

Bài báo nghiên cứu

**CHIẾN LƯỢC NUÔI CẤY TĂNG TÍCH LŨY CAROTENOID
VÀ LIPID Ở VI TẢO *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

Triệu Quốc Huy, Võ Hồng Trung*, Trương Ngọc Hiền, Nguyễn Thị Hồng Phúc

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Võ Hồng Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Ngày nhận bài: 19-01-2022; ngày nhận bài sửa: 25-3-2022; ngày duyệt đăng: 26-3-2022

TÓM TẮT

Haematococcus pluvialis là một loài vi tảo lục đơn bào có giá trị thương mại cao nhờ khả năng tích lũy một lượng lớn carotenoid đặc biệt là astaxanthin dưới các điều kiện nuôi cấy bất lợi. Ánh sáng cao hay cạn kiệt dinh dưỡng đều góp phần ảnh hưởng lên sự tăng trưởng, sự tích lũy carotenoid và lipid ở vi tảo. *Haematococcus pluvialis* nuôi cấy ở ba điều kiện cạn kiệt dinh dưỡng, ức chế bằng ánh sáng tự nhiên, và ức chế bằng cách khử nitrat và bổ sung NPK trên môi trường BG11 nhằm khảo sát hàm lượng lipid và carotenoid của vi tảo. Kết quả cho thấy tế bào *H. pluvialis* tích lũy hàm lượng sắc tố carotenoid cao ở điều kiện nuôi cấy khử nitrat và bổ sung NPK ($54,709 \pm 1,905$ mg/g) và hàm lượng lipid đạt cao nhất ở điều kiện nuôi cấy ức chế ánh sáng tự nhiên ($5,434 \pm 0,146$ mg/100g).

Từ khóa: carotenoid; *Haematococcus pluvialis*; vi tảo lục; lipid

1. Giới thiệu

Hiện nay, vi tảo là đối tượng tiềm năng có hoạt tính sinh học mới nhằm cải thiện sức khỏe, thẩm mỹ gồm carotenoid, lipid, protein, cacbohydrat, chất màu... (Sathasivam & Ki, 2018). Trong đó, carotenoid là chất có hoạt tính chống oxy hóa, bảo vệ con người khỏi phản ứng oxy hóa gây tổn hại tế bào, lão hóa sớm, một số bệnh ung thư, bệnh tim mạch và viêm khớp (Gong & Bassi, 2016). Vi tảo có thể tạo ra nhiều lipid hơn bất kỳ loại cây trồng thông thường nào khác và giàu acid béo omega-3 chuỗi dài EPA và DHA, là nguồn cung cấp bền vững hơn những acid béo này để sử dụng trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi so với dầu cá (Ryckebosch, Muylaert, & Foubert, 2012). Vì vậy, nhiều nghiên cứu sử dụng các yếu tố bất lợi của môi trường nuôi cấy nhằm gia tăng sản xuất carotenoid và lipid ở vi tảo, đây được coi là một chiến lược nuôi cấy vi tảo hiện nay.

Haematococcus pluvialis là một loại tảo lục đơn bào thuộc họ *Haematococcaceae*, được biết với khả năng tích lũy hàm lượng lớn carotenoid đặc biệt là astaxanthin trong các

Cite this article as: Trieu Quoc Huy, Vo Hong Trung, Truong Ngoc Hien, & Nguyen Thi Hong Phuc (2022). Cultural strategy increase accumulation of carotenoid and lipid in *Haematococcus Pluvialis*. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(3), 492-500.

điều kiện nuôi cấy ức chế, là một vi tảo tiềm năng cho các ứng dụng sinh học và nhiên liệu sinh học (Damiani, Popovich, Constenla, & Leonardi, 2010). Trong hầu hết các điều kiện ức chế, vi tảo *H. pluvialis* tích tụ lipid trung tính, song song với ester astaxanthin. Các lipid trung tính tăng lên trong các điều kiện không thuận lợi được xem như một chất nền để hòa tan các ester astaxanthin (Saha et al., 2013). Vì vậy, *Haematococcus* được xem là loài vi tảo sản xuất chủ yếu lipid và astaxanthin thương mại ở quy mô lớn.

Cường độ ánh sáng mạnh đặc biệt là ánh sáng tự nhiên hoặc môi trường cạn kiệt nguồn dinh dưỡng như thiếu hụt nitrat hay phosphat đều góp phần gia tăng sự tích lũy astaxanthin và lipid, tuy nhiên việc này có thể tổn thương và kìm hãm sự tăng trưởng của tế bào vi tảo (Shi, Wang, Zhang, Sun, & Huang, 2020). Theo Trịnh Ngọc Nam và cộng sự, hàm lượng astaxanthin ở vi tảo tích lũy cao nhất ở cường độ ánh sáng 8 klux đạt $132 \pm 7,8 \mu\text{g/lít}$ sau 10 ngày nuôi cấy và trên môi trường có nguồn nitrate giảm 50% hoặc không có nitrat, hàm lượng astaxanthin thu nhận được lần lượt là $85 \pm 7,9 \mu\text{g/lít}$ và $114 \pm 6,8 \mu\text{g/lít}$, cao gấp 2 và 2,5 lần so với môi trường đối chứng có đầy đủ nguồn dinh dưỡng nitrate (Trinh et al., 2020). Trong nuôi cấy vi tảo *Haematococcus* cần xác định được điều kiện ức chế nào là tối ưu cho giai đoạn nuôi ức chế để giúp tế bào tích lũy được lượng lớn astaxanthin và các hợp chất lipid thứ cấp. Vì vậy, vi tảo *H. pluvialis* được sử dụng để nuôi cấy dưới ba điều kiện khác nhau là cạn kiệt dinh dưỡng, ức chế bằng ánh sáng tự nhiên, và ức chế khử nitrat và bổ sung NPK trên môi trường BG11 nhằm nghiên cứu khả năng tích lũy hàm lượng carotenoid và lipid một cách tối ưu nhất của vi tảo.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. *Chủng Haematococcus pluvialis* và điều kiện nuôi cấy

Chủng vi tảo *Haematococcus pluvialis* (UTEX 2505) được nuôi cấy tại Phòng Thí nghiệm Hóa Sinh – Độc chất Trường Đại học Nguyễn Tất Thành. *H. pluvialis* được nuôi cấy trên môi trường BG11 (Torzillo, Goksan, Faraloni, Kopecky, & Masojídek, 2003), cường độ ánh sáng $20 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ, nhiệt độ nuôi cấy $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2. Các phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu hoạch sinh khối tảo *Haematococcus pluvialis*

Li tâm dịch nuôi cấy tảo trong falcon 15 mL với tốc độ 5000 vòng/15 phút để lấy sinh khối tảo. Sau đó sấy bằng tủ sấy ở 60°C đến khi khô hoàn toàn. Mẫu thu được bảo quản ở -20°C .

2.2.2. Xác định hàm lượng carotenoid tổng

Lấy 0,01g bột tảo vào ống nghiệm có nắp, thêm 1 mL HCl 4M vào hòa tan sau đó đem đun cách thủy ở 70°C dưới 10 phút. Thêm 5 mL n-hexane vào, bọc giấy bạc xung quanh ống và đem lắc từng ngày. Sau mỗi ngày lắc, lớp sắc tố có n-hexane bên trên sẽ được lấy ra và mang đi li tâm 5000 v/p trong 3 phút, sau đó cô cạn phần hexane đã li tâm, bổ sung lại 5 mL n-hexane vào ống nghiệm, đem lắc và làm tiếp tục đến khi không còn sắc

tổ trên lớp n-hexane. Lớp sắc tố đã được cô ở lần cuối cùng sẽ được hòa tan với 5 mL n-hexane, li tâm 5000 v/p trong 3 phút, sau đó lớp sắc tố có hexane bên trên sẽ được đọc ở các bước sóng 450 nm. Hàm lượng carotenoid tổng được xác định theo công thức:

$$\text{Carotenoid } (\mu\text{g/g}) = \frac{A_{450} \times 25,2}{\text{Khối lượng cân}} \text{ (Prieto, Canavate, \& García-Gonzalez, 2011)}$$

2.2.3. Xác định hàm lượng lipid bằng phương pháp Sulfo-Phospho-Vanillin

Thuốc thử Phosphovanillin: Hòa tan 0,06 g vanillin trong 2 mL ethanol nguyên chất, thêm 8 mL nước cất và lắc kỹ. Thêm vừa đủ 50 mL dung dịch acid phosphoric đậm đặc vào hỗn hợp trên và bảo quản trong tối cho quá trình phân tích (Park, Jeong, Yoon, & Moon, 2016), (Mishra et al., 2014).

Xác định hàm lượng lipid ở *Haematococcus pluvialis*: lấy 0.001 g tảo đã được sấy khô và nghiền mịn cho vào ống nghiệm có nắp, thêm 4 mL acid sulfuric đậm đặc (98%), đun trên bếp cách thủy ở 100°C trong 10 phút và vortex kỹ. Bổ sung 5 mL thuốc thử SPV (Phosphovanillin) đã được chuẩn bị sẵn, hỗn hợp được ủ ở 37°C và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm (Park et al., 2016), (Mishra et al., 2014). Hàm lượng lipid có trong mẫu được xác định bằng đường chuẩn lipid.

Đường chuẩn lipid: Dầu cải thương mại (hiệu Tường An) được pha trong chloroform (nồng độ 1 mg/mL), nồng độ lipid chuẩn (10-150 µg) được thực hiện trong các ống nghiệm có nắp. Ủ các ống nghiệm ở nhiệt độ 90°C, 10 phút để bay hơi chloroform. Thêm 2 mL acid sulfuric đậm đặc, sau đó đun trên bếp cách thủy 100°C trong 10 phút, làm lạnh trong bể nước đá. Bổ sung 5 mL thuốc thử Phosphovanillin, hỗn hợp được ủ ở 37°C và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm.

2.3. Thiết kế thí nghiệm

Haematococcus pluvialis chuẩn bị thí nghiệm: *H. pluvialis* được nuôi cấy trên môi trường BG11 (Torzillo et al., 2003) đạt pha tăng trưởng sau 10 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện qua 2 giai đoạn:

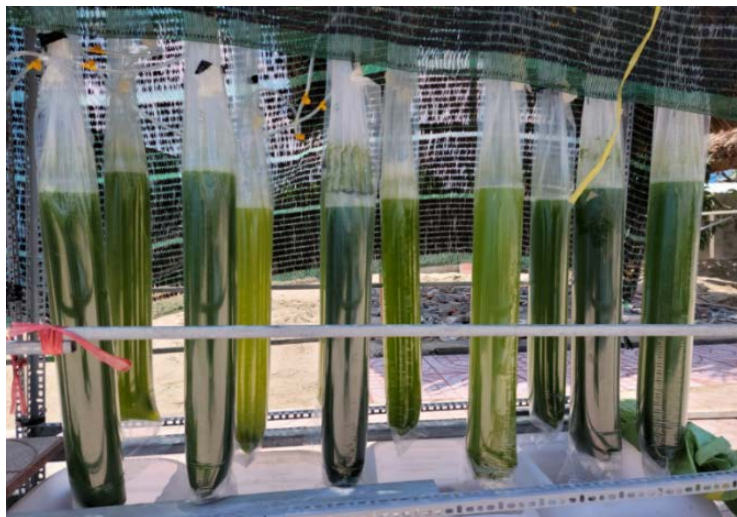
Giai đoạn nuôi cấy tăng trưởng: Trong 18 ngày đầu, *H. pluvialis* được nuôi trong hệ thống plastic bag bioreactor (Hình 1) bao gồm 5 L môi trường và dịch tảo, PH = 7,1, mật độ tăng trưởng tế bào vi tảo ban đầu khoảng $0,3 \times 10^6$ tế bào (tb/mL), cường độ ánh sáng 100 µmol photon/m²/s (chu kì sáng: tối = 12 : 12 giờ), nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và sục khí liên tục.

Giai đoạn nuôi cấy ức chế: Sau 18 ngày nuôi cấy tăng trưởng, *H. pluvialis* được chuyển qua các điều kiện nuôi cấy.

- Cạn kiệt dinh dưỡng (đối chứng): Sau 18 ngày nuôi cấy, *H. pluvialis* được giữ nguyên như điều kiện ban đầu trong hệ thống plastic bag bioreactor.
- Khử nitrat bổ sung NPK (-Nitrat + NPK): Sau 18 ngày nuôi cấy, môi trường được loại bỏ và bổ sung môi trường BG11 không nitrat, 4 ngày sau bổ sung NPK hiệu Đầu Trâu MK501 vào môi trường với nồng độ 0,1 g/L.

- Ức chế ánh sáng tự nhiên (ASTN): Sau 18 ngày nuôi cấy, *H. pluvialis* được ức chế dưới ánh sáng tự nhiên, cường độ ánh sáng trong ngày vào buổi sáng và buổi trưa đạt trên 833 đến > 1000 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, vào buổi chiều đạt khoảng 500 đến 600 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, sục khí liên tục.

Thu hoạch vi tảo sau 18 ngày nuôi cấy ức chế bằng phương pháp li tâm và phân tích hàm lượng carotenoid và hàm lượng lipid của *H. pluvialis* ở các nghiệm thức. Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần.



Hình 1. Các túi tảo được nuôi bằng hệ thống plastic bag bioreactor

2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft Office Excel và phân tích oneway ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với sai số ý nghĩa $p \leq 0,05$. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình (Mean) \pm Sai số chuẩn (SE).

3. Kết quả và thảo luận

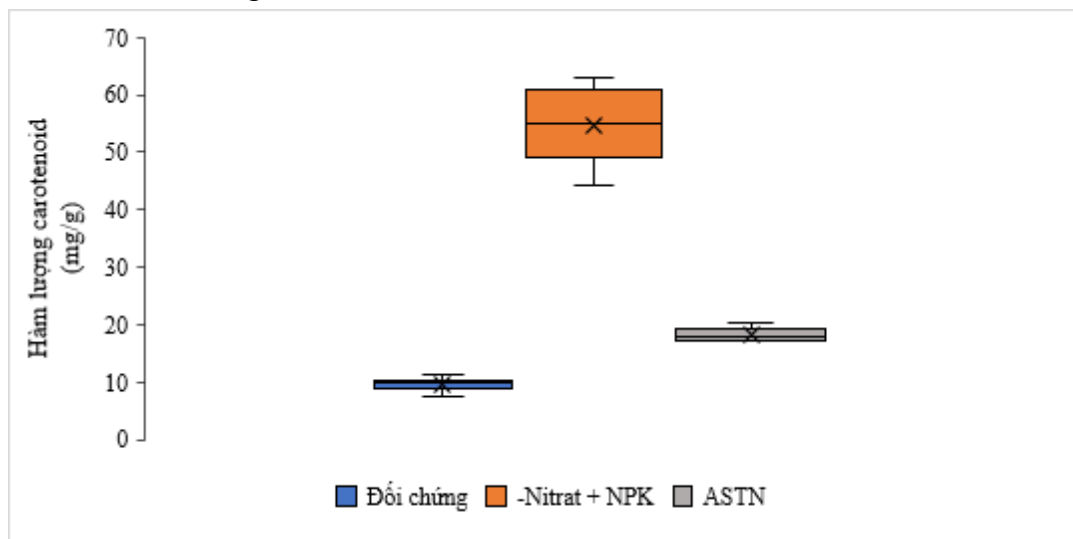
3.1. Hàm lượng carotenoid

Hàm lượng carotenoid của vi tảo *H. pluvialis* nuôi cấy trong môi trường BG11 ở điều kiện ức chế khử nitrat và bổ sung NPK đạt giá trị cao nhất (54,709 mg/g) so với hai điều kiện ức chế ánh sáng tự nhiên (18,308 mg/g) và nuôi cạn kiệt dinh dưỡng (9,532 mg/g) ($p \leq 0,05$). (Hình 2, Bảng 1).

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã cho rằng nitrat là nguồn dinh dưỡng phù hợp nhất cho vi tảo *Haematococcus pluvialis* (Yuan & Chen, 2001). Nồng độ nitrat thích hợp trong môi trường nuôi cấy giúp kéo dài trạng thái sinh dưỡng của tế bào *H. pluvialis* (Ranjbar, Inoue, Shiraishi, Katsuda, & Katoh, 2008). Tuy nhiên, sự thiếu hụt nguồn nitrat trong môi trường sẽ cảm ứng mạnh mẽ sự tích lũy carotenoid sản sinh trong tế bào (Trinh et al., 2020), (Zhekisheva, Boussiba, Khozin-Goldberg, Zarka, & Cohen, 2002), (Solovchenko, Merzlyak, Khozin-Goldberg, Cohen, & Boussiba, 2010). Trong nghiên cứu hiện tại, việc

ức chế bằng cách loại nitrat ra khỏi môi trường nuôi ngay từ ban đầu và bổ sung phân bón NPK sau 4 ngày ức chế nhằm bổ sung nguồn dinh dưỡng đa lượng để kích thích lại sự tăng trưởng của vi tảo, thu được tối đa hàm lượng carotenoid. Thêm vào đó, tỉ lệ diện tích bề mặt trên thể tích của vi tảo cao nên đã khiến cho vi tảo đáp ứng nhanh với điều kiện bất lợi này (Byrd, Burkholder, & Zimba, 2017).

Sự tích lũy astaxanthin ở vi tảo *H. pluvialis* thường xảy ra mạnh mẽ ở giai đoạn bào nang khi tế bào chịu các tác động bất lợi của điều kiện môi trường nuôi cấy. Ở điều kiện ức chế ánh sáng tự nhiên với cường độ ánh sáng tự nhiên cao thêm vào đó là tia UV có sẵn trong ánh sáng mặt trời thì lượng astaxanthin gia tăng càng nhanh và lượng astaxanthin càng lớn. Điều này là do khi tiếp xúc với cường độ ánh sáng cao và tia UV, tế bào *H. pluvialis* sử dụng con đường tổng hợp carotenoid như một cơ chế bảo vệ chống lại các tổn thương do ánh sáng và tổn thương oxy hóa của tế bào. Sự tổng hợp carotenoid được tăng cường bởi ROS (reactive oxygen species) dưới các điều kiện ức chế như cường độ ánh sáng cao (Minhas, Hodgson, Barrow, & Adholeya, 2016). Do đó, cường độ ánh sáng và tia UV được coi là những yếu tố môi trường quan trọng ảnh hưởng đến sự tích lũy astaxanthin trong *H. pluvialis*. Tuy nhiên, cường độ ánh sáng tự nhiên không đều trong ngày, cường độ mạnh vào buổi sáng và trưa nhưng cường độ lại yếu dần khi về chiều và tối đã khiến cho vi tảo tích lũy hàm lượng carotenoid không ổn định, điều này đã dẫn đến việc vi tảo khi ức chế bằng ánh sáng tự nhiên tích lũy hàm lượng carotenoid thấp hơn so với ức chế khử nitrate bổ sung NPK.



Hình 2. Hàm lượng carotenoid trên khối lượng của *H. pluvialis* ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau

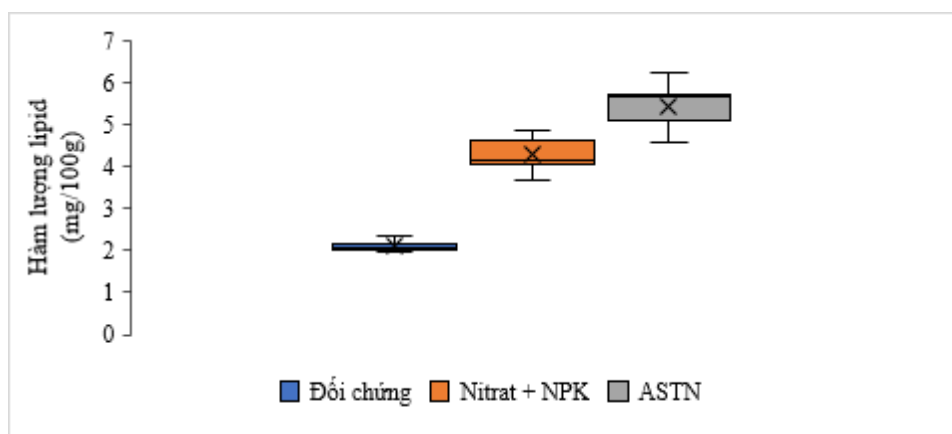
3.2. Hàm lượng lipid

Hàm lượng lipid của vi tảo *H. pluvialis* trong môi trường BG11 tăng lên sau ức chế cường độ ánh sáng tự nhiên, và khử nitrat và bổ sung NPK. Ở điều kiện ức chế ánh sáng tự nhiên, hàm lượng lipid đạt giá trị cao nhất (5,434 mg/100g) so với hai điều kiện ức chế khử

nitrat và bổ sung NPK (4,267 mg/100g) và nuôi cạn kiệt dinh dưỡng (2,092 mg/100g) ($p \leq 0,05$) (Hình 3, Bảng 1).

Nhiều nghiên cứu cho thấy ở vi tảo *Haematococcus*, carotenoid thứ cấp và lipid được tổng hợp đồng thời trong các điều kiện nuôi cấy bất lợi (Byrd et al., 2017). Nitrat là nguồn dinh dưỡng đa lượng quan trọng cho sự tăng trưởng và biến dưỡng của vi tảo. Nó cũng là thành phần chính của protein, vật liệu di truyền và quá trình biến dưỡng lipid, acid béo (Griffiths & Harrison, 2009). Vi tảo có tỉ lệ diện tích bề mặt trên thể tích cao nên tạo điều kiện đáp ứng nhanh với những điều kiện môi trường thay đổi và chúng có thể thay đổi nhanh sự chuyển hóa lipid trong các điều kiện môi trường này như ức chế khử nitrat (Byrd et al., 2017). Nên việc thiếu nitrat trong môi trường nuôi cấy làm giảm tốc độ tăng trưởng nhưng tích lũy lượng lớn các hợp chất thứ cấp như lipid. Do vậy, việc ức chế bằng cách loại bỏ nitrat ra khỏi môi trường sống của vi tảo sẽ làm cảm ứng sự tích lũy lipid và sau đó bổ sung phân bón NPK để kích thích lại sự tăng trưởng của vi tảo.

Khi ức chế bởi điều kiện ánh sáng tự nhiên có cường độ ánh sáng cao và kèm theo đó là tia UV, sự sản xuất lipid tăng khi tăng cường độ ánh sáng, hàm lượng acid béo không bão hòa nhiều nối đôi (PUFA) cao dưới cường độ ánh sáng thấp, tuy nhiên ở cường độ ánh sáng cao gây ra sự tích lũy lượng lớn acid béo bão hòa và acid béo không bão hòa một nối đôi (Minhas et al., 2016). Stress oxy hóa và sự tăng sản xuất lipid có mối liên kết với nhau, stress oxy hóa là trung gian gây tích lũy lipid (Yilancioglu, Cokol, Pastirmaci, Erman, & Cetiner, 2014). Ngoài ra, khi *H. pluvialis* đáp ứng với cường độ ánh sáng cao hoặc đói nitrat, vi tảo sẽ tích tụ đồng thời lipid trung tính và cả astaxanthin (Zhekisheva et al., 2002). Do đó, tín hiệu lipid của *H. pluvialis* tăng sau ức chế là phù hợp với các nghiên cứu trước đó.



Hình 3. Hàm lượng lipid trên khối lượng của *H. pluvialis* ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau

Bảng 1. Hàm lượng lipid và carotenoid trên khối lượng của *H. Pluvialis* trên môi trường BG11 ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau

	Nuôi cạn kiệt dinh dưỡng	Khử nitrat bổ sung NPK	Ức chế ánh sáng tự nhiên
Carotenoid (mg/g)	9,532 ± 0,330 ^a	54,709 ± 1,905 ^c	18,308 ± 0,334 ^b
Lipid (mg/100g)	2,092 ± 0,034 ^a	4,267 ± 0,114 ^b	5,434 ± 0,146 ^c

4. Kết luận

Vi tảo *H. pluvialis* tích lũy lượng lớn carotenoid và lipid dưới các điều kiện nuôi cấy ức chế. Ở 3 điều kiện nuôi cấy, ức chế khử nitrat bổ sung NPK vi tảo *H. pluvialis* tích lũy hàm lượng carotenoid cao nhất (54,709 mg/g). Tuy nhiên, ở điều kiện ức chế ánh sáng tự nhiên hàm lượng lipid đạt giá trị (5,434 mg/100g) cao hơn so với 2 điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng và khử nitrat bổ sung NPK.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Byrd, S. M., Burkholder, J. M., & Zimba, P. V. (2017). Environmental stressors and lipid production by *Dunaliella* spp. I. Salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 18-32.
- Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource technology*, 101(11), 3801-3807.
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances*, 34(8), 1396-1412.
- Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7, 546.
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, 155, 330-333.
- Park, J., Jeong, H. J., Yoon, E. Y., & Moon, S. J. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*, 31(4), 391-401.

- Prieto, A., Canavate, J. P., & García-González, M. (2011). Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of biotechnology*, 151(2), 180-185.
- Ranjbar, R., Inoue, R., Shiraishi, H., Katsuda, T., & Katoh, S. (2008). High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 575-580.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 189-198.
- Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., & Murray, P. (2013). Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 128, 118-124.
- Sathasivam, R., & Ki, J.-S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine drugs*, 16(1), 26.
- Shi, T.-Q., Wang, L.-R., Zhang, Z.-X., Sun, X.-M., & Huang, H. (2020). Stresses as first-line tools for enhancing lipid and carotenoid production in microalgae. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 610.
- Solovchenko, A., Merzlyak, M. N., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2010). Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *parietochloris incisa* (Chlorophyta, trebouxiophyceae) mutant deficient in $\delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light 1. *Journal of Phycology*, 46(4), 763-772.
- 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.
- Trinh, N. N., Truong, N. B. T., Huynh, T. H., Nguyen, T. D. H., & Tran, T. B. L. (2020). Nang cao su tich luy astaxanthin ở vi tảo *Haematococcus pluvialis* boi cac dieu kien stress cua moi trung nuoi cay [Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* under stress conditions]. *Journal of Science Technology & Food*, 13(1), 48.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS One*, 9(3), e91957.
- Yuan, J. P., & Chen, F. (2001). Indirect photometric ion chromatographic analysis of anions in *Haematococcus pluvialis* culture media. *Biotechnology letters*, 23(10), 757-760.
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., & Cohen, Z. (2002). Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 38(2), 325-331.

**CULTURAL STRATEGY INCREASE ACCUMULATION OF CAROTENOID AND LIPID
IN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS****Trieu Quoc Huy, Vo Hong Trung*, Truong Ngoc Hien, Nguyen Thi Hong Phuc**

Nguyen Tat Thanh Univesity, Vietnam

*Corresponding author: Vo Hong Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Received: January 19, 2022; Revised: March 25, 2022; Accepted: March 26, 2022

ABSTRACT

Haematococcus pluvialis is a unicellular green microalgae with high commercial value due to its ability to accumulate large amounts of carotenoids, especially astaxanthin under adverse culturing conditions. High light or nutrient depletion both contribute to the growth and accumulation of carotenoids and lipids in microalgae. In this study, three different inhibitory culture conditions, namely nutrient depletion inhibitor culture, natural light inhibition, and inhibited by denitrification supplemented with NPK, were performed on BG11 medium to investigate the function lipid and carotenoid content of microalgae *H. pluvialis*. The results showed that *H. pluvialis* cells accumulated high levels of carotenoid pigments in culture conditions of denitrification and NPK supplementation (54.709 ± 1.905 mg/g), and the highest lipid content was obtained in natural light conditions (5.434 ± 0.146 mg/100g).

Keywords: carotenoid; green microalgae; *Haematococcus pluvialis*; lipid