác định sinh khối khô của tảo trong dịch cô đặc sau li tâm bằng cách hút 1 ml dịch tảo đặc lên giấy lọc (đã sấy khô và cân khối lượng m_t), sấy ở 105°C trong 2 giờ. Giấy lọc và tảo đã sấy được để nguội trong bình hút ẩm 30 phút, cân khối lượng và lặp lại quá trình sấy cho đến khi khối lượng không đổi, thu được m_s (Kiperstok, 2016). Khối lượng sinh khối khô của *H. pluvialis* trong 1 ml dịch tảo được tính theo công thức: $m_{dt} \text{ (g/ml)} = m_s - m_t$. Thực hiện với 3 mẫu để tính khối lượng trung bình.

Cố định tảo thành biofilm: bằng cách dùng cọ quét dịch tảo đã cô đặc thành các ô vuông có diện tích 64 cm². Lượng dịch tảo đặc để quét lên một ô vuông được tính theo công thức: $V \text{ (ml)} = M/m_{dt}$, với V là thể tích dịch tảo đặc cần để tạo một biofilm 0,0064 m²; m_{dt} là khối lượng sinh khối khô trung bình trong 1 ml dịch tảo đặc; M là khối lượng SKK cần cho một ô vuông 0,0064 m², trong nghiên cứu này sinh khối khô ban đầu là 7,5 g.m⁻² nên $M=0,048 \text{ g}$

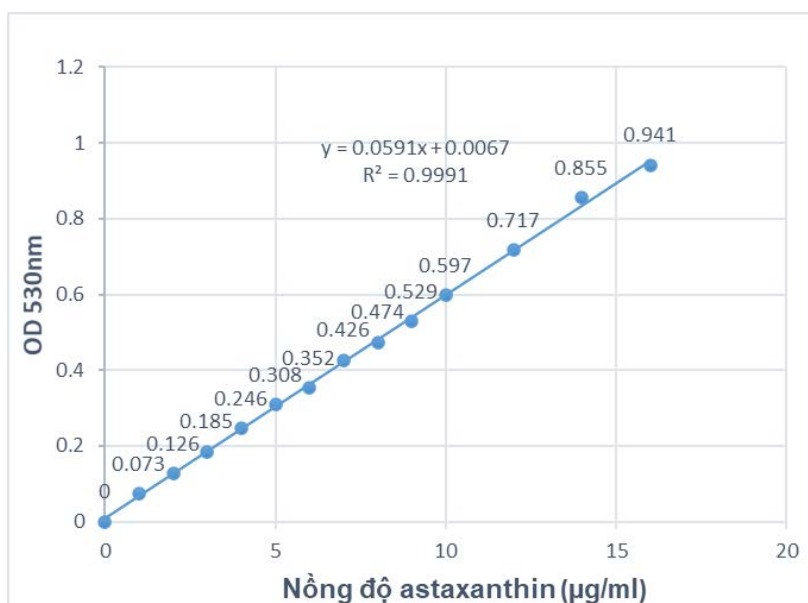
Điều kiện nuôi vi tảo sau khi cố định: Thời gian nuôi cố định trên màng là 10 ngày, trong đó 7 ngày đầu là môi trường BG-11, ba ngày cuối thay bằng môi trường thiếu N và P. Môi trường được sục không khí có bổ sung CO₂ 1% để cung cấp CO₂ cho quang hợp cũng như điều chỉnh pH. Các điều kiện môi trường cần kiểm soát gồm pH 6,5-8, nhiệt độ dưới 26 °C, EC trong khoảng 1800-2000 μS.cm⁻². Những điều kiện khác của các thí nghiệm được đảm bảo giống nhau giữa các thí nghiệm thức.

2.4. Thu và xác định sinh khối khô vi tảo trên biofilm sau khi nuôi

Tảo được thu mẫu và xác định sinh khối khô vào ngày thứ 8 và 10 sau khi cố định. Cân khối lượng các túi trữ mẫu (m_1). Dùng thước nhựa dẻo cạo sạch phần sinh khối tảo trên mỗi ô vuông cho vào mỗi túi trữ mẫu. Sau khi thu xong, mẫu tảo được sấy ở 105 °C, trong 2 giờ, để nguội và cân. Lặp lại quy trình sấy đến khi khối lượng không đổi, được tổng khối lượng túi và sinh khối tảo khô (m_2). Sinh khối khô vi tảo trên mỗi m² diện tích nuôi được tính theo công thức: $m \text{ (g.m}^{-2}\text{)} = (m_2 - m_1)/0,0064$.

2.5. Phương pháp phân tích hàm lượng astaxanthin

Cân 0,001 g SKK vi tảo trong ống li tâm 2 ml, thêm 0,5 ml acetone 90%, nghiền kỹ bằng chày thủy tinh. Thêm 1 ml acetone 90% rồi đem li tâm 4000 vòng/phút trong 30s, thu phần dịch nổi. Tiếp tục thêm 0,5 ml acetone 90% và lặp lại quy trình cho đến khi phần dịch thu được là không màu. Thêm acetone 90% để thu được thể tích sau cùng là 3,5 ml trong ống falcon đậy nắp kín. Quy trình được thực hiện trong tối hoặc ánh sáng khuếch tán yếu để tránh sự phân giải astaxanthin. Phần dịch chiết sắc tố được đo quang phổ ở các bước sóng 530 nm (Kiperstok, 2016). Nồng độ astaxanthin được xác định dựa theo phương trình đường chuẩn được dựng bằng astaxanthin chuẩn (Sigma-Aldrich). Phương trình đường chuẩn: $y = 0,0591x + 0,0067$, trong đó y là giá trị đo OD, x là nồng độ astaxanthin (μg.ml⁻¹) (Hình 1). Để kết quả đo được chính xác, các dung dịch tách chiết astaxanthin luôn được pha loãng để giá trị đo OD luôn nhỏ hơn 1.



Hình 1. Kết quả đo OD xây dựng đường chuẩn để xác định nồng độ astaxanthin

2.6. Phương pháp xác định hình thái và kích thước tế bào

Mẫu tế bào trên biofilm được thu nhận sau 10 ngày nuôi, huyền phù trong dung dịch đẳng trương, cố định bằng formol 2% và được quan sát hình thái với kính hiển vi quang học Olympus CX21 (Nhật Bản).

2.7. Phân tích dữ liệu

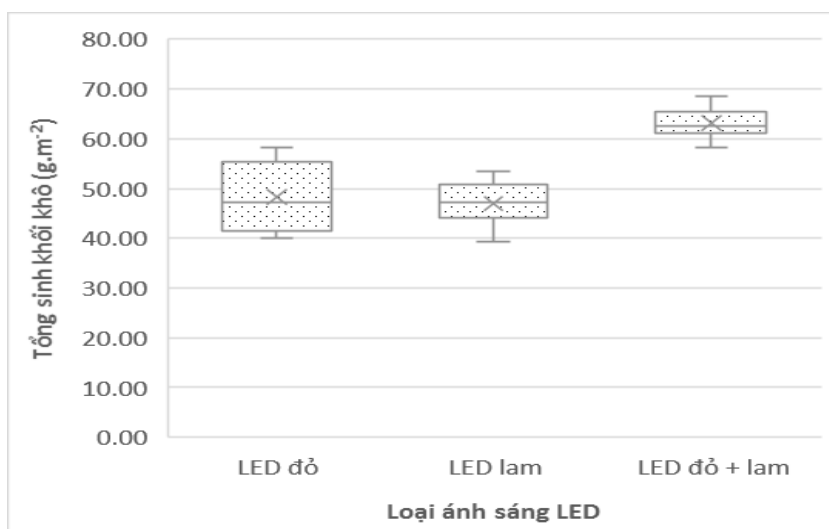
Các số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 365. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R phiên bản 3.4.2. Các giá trị được trình bày ở dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD) của ít nhất 3 lần lặp lại nghiệm thức.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của các loại ánh sáng LED đơn sắc đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis*

a. Kết quả tăng SKK

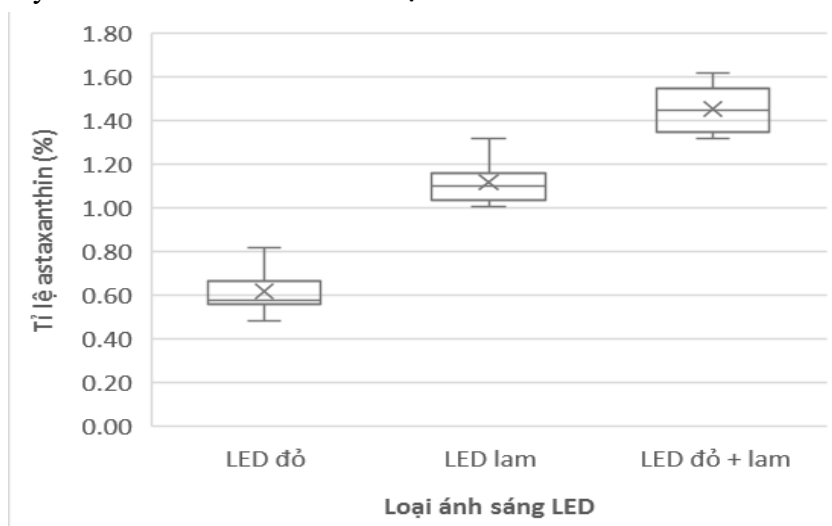
Tổng SKK ở nghiệm thức kết hợp ánh sáng đỏ + lam đạt $63,15 \text{ g.m}^{-2}$ cao hơn hẳn hai nghiệm thức chỉ dùng một loại ánh sáng đơn sắc đỏ hoặc xanh lam. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, $n=6$). Hai nghiệm thức chỉ dùng một loại ánh sáng đơn sắc cho tổng SKK không có sự khác nhau (Hình 2).



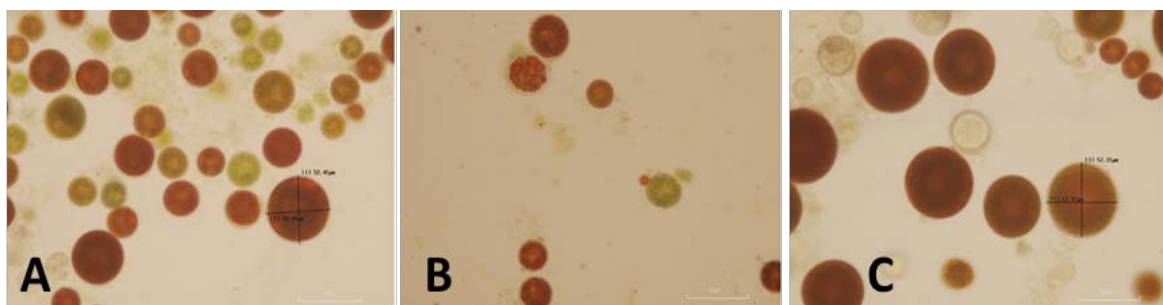
Hình 2. Tổng SKK vi tảo *H. pluvialis* khi chiếu sáng bằng các ánh sáng đơn sắc khác nhau sau 10 ngày nuôi cố định trong TL PSBR

b. Kết quả tích lũy astaxanthin

Kết quả đo OD để xác định tỉ lệ astaxanthin tích lũy trong SKK của vi tảo và phân tích cho thấy sự khác nhau giữa 3 nghiệm thức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, $n=6$) (Hình 3). Trong đó, tỉ lệ astaxanthin đạt cao nhất là 1,45 % khi chiếu sáng bằng đèn LED đỏ + lam, tỉ lệ đó đạt 1,12 % với đèn LED lam và chỉ đạt 0,62 % khi dùng đèn LED đỏ dù với cùng lượng photon ánh sáng trong một đơn vị thời gian. Kết quả đó cũng phù hợp với kết quả quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học (Hình 4), tế bào nuôi dưới ánh sáng LED đỏ vẫn còn nhiều tế bào còn ở pha xanh chưa chuyển sang đỏ nên làm giảm tỉ lệ astaxanthin khi phân tích. Trong khi đó, tế bào nuôi dưới ánh sáng LED đỏ + lam thì đa phần đã tích lũy astaxanthin và có màu đỏ đậm hơn.



Hình 3. Tỉ lệ astaxanthin tích lũy trong SKK của vi tảo khi chiếu sáng bằng các ánh sáng đơn sắc khác nhau sau 10 ngày nuôi cố định trong TL PSBR



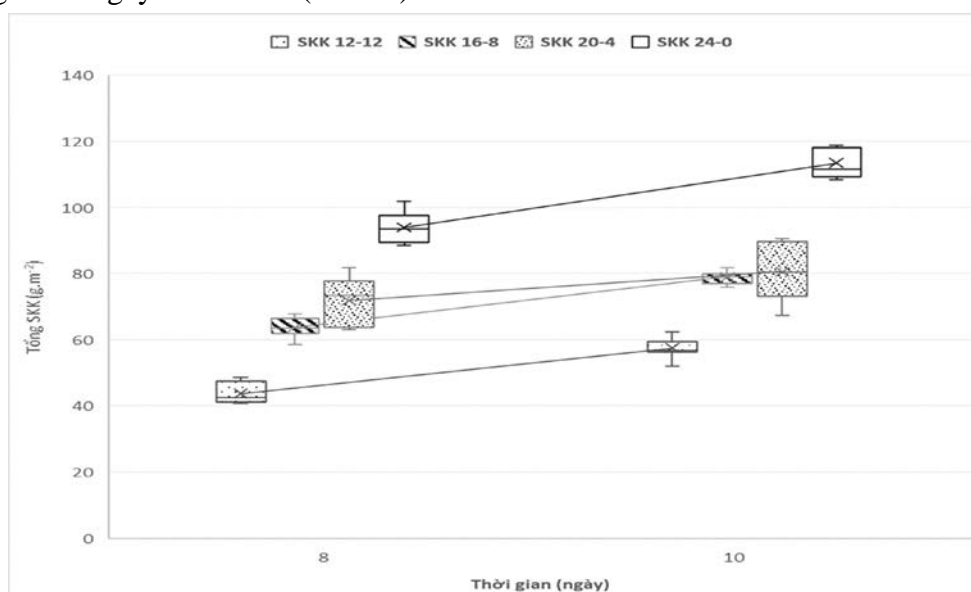
Hình 4. Tế bào *H. pluvialis* khi chiếu sáng bằng các ánh sáng đơn sắc khác nhau sau 10 ngày nuôi cố định (10 x): A- LED đỏ; B- LED lam; C- LED đỏ + lam

Như vậy, sự kết hợp ánh sáng LED đỏ + lam ở cường độ sáng 300-400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cho kết quả tăng SKK và tích lũy astaxanthin cao nhất. Khi dùng hai ánh sáng đơn sắc kết hợp, tổng lượng astaxanthin thu được sau 10 ngày nuôi đạt trung bình 1163,7 mg.m^{-2} .

3.2. Ảnh hưởng của chế độ sáng: tối của LED đỏ và lam đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo

a. Kết quả tăng SKK

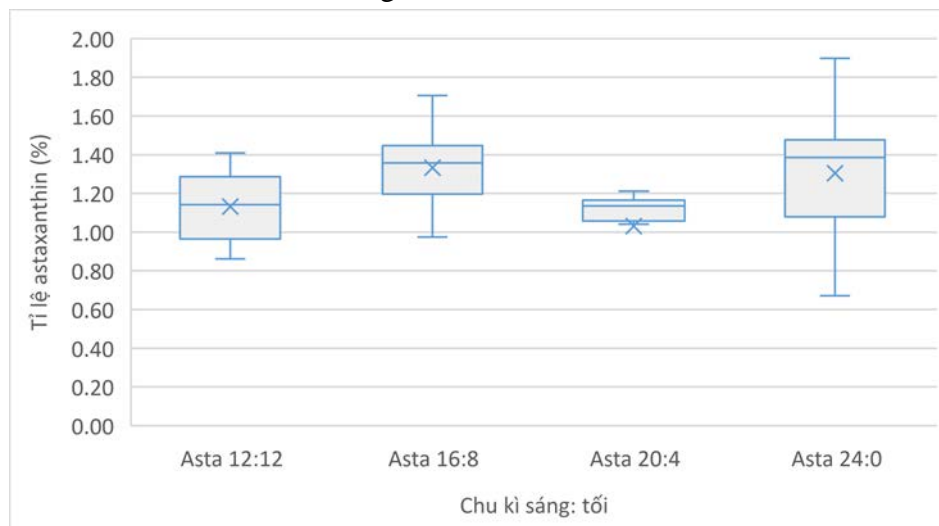
Tổng SKK ở nghiệm thức (24 giờ sáng:0 giờ tối) đạt 111,55 g.m^{-2} (ngày 10) và 93,5 g.m^{-2} (ngày 8) cao hơn hẳn ba nghiệm thức còn lại. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, $n=8$ và $n=6$). Giữa nghiệm thức (16 giờ sáng: 8 giờ tối) và (20 giờ sáng: 4 giờ tối) cho tổng SKK không có sự sai khác về thống kê. Nghiệm thức (12 giờ sáng: 12 giờ tối) cho tổng SKK thấp nhất trong bốn nghiệm thức. Cụ thể, khi nuôi ở nghiệm thức (12 giờ sáng: 12 giờ tối) tổng SKK thu được chỉ đạt 42,63 g.m^{-2} ở ngày thu thứ 8, và đạt 56,88 g.m^{-2} ở ngày thu thứ 10 (Hình 5).



Hình 5. Tổng SKK vi tảo *H. pluvialis* khi chiếu sáng bằng các chế độ khác nhau sau 8 và 10 ngày nuôi cố định trong TL PSBR

b. Kết quả tích lũy astaxanthin

Kết quả đo OD để xác định tỉ lệ astaxanthin tích lũy trong SKK của vi tảo và phân tích cho thấy sự khác nhau giữa 4 nghiệm thức không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, $n=6$) (Hình 6). Trong đó, tỉ lệ astaxanthin đạt cao nhất là 1,33 % khi chiếu sáng ở nghiệm thức 16:8, tỉ lệ đó đạt 1,3 % với chế độ sáng 24:0.



Hình 6. Tỉ lệ astaxanthin tích lũy trong SKK của vi tảo khi chiếu sáng bằng chế độ khác nhau sau 10 ngày nuôi cố định trong TL PSBR

Như vậy, dựa theo kết quả tổng lượng SKK và tỉ lệ astaxanthin thu được cho thấy: tảo nuôi ở chế độ chiếu sáng 24 giờ sáng:0 giờ tối cho khả năng tăng sinh và tích lũy astaxanthin cao nhất.

3.3. Thảo luận

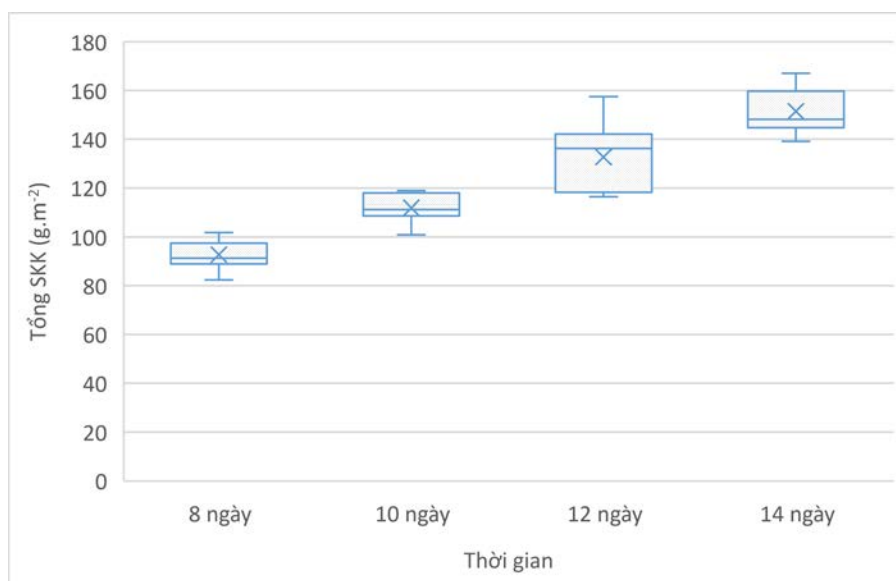
Các nghiên cứu trước đây sử dụng nguồn sáng đơn sắc từ LED đã cho thấy hiệu quả về mặt năng lượng khi kích thích sinh trưởng và tích lũy astaxanthin ở vi tảo lục *H. pluvialis*. Trong đó, ánh sáng LED đỏ có vai trò chính trong việc kích thích sinh trưởng để tăng số lượng tế bào nhưng lại không kích thích tích lũy astaxanthin nên năng suất astaxanthin đạt được thường khá thấp. Còn ánh sáng LED xanh lam có tác dụng kích thích vi tảo tích lũy astaxanthin nhưng không hiệu quả trong việc tăng tổng lượng sinh khối khô. Do đó, việc kết hợp hai loại ánh sáng đơn sắc này có ý nghĩa vừa kích thích tăng sinh khối vừa kích thích tế bào chuyển pha tích lũy astaxanthin (Katsuda et al., 2006; Lee, & Hong, 2015; Xi et al., 2016). Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây dù là phương thức nuôi cố định vi tảo có nhiều khác biệt so với phương thức nuôi huyền phù. Điều đó cho thấy đèn LED là nguồn sáng có nhiều tiềm năng trong việc nuôi tảo cố định trên màng sinh học.

Với phương thức nuôi tảo *H. pluvialis* dinh dưỡng theo kiểu tự dưỡng thì nguồn ánh sáng hiệu quả đóng vai trò quan trọng. Ánh sáng LED với hai loại ánh sáng đỏ (bước sóng khoảng 620-650 nm) và ánh sáng xanh lam (bước sóng khoảng 430-480 nm) đều là các

ánh sáng được hấp thụ bởi quang hệ thống I và II khi quang hợp (Jou et al., 2015). Nên kết quả thí nghiệm cho thấy với việc cung cấp ánh sáng liên tục giúp đạt được năng suất sinh khối khô cao tới 111,55 g.m⁻², tỉ lệ astaxanthin đạt trung bình 1,42 % nhưng chỉ với 10 ngày nuôi.

Sự tăng sinh khối khô chủ yếu là do các lớp tế bào bên dưới tầng sinh, nhưng các tế bào này chủ yếu là các tế bào ở trạng thái sinh dưỡng nên làm cho tỉ lệ astaxanthin trong sinh khối khô bị giảm. Việc quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi cũng cho thấy vẫn còn nhiều tế bào ở pha xanh (Hình 4). Kết quả này hoàn toàn tương đồng với các nghiên cứu nuôi *H. pluvialis* dạng cố định trong biofilm trước đây. Trong đó, các tế bào nằm trong những lớp trên bề mặt của biofilm nhận được nhiều ánh sáng hơn và liên tục nên bị kích thích tích lũy astaxanthin, chuyển pha sau vài ngày, các lớp tế bào nằm ở dưới bị che sáng nên vẫn ở trạng thái xanh và sinh trưởng làm tăng chiều dày lớp biofilm (Kiperstok, 2016; Kiperstok et al., 2017). Ánh sáng đèn natri cao áp là một dải quang phổ từ tím tới đỏ nên có tác dụng gây chuyển pha và giúp đạt tỉ lệ astaxanthin cao hơn. Các nghiên cứu nuôi *H. pluvialis* cố định trên thế giới cho năng suất lớn nhất đạt khoảng 3,7-10,6 g.m⁻².ngày⁻¹, hàm lượng astaxanthin của vi tảo khoảng 1,3-3,5 % sau 7 hoặc 12 ngày, nguồn ánh sáng là đèn natri công suất cao (Kiperstok et al., 2017; Wan et al., 2014; Zhang et al., 2014). Trong nghiên cứu này, chỉ hai loại ánh sáng đơn sắc (đỏ và xanh lam) được sử dụng nên tác dụng gây chuyển pha bởi yếu tố ánh sáng cường độ cao bị hạn chế. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành là sử dụng các nhân tố môi trường khác (như nhiệt độ, natri acetate, natri bicarbonate) để kích thích sự chuyển pha, tăng năng suất tích lũy astaxanthin trong tế bào tảo.

Trong các hệ thống kín nuôi huyền phù, các tế bào vi tảo thường xuyên thay đổi vị trí nên cường độ ánh sáng nhận được luôn thay đổi, nên giai đoạn sinh dưỡng của tế bào thường được kéo dài. Sau giai đoạn sinh dưỡng, các tế bào này sẽ được kích thích chuyển pha. Kiểu nuôi hai pha kế tiếp nhau trong nuôi huyền phù làm tăng thời gian nuôi lên đáng kể (T. Katsuda, Shiraishi, Ishizu, Ranjbar, & Katoh, 2008; Lee, & Hong, 2015). Hệ thống nuôi cố định vi tảo được dùng trong nghiên cứu này thực tế là một hệ thống hở nên việc rút ngắn thời gian nuôi để hạn chế nhiễm là điều rất quan trọng. Với việc chiếu sáng liên tục bằng LED chúng tôi đã thử nghiệm theo dõi sự tăng sinh của vi tảo qua thời gian (Hình 7). Tổng sinh khối khô của vi tảo qua thời gian cũng tăng dần. kết quả đó cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kiperstok et al., 2017. Tuy nhiên, sau ngày thứ 10, tình trạng nhiễm gây ảnh hưởng đến chất lượng tảo thu được nên thời gian nuôi tối đa 10 ngày là phù hợp nhất.



Hình 7. Tổng SKK vi tảo *H. pluvialis* khi chiếu sáng với chu kì 24:0 qua thời gian nuôi cố định trên màng sinh học

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy sự kết hợp ánh sáng LED đỏ và lam ở cường độ sáng 300-400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ cho kết quả tăng SKK và tích lũy astaxanthin cao nhất. Tảo nuôi ở chế độ chiếu sáng 24 giờ sáng: 0 giờ tối cho khả năng tăng sinh và tích lũy astaxanthin cao nhất. Tảo nuôi trên hệ thống hai lớp màng cần được thu hoạch vào ngày thứ 10 sau khi cố định lên màng. Tuy nhiên, đối với sử dụng hệ thống chiếu sáng LED này cần nghiên cứu thêm ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo cũng như tìm hiểu cơ chế ảnh hưởng của ánh sáng LED đến sinh trưởng cũng như tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* khi nuôi cố định.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được cấp kinh phí từ đề tài cấp cơ sở, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, mã số: CS.2018.19.41.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 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 Bioeng*, 98(1), 300-305. doi:10.1002/bit.21391
- Benstein, R. M., Cebi, Z., Podola, B., & Melkonian, M. (2014). Immobilized growth of the peridinin-producing marine dinoflagellate *Symbiodinium* in a simple biofilm photobioreactor. *Mar Biotechnol (NY)*, 16(6), 621-628. doi:10.1007/s10126-014-9581-0

- Do, T. T., Ong, B. N., Nguyen Tran, M. L., Nguyen, D., Melkonian, M., & Tran, H. D. (2019). Biomass and Astaxanthin Productivities of *Haematococcus pluvialis* in an Angled Twin-Layer Porous Substrate Photobioreactor: Effect of Inoculum Density and Storage Time. *Biology (Basel)*, 8(3). doi:10.3390/biology8030068
- Dominguez-Bocanegra, A. R., Ponce-Noyola, T., & Torres-Munoz, J. A. (2007). Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(4), 783-791. doi:10.1007/s00253-007-0889-9
- Jou, J. H., Lin, C. C., Li, T. H., Li, C. J., Peng, S. H., Yang, F. C., . . . Hsu, B. D. (2015). Plant Growth Absorption Spectrum Mimicking Light Sources. *Materials (Basel)*, 8(8), 5265-5275. doi:10.3390/ma8085240
- Kang, C. D., An, J. Y., Park, T. H., & Sim, S. J. (2006). Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 31(3), 234-238. doi:https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.08.002
- Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., & Katoh, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1), 81-86. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.016
- Katsuda, T., Shimahara, K., Shiraishi, H., Yamagami, K., Ranjbar, R., & Katoh, S. (2006). Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*, 102(5), 442-446. doi:10.1263/jbb.102.442
- Katsuda, T., Shiraishi, H., Ishizu, N., Ranjbar, R., & Katoh, S. (2008). Effect of light intensity and frequency of flashing light from blue light emitting diodes on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*, 105(3), 216-220. doi:10.1263/jbb.105.216
- Kiperstok, A. C. (2016). *Optimizing immobilized cultivation of Haematococcus pluvialis for astaxanthin production*. (PhD thesis), Universität zu Köln., Cologne. Retrieved from <https://kups.ub.uni-koeln.de/6728/>
- Kiperstok, A. C., Sebestyén, P., Podola, B., & Melkonian, M. (2017). Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities. *Algal Research*, 21, 213-222. doi:https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.025
- Lababpour, A., Hada, K., Shimahara, K., Katsuda, T., & Katoh, S. (2004). Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*, 98(6), 452-456. doi:10.1016/s1389-1723(05)00311-7
- Lababpour, A., Shimahara, K., Hada, K., Kyoui, Y., Katsuda, T., & Katoh, S. (2005). Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*, 100(3), 339-342. doi:10.1263/jbb.100.339
- Lee, K.-H., & Hong, C.-H. (2015). Effects of LED irradiation on the growth and Astaxanthin Production of *Haematococcus lacustris*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12, 1167-1173. doi:10.13005/bbra/1769

- Li, T., Podola, B., Schultze, L. K. P., & Melkonian, M. (2019). Design scenario analysis for porous substrate photobioreactor assemblies. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1623-1636. doi:10.1007/s10811-018-1700-2
- Li, T., Strous, M., & Melkonian, M. (2017). Biofilm-based photobioreactors: their design and improving productivity through efficient supply of dissolved inorganic carbon. *FEMS Microbiology Letters*, 364(24). doi:10.1093/femsle/fnx218 %J FEMS Microbiology Letters
- Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 160-167. doi:https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01433-5
- Olaizola, M., & Huntley, M. (2003). *Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae* (Vol. 9: Biomaterials and Bioprocessing): Science Publishers.
- Podola, B., Li, T., & Melkonian, M. (2017). Porous Substrate Bioreactors: A Paradigm Shift in Microalgal Biotechnology? *Trends Biotechnol*, 35(2), 121-132. doi:10.1016/j.tibtech.2016.06.004
- Schultze, L. K. P., Simon, M.-V., Li, T., Langenbach, D., Podola, B., & Melkonian, M. (2015). High light and carbon dioxide optimize surface productivity in a Twin-Layer biofilm photobioreactor. *Algal Research*, 8, 37-44. doi:https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.007
- 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(4), 540-546. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.03.027
- Tran, H. D., Do, T. T., Le, T. L., Tran-Nguyen, M. L., Pham, C. H., & Melkonian, M. (2019). Cultivation of Haematococcus pluvialis for astaxanthin production on angled bench-scale and large-scale biofilm-based photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 61, 61-70.
- Tsubokura, A., Yoneda, H., & Mizuta, H. (1999). Paracoccus carotinifaciens sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, 49 Pt 1, 277-282. doi:10.1099/00207713-49-1-277
- Wan, M., Hou, D., Li, Y., Fan, J., Huang, J., Liang, S., & Li, S. (2014). The effective photoinduction of Haematococcus pluvialis for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresour Technol*, 163, 26-32. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.017
- Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J. S., & Choi, Y. E. (2016). Enhancement of astaxanthin production using Haematococcus pluvialis with novel LED wavelength shift strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(14), 6231-6238. doi:10.1007/s00253-016-7301-6
- Zhang, W., Wang, J., Wang, J., & Liu, T. (2014). Attached cultivation of Haematococcus pluvialis for astaxanthin production. *Bioresour Technol*, 158, 329-335. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.044

THE EFFECTS OF LIGHT FROM LIGHT EMITTING DIODE ON THE GROWTH AND ASTAXANTHIN ACCUMULATION OF HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS CULTIVATED IN THE ANGLED TWIN-LAYER POROUS SUBSTRATE PHOTOBIOREACTOR

**Do Thanh Trí^{1,2*}, Lai Thi Lan Anh¹, Ton Nu Thuy An³,
Le Thuong Chi⁴, Bui Thi Thu Hien⁵, Tran Hoang Dung³**

¹Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam

²Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

³Nguyen Tat Thanh University, Vietnam

⁴Van Lang University, Vietnam

⁵Research Institute for Marine Fisheries, Hai Phong, Vietnam

*Corresponding author: Do Thanh Trí – Email: tridt@hcmue.edu.vn

Received: June 05, 2020; Revised: August 28, 2020; Accepted: September 22, 2020

ABSTRACT

Haematococcus pluvialis is now cultured to obtain natural astaxanthin by suspended or immobilised cultivation. In photoautotrophic cultivation, the luminaires have a great influence on the growth and astaxanthin accumulation of the algal cells. In this study, a small-scale angled twin-layer porous substrate photobioreactor was used to grow *H. pluvialis* with illumination from red LEDs or blue LEDs or a combination of red and blue LEDs simultaneously. Different light/dark cycles of red and blue LEDs were applied and selected based on the algal growth and accumulation of astaxanthin. The combination of red and blue LED lights at $300 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ has resulted in the highest dry biomass productivity and astaxanthin accumulation (1.3 % in the dry biomass). The microalgal dry biomass reached 111.6 g.m^{-2} after only 10 days, with a 24/0 hours light/dark cycle. The use of monochromatic light from LEDs showed the energy efficiency and applicability of immobilized algae culture in larger-scale twin-layer porous substrate photobioreactors.

Keywords: Astaxanthin; *Haematococcus pluvialis*; Light emitting diode; Porous substrate photobioreactor