

Bài báo nghiên cứu**HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS TRONG HỆ THỐNG
TWIN-LAYER POROUS SUBSTRATE PHOTOBIOREACTOR
PHƯƠNG NGHIÊNG: ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NGUỒN CARBON KHÁC NHAU
ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY ASTAXANTHIN***Nguyễn Hồng Ngọc Bảo¹, Đỗ Thành Trí^{2*},**Nguyễn Thành Công³, Ong Bình Nguyên³, Trần Hoàng Dũng⁴*¹*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*²*Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*³*Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam*⁴*Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam***Tác giả liên hệ: Đỗ Thành Trí – Email: tridt@hcmue.edu.vn**Ngày nhận bài: 16-6-2022; ngày nhận bài sửa: 22-9-2022; ngày duyệt đăng: 26-9-2022***TÓM TẮT**

Vi tảo được biết đến là một nguồn quan trọng sản xuất các hợp chất hữu cơ, ứng dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau. Việc nuôi cấy vi tảo chủ yếu sử dụng mô hình nuôi huyền phù, tiêu thụ nhiều nước và năng lượng, việc thu hoạch đòi hỏi nhiều chi phí và công lao động. Mô hình nuôi cấy tảo trên hệ thống Twin-layer photobioreactor có thể khắc phục những nhược điểm trên. Trong nghiên cứu này, hệ thống TL-PSBR nghiêng được sử dụng để nuôi cấy vi tảo *Haematococcus pluvialis* và thử nghiệm bổ sung nguồn carbon từ muối NaHCO_3 hoặc muối CH_3COONa ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thử nghiệm cho thấy muối CH_3COONa nồng độ 35 mM bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* cho hiệu quả cao. Lượng sinh khối khô thu được trên hệ thống đạt $94,78 \text{ g m}^{-2}$, lượng astaxanthin tích lũy đạt $1275,03 \text{ mg m}^{-2}$ chỉ sau 10 ngày nuôi. Các kết quả này cao hơn rất nhiều so với khi chỉ sử dụng khí CO_2 (SKK tăng 1,91 lần; lượng astaxanthin gấp 3,32 lần, tỉ lệ astaxanthin tích lũy trong sinh khối hơn 1,75 lần). Kết quả đưa đến khả năng sử dụng CH_3COONa vào nuôi cấy vi tảo trên hệ thống TL-PSBR nghiêng, sản xuất astaxanthin.

Từ khóa: Astaxanthin; carbon source; *Haematococcus pluvialis*; porous substrate; twin-layer, photobioreactor

1. Giới thiệu

Trong tự nhiên, vi tảo là một nguồn quan trọng sản xuất các hợp chất hữu cơ, các hợp chất khai thác từ nuôi cấy vi tảo có thể được ứng dụng trong chăn nuôi hoặc sản xuất các sản phẩm có ích cho sức khỏe của con người. Công nghệ nuôi cấy vi tảo để thu nhận sinh khối

Cite this article as: Nguyen Hong Ngoc Bao, Do Thanh Tri, Nguyen Thanh Cong, Ong Binh Nguyen, & Tran Hoang Dung (2022). *Haematococcus pluvialis* in a tilted twin-layer porous substrate photobioreactor system: Effects of different carbon sources on astaxanthin growth and accumulation. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(11), 1818-1829.

và các hợp chất từ vi tảo, mô hình nuôi phổ biến thường thấy là nuôi cấy huyền phù. Tảo được nuôi ở dạng dịch treo trong các hệ thống nuôi hở hoặc các buồng photobioreactor kín. Hệ thống dịch treo hở đơn giản, việc xây dựng và vận hành ít tốn kém nhưng năng suất sinh khối thường không cao và dễ bị nhiễm do tảo tiếp xúc trực tiếp với môi trường ngoài (Ozkan et al. 2012). Hệ thống photobioreactor kín có nhiều dạng thiết kế khác nhau như dạng ống, dạng bán cầu, dạng cột thẳng đứng. Các hệ thống nuôi kín dễ kiểm soát điều kiện môi trường, hạn chế nhiễm bẩn nhưng chi phí lắp đặt và vận hành cao (Kiperstok, Melkonian, & Becker 2016). Nhìn chung, các mô hình nuôi cấy đều cần tiêu thụ nhiều nước và năng lượng cho việc nuôi tảo, trao đổi khí bị hạn chế, ánh sáng bị làm loãng; từ đó sinh khối thu được thấp, việc thu hoạch đòi hỏi nhiều chi phí và công lao động (Gross, Jarboe, & Wen 2015).

Bên cạnh mô hình nuôi cấy huyền phù, vi tảo còn được nuôi cấy trên các hệ thống nuôi cấy quang sinh học sử dụng tế bào tảo bất động. Tiềm năng của các photobioreactor (PBR) dựa trên màng sinh học cho các ứng dụng khác nhau đã được công nhận từ lâu. Nhiều loại PBR dựa trên màng sinh học đã được phát triển cho các ứng dụng khác nhau (Li, Strous, & Melkonian 2017). Mô hình nuôi cấy này có thể sử dụng để nuôi cấy nhiều loại vi tảo: tảo lục *Halochlorella rubescens*, *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Nannochloropsis* sp. (Naumann et al., 2013; Nowack, Podola, & Melkonian 2005; Yin et al., 2015; Zhang et al., 2014). So với các hệ thống PBR dạng huyền phù, các hệ thống dựa trên màng sinh học có nhiều ưu điểm hơn, sinh khối thu được cũng cao hơn đáng kể (Berner, Heimann, & Sheehan 2014; Gross et al., 2015; Ozkan et al., 2012). Tại Việt Nam, hệ thống Twin-layer porous substrate photobioreactor (TL-PSBR) nghiêng đã được nghiên cứu thiết kế xây dựng và đang tiến hành cải tiến, tối ưu các điều kiện nuôi cấy các loại vi tảo (Do et al., 2019). Nghiên cứu này đề cập đến việc cải thiện điều kiện nuôi cấy vi tảo *Haematococcus pluvialis* trên hệ thống TL-PSBR nghiêng để thu được sinh khối và tổng lượng astaxanthin cao hơn, phục vụ cho các mục đích tiếp theo.

Astaxanthin được biết đến là một hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa cao, được ứng dụng trong chăn nuôi thủy sinh vật, thực phẩm chức năng và trị bệnh. Astaxanthin có thể sản xuất từ nhiều nguồn khác nhau. Trong đó, *Haematococcus pluvialis* là một loài vi tảo lục có nhiều triển vọng trong sản xuất ở quy mô lớn. Sự tăng trưởng và tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như nguồn carbon, ánh sáng, nhiệt độ, pH... Trong đó, nguồn carbon là một yếu tố ảnh hưởng mạnh đến vi tảo. Trên mô hình nuôi cấy huyền phù, thông thường, nguồn carbon để vi tảo sử dụng đến từ khí CO₂. Bên cạnh đó, vi tảo *H. pluvialis* đã được công nhận có hoạt tính carbonic anhydrase (CA) ngoại bào nên có khả năng sử dụng các muối bicarbonate như một nguồn carbon chính; CA ngoại bào chịu trách nhiệm chuyển đổi carbonate thành CO₂ tự do để tạo thuận lợi cho quá trình đồng hóa CO₂ (Anon n.d.; Emma Huertas et al., 2000; Kang et al., 2005; Merett, Nimer, & Dong 1996; Oslan et al., 2021). Việc sử dụng bicarbonate có thể cho kết quả tăng sinh khối tốt hơn khi sử dụng CO₂ (Anon n.d.; Kang et al. 2005). Ngoài ra, nguồn carbon hữu cơ như muối acetate cũng đã được đánh giá là nguồn carbon hữu cơ tốt để nuôi cấy tảo *Haematococcus*,

giúp tăng cường cả sự tăng trưởng và sự hình thành astaxanthin (Hata et al., 2001; Jeon, Cho, & Yun 2006; Kang et al., 2005; Kobayashi, Kakizono, & Nagai 1993; Orosa et al., 2001). Acetate có thể được sử dụng để nuôi vi tảo *H. pluvialis* theo phương thức dị dưỡng, tức chỉ sử dụng acetate làm nguồn carbon, hoặc phương thức nuôi hỗn dưỡng, tảo đồng thời sử dụng nguồn carbon vô cơ từ CO₂ và nguồn carbon hữu cơ từ acetate. Trong đó, phương thức nuôi hỗn dưỡng có nhiều ưu điểm hơn, mật độ tế bào cao hơn và giảm thiểu được các yếu tố nhiễm (Göksan, Ak, & Gokpinar 2010; Pan-utai, Parakulsuksatid, & Phomkaivon 2017). Trên hệ thống TL-PSBR nghiêng, áp dụng cho nuôi cấy *H. pluvialis*, nguồn cung cấp carbon cho vi tảo chủ yếu là khí CO₂.

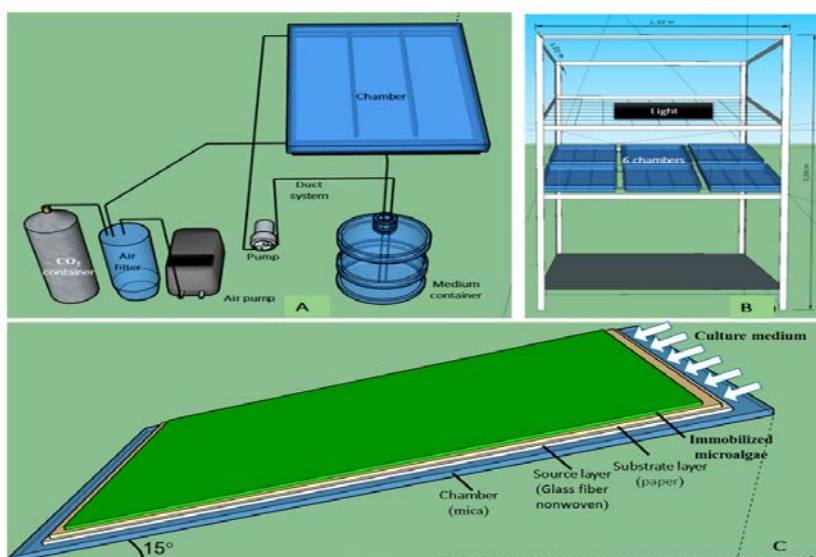
Trong nghiên cứu này, vi tảo *H. pluvialis* được nuôi trên hệ thống TL-PSBR nghiêng và tiến hành thử nghiệm việc sử dụng muối bicarbonate hoặc muối acetate làm nguồn carbon cùng với khí CO₂. Từ đó lựa chọn nguồn carbon và nồng độ phù hợp để nâng cao khả năng sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* nuôi cố định trên hệ thống.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu *Chủng vi tảo và nuôi cấy huyền phù trước khi cố định vi tảo*

Chủng 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. Chủng thuần được nuôi giữ trong bình tam giác 100 mL chứa 50 mL môi trường BG-11, duy trì nhiệt độ ở 16-20°C, chiếu đèn huỳnh quang 14 giờ/ngày với cường độ sáng đạt khoảng 30 μmol photon m⁻² s⁻¹.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

Các nghiên cứu được tiến hành trên hệ thống quang sinh học hai lớp màng theo mô tả hệ thống của Trần Hoàng Dũng và cộng sự năm 2019 (Tran, 2019). Mô hình hệ thống được thể hiện trên Hình 1 (Do et al., 2019).



Hình 1. Bản vẽ hệ thống *Twin-layer porous substrate photobioreactor* nghiêng (A). Hệ thống cung cấp chất dinh dưỡng và không khí cho hệ thống nuôi; (B). Vị trí của hệ thống đèn và chamber; (C). các thành phần trong một chamber

Các thí nghiệm được thực hiện gồm:

a. *Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO₃ hòa tan trong môi trường BG-11 đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo H. pluvialis*: ở nội dung này, thí nghiệm được bố trí sục CO₂ vào môi trường nuôi để cung cấp nguyên liệu cho quá trình quang hợp của tảo, NaHCO₃ với nồng độ từ 10 đến 80 mM được thêm vào giai đoạn các ngày 8, 9, 10 của quá trình nuôi. Nghiệm thức chỉ sục CO₂ vào môi trường nuôi được dùng làm đối chứng.

b. *Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ CH₃COONa hòa tan trong môi trường BG-11 đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo H. pluvialis*: tương tự thí nghiệm trước, khí CO₂ được sục vào môi trường nuôi và CH₃COONa với nồng độ từ 5 đến 40 mM được thêm vào giai đoạn các ngày 8, 9, 10 của quá trình nuôi. Nghiệm thức chỉ sục CO₂ vào môi trường nuôi được dùng làm đối chứng.

2.3. Phương pháp thu nhận sinh khối tảo và chuyển lên nuôi bất động trên hệ thống Twin-layer porous substrate photobioreactor nghiêng

a. *Thu nhận sinh khối tảo từ bình nuôi huyền phù*: vi tảo *H. pluvialis* được nhân nuôi sinh khối trong bình 2 L, nhiệt độ ở 23°C, chiếu đèn huỳnh quang 14 giờ/ngày, cường độ khoảng 50-60 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sục khí CO₂ 0,5 % ở mức 0,5 mL phút⁻¹. Trước khi tiến hành chuyển tảo lên hệ thống nuôi, vi tảo trong các bình 2 L được thu nhận bằng cách li tâm loại bỏ dịch nổi.

b. *Cố định vi tảo lên hệ thống TL-PSBR nghiêng*: để chuẩn bị cho việc cố định tảo lên hệ thống, phần buồng nuôi được vệ sinh với Javel và nước sạch; 2 lớp màng gồm lớp sợi thủy tinh và lớp chất nền được cắt theo kích thước của buồng nuôi. Lớp sợi thủy tinh ngâm ngập nước, xịt còn 70° và trải lên chamber, lớp chất nền bằng giấy kraft được vẽ các ô tròn (diện tích mỗi ô khoảng 50,24 cm²), ngâm ngập nước, hấp khử trùng và trải lên trên lớp sợi thủy tinh. Vi tảo được quét lên các ô tròn với mật độ ban đầu là 7,5 g m⁻².

c. *Điều kiện nuôi cấy sau khi cố định vi tảo*: vi tảo sau khi cố định trên hệ thống TL-PSBR nghiêng được nuôi cấy trong vòng 10 ngày. Môi trường BG-11 (pH = 7) được sử dụng để cung cấp dinh dưỡng cho tảo sinh trưởng trên 4 chamber từ ngày 1 đến ngày 7, mỗi chamber sử dụng 10 L môi trường và được thay mới sau mỗi 2-3 ngày nuôi. Sau đó, môi trường BG-11 được thay bằng môi trường HDT (môi trường stress) vào 3 ngày nuôi cuối cùng. Khí CO₂ được sục vào môi trường nuôi với lưu lượng 3,6 mg mL⁻¹ phút⁻¹. Nhiệt độ phòng kiểm soát trong khoảng 21-25°C. Ánh sáng chiếu từ đèn cao áp Na 250W, chu kỳ sáng tối 14:10 giờ.

2.4. Các chỉ tiêu theo dõi

a. *Sự sinh trưởng của vi tảo*: được tính toán được trên lượng sinh khối khô thu được trên mỗi m² nuôi cấy sau 4, 6, 8, 10 ngày nuôi. Sinh khối tảo tươi được thu bằng cách dùng miếng nhựa cạo lên lớp chất nền và cho vào ống đựng mẫu (m₁), sấy ở nhiệt độ 60-80°C đến khi khô hoàn toàn và cân để xác định khối lượng ống mẫu tảo khô (m₂). Sinh khối tảo khô thu được trên mỗi m² (m) được tính theo công thức $m (\text{g m}^{-2}) = (m_2 - m_1) / 0,005024$.

Hàm lượng astaxanthin trong sinh khối khô (A%): cân 0,001 g (1000 µg) bột tảo khô vào các ống nghiệm nhựa 5 mL, bổ sung 1 mL acetone 90%, lắc mạnh với bi thủy tinh trong 3-4 giờ, chuyển dịch tảo sau khi lắc sang eppendorf 2 mL, bổ sung thêm acetone 90% cho đủ 2 mL, li tâm 16000 vòng phút⁻¹ trong 2 phút, hút dịch nổi để đo OD ở bước sóng 530 nm. Toàn bộ quy trình thực hiện diễn ra trong tối hoặc ánh sáng khuếch tán. Lượng astaxanthin trong dịch chiết được tính dựa theo phương trình đường chuẩn dựng trên astaxanthin chuẩn phân tích (Sigma – Aldrich): $y = 0,0577x + 0,0131$; trong đó, y là giá trị OD đo được ở bước sóng 530 nm, x là nồng độ astaxanthin trong dịch chiết (µg mL⁻¹) (Do et al. 2019). Hàm lượng astaxanthin trong sinh khối khô được tính theo công thức: $\%A = (x (\mu\text{g mL}^{-1}) \times 2 (\text{mL}) \times 100) / (0,001 (\text{g}) \times 1000000)$.

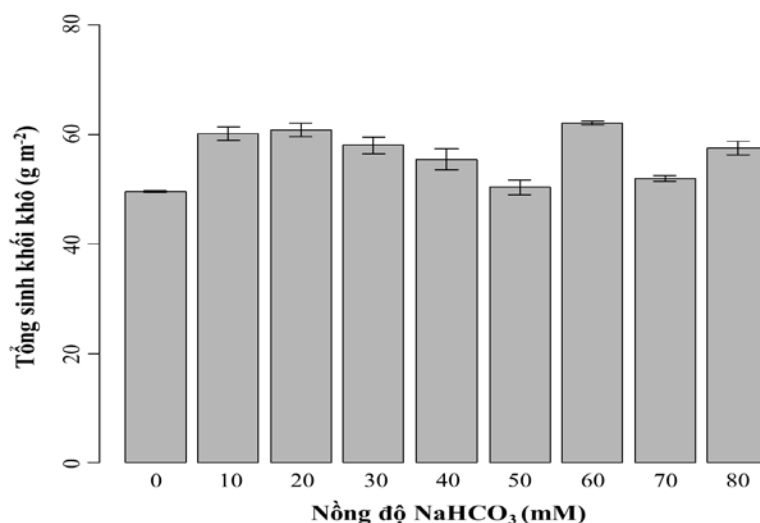
2.5. Phân tích dữ liệu

Các số liệu thu được sẽ được xử lý bằng MS Excel 2016 và phần mềm xử lý thống kê R (ver 4.2.1). Các giá trị được trình bày ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) của 3 lần lặp lại nghiệm thức.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của việc bổ sung NaHCO₃ đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* nuôi trên hệ thống TL-PSPBR nghiêng

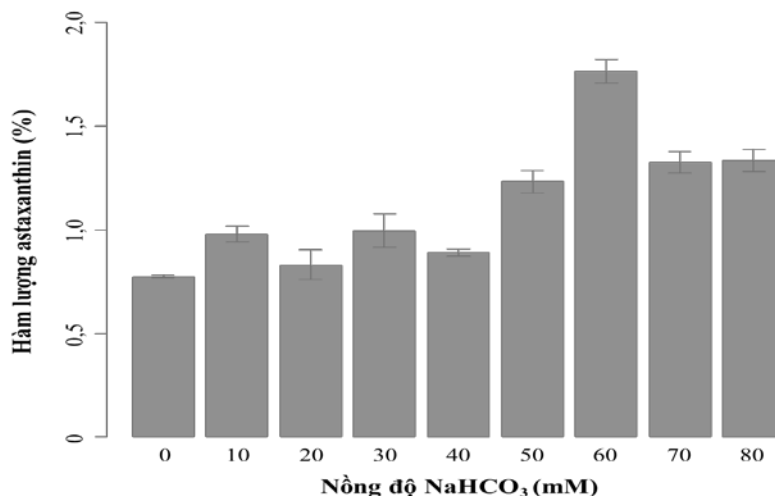
Đánh giá kết quả tăng sinh khối vi tảo



Hình 2. Kết quả sinh khối khô của vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường bổ sung NaHCO₃ (g m⁻²)

Sau 10 ngày nuôi, điều kiện nuôi bổ sung 60 mM NaHCO₃ cho kết quả sinh khối khô cao nhất, đạt 62,09 g m⁻². Các điều kiện nuôi bổ sung 50 và 70 mM NaHCO₃ cho kết quả sinh khối khô thấp nhất, lần lượt đạt 50,34 và 52 g m⁻². Sau 10 ngày nuôi, hầu hết các nghiệm thức bổ sung NaHCO₃ đều thu được kết quả sinh khối khô cao hơn đối chứng (ĐC) chỉ bổ sung CO₂ (sinh khối khô đạt 49,58 g m⁻²). Kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; $n = 3$). Điều này cho thấy việc bổ sung NaHCO₃ vào môi trường nuôi có ảnh hưởng nhất định đến sự tăng sinh khối của vi tảo *H. pluvialis*.

Đánh giá kết quả tích lũy astaxanthin của vi tảo

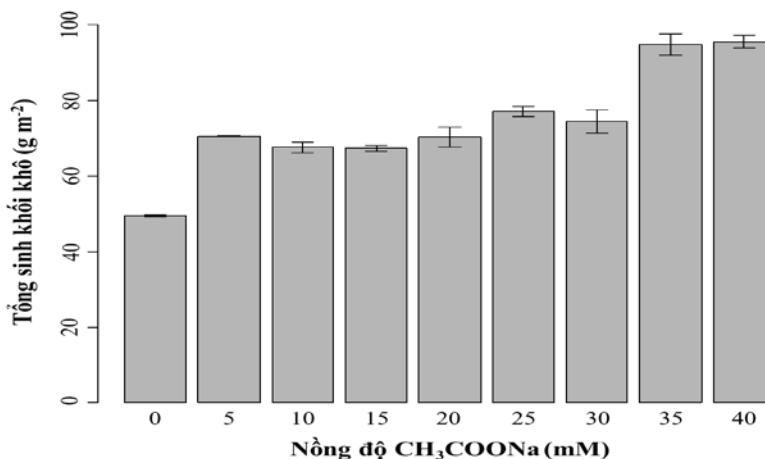


Hình 3. Kết quả hàm lượng astaxanthin trong sinh khối khô của vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường bổ sung NaHCO₃ (%)

Sau 10 ngày nuôi, tỉ lệ hàm lượng astaxanthin trong sinh khối khô ở 4 điều kiện nuôi bổ sung 10-40 mM NaHCO₃ là thấp nhất, đạt xấp xỉ 1%. Điều kiện nuôi bổ sung 60 mM NaHCO₃ cho kết quả cao nhất, đạt 1,77%. Kết quả này cao hơn nhiều so với ĐC chỉ bổ sung CO₂ (đạt 0,75%) và có sự khác biệt lớn so với tất cả các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$; $n = 3$). Kết quả tính toán hàm lượng astaxanthin tích lũy theo diện tích nuôi thu được sau 10 ngày nuôi cho thấy điều kiện nuôi bổ sung 60 mM NaHCO₃ là điều kiện nuôi có kết quả tích lũy astaxanthin cao nhất, đạt 1096,55 mg m⁻², cao hơn 2,9 lần so ĐC (384,10 mg m⁻²).

3.2. Ảnh hưởng của việc bổ sung CH₃COONa đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* nuôi trên hệ thống TL-PSPBR nghiêng

Đánh giá kết quả tăng sinh khối vi tảo

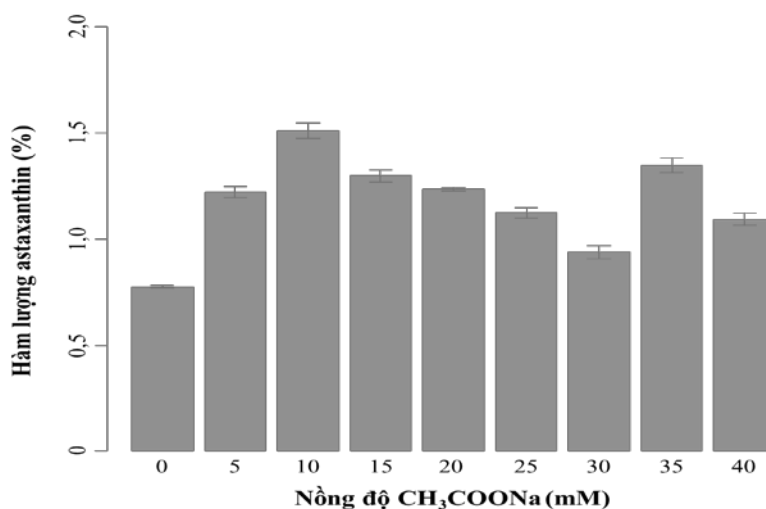


Hình 4. Kết quả sinh khối khô của vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường bổ sung CH₃COONa (g m⁻²)

Sau 10 ngày nuôi, điều kiện nuôi bổ sung 35 và 40 mM CH₃COONa là các điều kiện có kết quả sinh khối khô cao nhất, lần lượt đạt 94,78 và 95,52 g m⁻². Các điều kiện nuôi được

bổ trí bổ sung 5-30 mM CH₃COONa nhìn chung cho sinh khối khô đạt trên 65 g m⁻². So sánh lượng sinh khối khô thu được ở các nghiệm thức bổ sung CH₃COONa với ĐC chỉ sử dụng CO₂ (sinh khối khô đạt 49,58 g m⁻²), các nghiệm thức bổ sung CH₃COONa đều cho kết quả cao hơn và có sự khác biệt rõ rệt (p < 0,05; n = 3). Như vậy việc bổ sung CH₃COONa vào môi trường nuôi thực sự có ảnh hưởng mạnh đến sự tăng sinh của vi tảo.

Đánh giá kết quả tích lũy astaxanthin của vi tảo



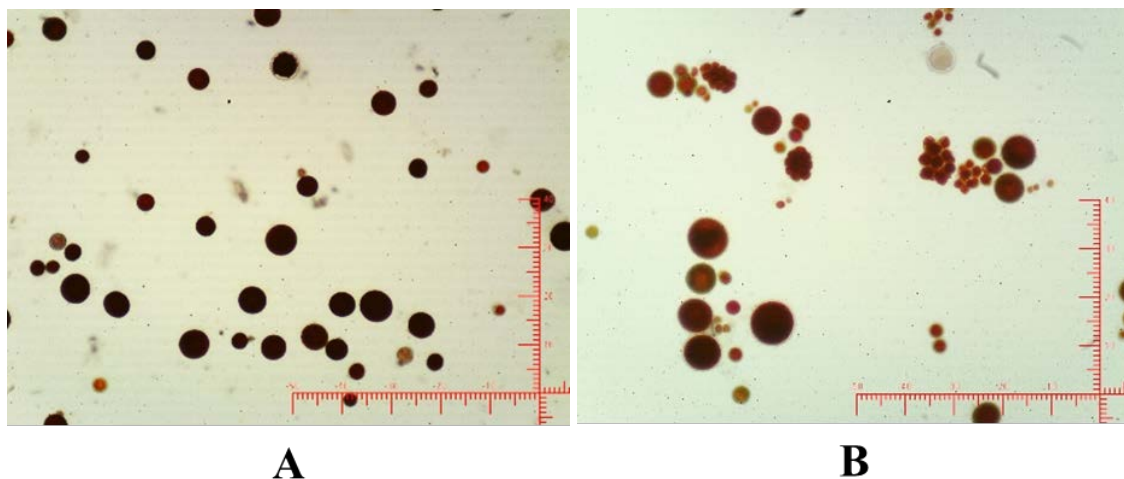
Hình 5. Kết quả hàm lượng astaxanthin trong sinh khối khô của vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường bổ sung CH₃COONa (%)

Sau 10 ngày nuôi, tỉ lệ hàm lượng astaxanthin tích lũy trong sinh khối khô của vi tảo *H. pluvialis* thấp nhất ở điều kiện bổ sung 30 mM CH₃COONa, chỉ đạt 0,82 %. Điều kiện bổ sung 10 mM CH₃COONa là điều kiện nuôi đạt kết quả cao nhất, đạt 1,51 %, kết quả này khác biệt hoàn toàn so với tất cả các điều kiện nuôi còn lại (p < 0,05; n = 3). Kết quả tính toán hàm lượng astaxanthin tích lũy theo diện tích nuôi cho thấy điều kiện bổ sung 10 mM CH₃COONa đạt 1019,14 mg m⁻² sau 10 ngày nuôi. Tuy nhiên, lượng astaxanthin thu được còn liên quan đến sinh khối tảo thu được, nên đây chưa phải là điều kiện nuôi thu được lượng astaxanthin cao nhất, mà nghiệm thức bổ sung 35 mM CH₃COONa mới là nghiệm thức cho kết quả tích lũy astaxanthin cao nhất, đạt 1275,03 mg m⁻²; cao gấp 3,32 lần so với ĐC (đạt 384,10 mg m⁻²).

Việc bổ sung thêm nguồn carbon vừa có ý nghĩa với sinh trưởng, vừa có ý nghĩa với sự tổng hợp astaxanthin của vi tảo. Trong thời gian đầu, tảo mới được cố định trên lớp nền sẽ nhận điều kiện dinh dưỡng dồi dào và ánh sáng mạnh để sinh trưởng. Theo thời gian, lớp vi tảo tăng sinh ngày càng dày. Lớp tảo phía chịu ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng mạnh và lượng dinh dưỡng ít hơn nhanh chóng chuyển sang pha đỏ, tăng cường tích lũy astaxanthin; trong khi đó, lớp tảo phía dưới vẫn ở trạng thái pha xanh. Lượng tảo xanh này có điều kiện dinh dưỡng hơn nhưng lại bị che bóng, hạn chế về ánh sáng. Việc bổ sung thêm carbon vào môi trường lúc này sẽ giúp cho tảo tiếp tục tăng sinh (Kang et al., 2005),

(Cifuentes et al., 2003). Thêm vào đó, việc bổ sung thêm carbon vào môi trường nuôi tảo đã được làm cạn kiệt dinh dưỡng còn giúp tăng tỉ lệ C/N trong môi trường nuôi, kích thích *H. pluvialis* chuyển sang pha tích lũy astaxanthin nhanh chóng chỉ trong vòng 1 đến 3 ngày và tích lũy astaxanthin với hàm lượng lớn (Kakizono, Kobayashi, & Nagai 1992), (Tripathi, Sarada, & Ravishankar 2002). So với các phương pháp sử dụng các tác nhân khác như chiếu ánh sáng cao, thiếu hụt nitơ, sốc muối... thì phương pháp cảm ứng bằng cách bổ sung thêm C có tính khả thi, dễ dàng áp dụng hơn, có thể sử dụng trên quy mô lớn (Luu, 2017; Wan et al., 2015).

Qua thử nghiệm với 2 nguồn carbon NaHCO_3 và CH_3COONa , kết quả đã chỉ ra rằng cả hai nguồn carbon đều có tác động tích cực trong việc nâng cao sinh khối và khả năng tích lũy astaxanthin của vi tảo *Haematococcus pluvialis*. Sau thời gian bổ sung NaHCO_3 vào môi trường nuôi cấy, tế bào tảo chủ yếu ở dạng cyst và tích lũy astaxanthin bên trong tế bào, hàm lượng astaxanthin tích lũy trong tế bào tăng mạnh (Hình 5A). Kết quả tương tự cũng được Lưu Thị Tâm (2017) ghi nhận trên mô hình nuôi cấy huyền phù vi tảo *H. pluvialis* HB (Luu 2017). Một số nghiên cứu khác trên thế giới cũng có cùng kết luận về việc sử dụng bicarbonate để giúp *H. pluvialis* tăng sinh khối tốt hơn khi chỉ sử dụng CO_2 (Devgoswami et al., 2013; Kang et al., 2005). Với nguồn carbon là CH_3COONa , kết quả ghi nhận sau thời gian bổ sung, muối acetate có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng của vi tảo *H. pluvialis*, hình ảnh thu được khi quan sát trên kính hiển vi vẫn cho thấy khả năng sinh sản của *H. pluvialis* sau 10 ngày nuôi (Hình 5B). Trước đây, các nghiên cứu nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* dạng dịch treo cũng cho thấy acetate có ảnh hưởng kích thích sinh trưởng và cảm ứng tích lũy astaxanthin (Cifuentes et al., 2003; Kang et al., 2005).



Hình 6. Hình thái tế bào của vi tảo *H. pluvialis* dưới kính hiển vi độ phóng đại $10\times$ khi nuôi trong môi trường bổ sung NaHCO_3 (A) và CH_3COONa (B)

So sánh kết quả thử nghiệm giữa 2 điều kiện nuôi bổ sung nguồn carbon vô cơ từ NaHCO_3 và nguồn carbon hữu cơ từ CH_3COONa , có thể thấy rằng muối bicarbonate có ảnh hưởng mạnh đến việc cảm ứng, kích thích tăng cường tích lũy astaxanthin của, trong khi

muối acetate có tác động tích cực hơn đến sinh khối của vi tảo *H. pluvialis*. Bên cạnh đó, lượng astaxanthin thu được sau 10 ngày nuôi trong điều kiện nuôi bổ sung CH_3COONa 35 mM là cao hơn, đạt 1275,03 mg m^{-2} . Áp dụng điều kiện nuôi này đã tăng hiệu quả nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* trên hệ thống TL-PSPBR nghiêng lên rất nhiều so với việc chỉ bổ sung khí CO_2 vào môi trường nuôi. Cụ thể, lượng sinh khối khô thu được sau thời gian nuôi đã tăng hơn 1,91 lần; lượng astaxanthin cao hơn gấp 3,32 lần và tỉ lệ astaxanthin tích lũy trong sinh khối cũng nhiều hơn 1,75 lần.

Với đối tượng nuôi cấy là vi tảo *H. pluvialis*, hệ thống TL-PSPBR nghiêng đã thành công nuôi cấy và kích thích vi tảo sản xuất astaxanthin. Lượng astaxanthin thu được trong nghiên cứu này có thể đạt 127,50 mg m^{-2} ngày⁻¹; kết quả này cao hơn và thời gian nuôi cấy ngắn hơn so với một số các nghiên cứu trước đây. Trên mô hình nuôi cấy huyền phù, hệ thống nuôi bể hở ngoài trời được tiến hành bởi Wan và cộng sự (2014) nuôi vi tảo trong 20 ngày, lượng astaxanthin thu được khoảng 40 mg m^{-2} ngày⁻¹ (Wan et al., 2014); hệ thống nuôi bể hở trong nhà (Zhang et al., 2009) nuôi vi tảo trong 12 ngày, astaxanthin thu được 61 mg m^{-2} ngày⁻¹ (Zhang et al., 2009); Lưu Thị Tâm (2017) thu được lượng astaxanthin khoảng 92 mg m^{-2} ngày⁻¹ khi nuôi vi tảo trong các bình 10 L kín (Luu 2017; Tran et al., 2019). Trên mô hình nuôi cấy tảo bất động, Wan và cộng sự (2014) đã nuôi cấy *H. pluvialis* trong 12 ngày và thu được lượng astaxanthin đạt 65,8 mg m^{-2} ngày⁻¹, tỉ lệ astaxanthin trong sinh khối khô đạt 1,3% (Wan et al., 2014).

Một số nghiên cứu trước đây sử dụng mô hình nuôi cấy dịch treo để nuôi vi tảo *H. pluvialis*, có thể ghi nhận được tỉ lệ astaxanthin rất cao, đạt từ 2 đến hơn 4% (Zhang et al., 2009), (Torzillo et al., 2003). Trong công bố của Lưu Thị Tâm (2017), tác giả đã nuôi vi tảo *H. pluvialis* trong hơn 30 ngày, tỉ lệ astaxanthin đạt 4,88 %, lượng astaxanthin thu được trong khoảng 92 mg m^{-2} ngày⁻¹ (Luu 2017; Tran et al., 2019). Nhưng trong sản xuất, thời gian nuôi và nhất là lượng sản phẩm thu được (sinh khối và astaxanthin) là những yếu tố góp phần không nhỏ trong việc tạo ra lợi nhuận, được quan tâm để hướng tới ứng dụng sản xuất. Như vậy, với thời gian nuôi chỉ 10 ngày (2 pha xanh và đỏ), thu được 9,48 g m^{-2} ngày⁻¹ SKK; 127,5 mg m^{-2} ngày⁻¹ astaxanthin, cùng với các ưu điểm ít hao phí về hệ thống và nhân lực... hệ thống TL-PSPBR nghiêng đã cho thấy những ưu điểm để ứng dụng nuôi và thu nhận astaxanthin từ vi tảo *H. pluvialis* trên quy mô lớn.

4. Kết luận

Hệ thống TL-PSPBR nghiêng sử dụng môi trường BG-11, nguồn carbon bổ sung từ muối CH_3COONa nồng độ 35 mM ở ngày nuôi 8, 9, 10 là điều kiện nuôi có thể được sử dụng để nuôi cấy vi tảo *H. pluvialis* CCAC 0125 đạt hiệu quả cao.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Berner, F., Heimann, K., & Sheehan, M. (2015). Microalgal biofilms for biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1793-1804. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0489-x>
- Cifuentes, A. S., González, M. A., Vargas, S., Hoeneisen, M., & González, N. (2003). Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 36(3-4), 343-357. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006>
- Devgoswami, C., Kalita, M., Talukdar, J., Bora, R., & Sharma, P. (2011). Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. *African Journal of Biotechnology*, 10(61), 13128-13138. <https://doi.org/10.5897/AJB11.888>
- 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*, 8(3), 68. <https://doi.org/10.3390/biology8030068>
- Emma Huertas, I., Colman, B., Espie, G. S., & Lubian, L. M. (2000). Active transport of CO₂ by three species of marine microalgae. In *Journal of Phycology* (Vol. 36, Issue 2, pp. 314-320). <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99142.x>
- Göksan, T. (2010). An Alternative Approach to the Traditional Mixotrophic Cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), 1276-1282. <https://doi.org/10.4014/jmb.0909.09005>
- Gross, M., Jarboe, D., & Wen, Z. (2015). Biofilm-based algal cultivation systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(14), 5781-5789. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6736-5>
- Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., & Tanaka, H. (2001). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*, 13(5), 395-402. <https://doi.org/10.1023/A:1011921329568>
- Jeon, Y.-C., Cho, C.-W., & Yun, Y.-S. (2006). Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.021>
- Kakizono, T., Kobayashi, M., & Nagai, S. (1992). Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Researchgate.Net*, 74(6), 403-405. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90041-R](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90041-R)
- Kang, C. D., Lee, J. S., Park, T. H., & Sim, S. J. (2005). Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68(2), 237-241. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1889-2>
- Kiperstok, A. C., Melkonian, P. D. M., & Becker, P. D. B. (2016). Optimizing immobilized cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production [Universität zu Köln.]. In *Faculty of Mathematics and Natural Sciences-Botanical Institute: Vol. PhD*. <https://kups.ub.uni-koeln.de/6728/>
- Kobayashi, M., Kakizono, T., & Nagai, S. (1993). Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 867-873. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.867-873.1993>
- 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). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx218>

- Luu, T. T. (2017). *Study on biological characteristics and astaxanthin rich biomass production of microalga Haematococcus pluvialis Flotow to applications for aquaculture*. Doctoral thesis in Biology, Institute of Biotechnology.
- Merrett, M. J., Nimer, N. A., & Dong, L. F. (1996). The utilization of bicarbonate ions by the marine microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd. *Plant, Cell and Environment*, 19(4), 478-484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00340.x>
- Naumann, T., Çebi, Z., Podola, B., & Melkonian, M. (2013). Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1413-1420. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9962-6>
- Nowack, E. C. M., Podola, B., & Melkonian, M. (2005). The 96-Well Twin-Layer System: A Novel Approach in the Cultivation of Microalgae. *Protist*, 156(2), 239-251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.04.003>
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., & Abalde, J. (2001). Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnology Letters*, 23(5), 373-378. <https://doi.org/10.1023/A:1005624005229>
- Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. Bin, Sulaiman, A. Z., & Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
- Ozkan, A., Kinney, K., Katz, L., & Berberoglu, H. (2012). Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresour Technol*, 114, 542-548. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.055>
- Pan-utai, W., Parakulsuksatid, P., & Phomkaivon, N. (2017). Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 152-158.
- Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas | Request PDF. (n.d.). Retrieved July 31, 2021, from https://www.researchgate.net/publication/256840858_Studies_on_the_growth_behavior_of_Chlorella_Haematococcus_and_Scenedesmus_sp_in_culture_media_with_different_concentrations_of_sodium_bicarbonate_and_carbon_dioxide_gas
- Torzillo, G., Goksan, T., Faraloni, C., Kopecky, J., & Masojídek, J. (2003). Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. *Journal of Applied Phycology*, 15(2), 127-136. <https://doi.org/10.1023/a:1023854904163>
- 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.
- Tripathi, U., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2002). Effect of culture conditions on growth of green alga — *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(3), 323-329. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0058-9>
- Wan, M., Hou, D., Li, Y., Fan, J., Huang, J., Liang, S., Wang, W., Pan, R., Wang, J., & Li, S. (2014). The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresour Technol*, 163, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.017>

- Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. *Bioresour Technol*, 167, 276–. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.030>
- Wan, M., Zhang, Z., Wang, J., Huang, J., Fan, J., Yu, A., Wang, W., & Li, Y. (2015). Sequential Heterotrophy–Dilution–Photoinduction Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient production of astaxanthin. *Bioresource Technology*, 198, 557-563. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.031>
- Yin, S., Wang, J., Chen, L., & Liu, T. (2015). The water footprint of biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* is greatly decreased by using sealed narrow chambers combined with slow aeration rate. *Biotechnol Lett*, 37(9), 1819-1827. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1864-7>
- Zhang, B. Y., Geng, Y. H., Li, Z. K., Hu, H. J., & Li, Y. G. (2009). Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*, 295(3), 275-281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.043>
- Zhang, W., Wang, J., Wang, J., & Liu, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresour Technol*, 158, 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.044>

HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS IN A TILTED TWIN-LAYER POROUS SUBSTRATE PHOTOBIOREACTOR SYSTEM: EFFECTS OF DIFFERENT CARBON SOURCES ON ASTAXANTHIN GROWTH AND ACCUMULATION

*Nguyen Hong Ngoc Bao*¹, *Do Thanh Tri*^{2*},

*Nguyen Thanh Cong*³, *Ong Binh Nguyen*³, *Tran Hoang Dung*⁴

¹University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam

³Nguyen Tat Thanh University, Vietnam

⁴Ho Chi Minh City University of Food Industry, Vietnam

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

Received: June 16, 2022; Revised: September 22, 2022; Accepted: September 26, 2022

ABSTRACT

*Microalgae are known to be an important source of organic compounds with many different applications. However, microalgae culture mainly uses the suspension culture model, consumes a lot of water and energy, and harvesting requires money and labor. The Algae culture model on Twin-layer photobioreactor system can overcome the above disadvantages. In this study, the inclined TL-PSBR system was used to culture *Haematococcus pluvialis* microalgae and tested for carbon source addition from NaHCO₃ or CH₃COONa at different concentrations. The test results showed that 35 mM CH₃COONa was added to the *H. pluvialis* microalgae culture medium for high efficiency. The amount of dry biomass obtained on the system reached 94.78 g m⁻², and the accumulated astaxanthin amount reached 1275.03 mg m⁻² after only ten days of culture. These results are better than using only CO₂ (dry biomass increased by 1.91 times; astaxanthin amount was 3.32 times, and the percentage of astaxanthin accumulated in biomass was more than 1.75 times). The results suggest using CH₃COONa in microalgae culture on a tilted TL-PSBR system, producing astaxanthin.*

Keywords: Astaxanthin; carbon source; *Haematococcus pluvialis*; porous substrate; twin-layer; photobioreactor