

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HCM  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

ĐỒ THÀNH TRÍ

NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP HỆ THỐNG  
QUANG SINH HỌC PHƯƠNG NGHIÊNG ĐIỆN  
TÍCH MÀNG 2 M<sup>2</sup> VÀ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY  
CỔ ĐỊNH VI TẢO *Haematococcus pluvialis*  
ĐỂ THU SINH KHỐI GIÀU ASTAXANTHIN

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số ngành: 62420201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

TP. Hồ Chí Minh - năm 2024

Công trình được hoàn thành tại: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM và Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học, trường Đại học Nguyễn Tất Thành

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Trần Hoàng Dũng
2. GS. TS. Michael Melkonian

Phản biện 1: PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam

Phản biện 2: TS. Nguyễn Hữu Thanh

Phản biện 3: TS. Phan Tường Lộc

Phản biện độc lập 1: TS. Nguyễn Hữu Thanh

Phản biện độc lập 2: TS. Phan Tường Lộc

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Cơ sở đào tạo họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, vào lúc ...giờ .... phút, ngày ... tháng ... năm ...

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện Tổng hợp Quốc gia Tp.HCM
2. Thư viện trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
3. Thư viện Trung tâm ĐHQG-HCM

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của luận án

Trong số các hệ thống nuôi tảo hiện nay, hệ thống quang sinh học màng đôi chất nền xốp phương thẳng đứng (vertical twin-layer porous substrate photobioreactor, TL-PSBR) là hệ thống nuôi tế bào tảo bất động được phát triển bởi Melkonian *et al.* (2007) và sau đó được ứng dụng thành công trong nuôi cấy nhiều loài vi tảo khác nhau, bao gồm cả *H. pluvialis*, đạt năng suất cao. Vi tảo lục *H. pluvialis* là một loài vi tảo đã được nghiên cứu nhiều về hình thái, sinh lí, công nghệ nuôi do giá trị kinh tế của loài này trong việc sản xuất astaxanthin. Astaxanthin là một hợp chất thuộc nhóm carotenoid có hoạt tính chống oxy hóa rất cao, được ứng dụng ngày càng nhiều trong chăn nuôi, dược phẩm, thực phẩm. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy việc nuôi vi tảo *H. pluvialis* kiểu cố định trong màng sinh học (MSH, biofilm) để thu astaxanthin đạt được một số kết quả nhất định. Tuy nhiên, vi tảo này cần ánh sáng cường độ cao (trên  $1000 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) trong giai đoạn chuyển pha tích lũy astaxanthin nên việc sử dụng hệ thống TL-PSBR phương thẳng đứng cho thấy hạn chế trong việc cung cấp ánh sáng. Ngoài yếu tố về ánh sáng, các yếu tố liên quan tới thiết kế một TL-PSBR mới gồm: nhiệt độ, độ ẩm, pH, bổ sung nguồn carbon,... cũng cần được nghiên cứu, khảo sát.

Kĩ thuật nuôi vi tảo bất động trong MSH trên hệ thống TL-PSBR đã và đang được chuyển giao ở Việt Nam. Ban đầu, việc áp dụng công nghệ nuôi vi tảo cố định trên TL-PSBR phương thẳng đứng ở Việt Nam gặp một số trở ngại như chi phí đầu tư cao và không có sẵn hầu hết vật liệu tương ứng ở Việt Nam. Do đó, phương án thiết lập, phát triển hệ thống TL-PSBR mới theo phương nghiêng đã được đề xuất. Khi vận hành hệ thống TL-PSBR theo phương nghiêng để nuôi tảo sẽ giúp tận dụng tối đa ánh sáng cường độ cao, khắc phục được hiện tượng che sáng giữa các module ở hệ thống phương thẳng đứng. Tuy nhiên, việc chuyển đổi từ phương thẳng đứng sang phương nghiêng cùng với sự thay đổi

vật liệu sẵn có ở Việt Nam sẽ làm thay đổi nhiều thông số trong quá trình vận hành. Vì vậy, ưu tiên hàng đầu của quá trình chuyển giao công nghệ nuôi tảo bất động là thiết kế, chế tạo và vận hành thử nghiệm hệ thống TL-PSBR phương nghiêng.

Từ các phân tích trên, đề tài “Nghiên cứu thiết lập hệ thống quang sinh học phương nghiêng diện tích màng 2 m<sup>2</sup> và điều kiện nuôi cấy cố định vi tảo *Haematococcus pluvialis* để thu sinh khối giàu astaxanthin” được tiến hành. Câu hỏi nghiên cứu: (1). Công nghệ nuôi cấy vi tảo kiểu cố định trong TL-PSBR phương nghiêng có thể được áp dụng như thế nào để phù hợp với điều kiện thực tế ở Việt Nam? (2). Hệ thống TL-PSBR phương nghiêng có thể nuôi cấy thành công một chủng vi tảo *H. pluvialis* để thu sinh khối giàu astaxanthin ở quy mô pilot hay không?

## **2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án**

- Nghiên cứu để áp dụng công nghệ nuôi cấy vi tảo kiểu cố định trong hệ thống nuôi TL-PSBR phương nghiêng phù hợp với điều kiện thực tế ở Việt Nam.

- Vận hành hệ thống TL-PSBR phương nghiêng để nuôi cấy thành công một chủng vi tảo *H. pluvialis* thu sinh khối giàu astaxanthin ở quy mô pilot.

## **3. Các nội dung nghiên cứu của luận án**

- **Nội dung 1:** Thiết kế, chế tạo, vận hành thử nghiệm module TL-PSBR phương nghiêng quy mô phòng thí nghiệm với diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup>;

- **Nội dung 2:** Thử nghiệm áp dụng module TL-PSBR phương nghiêng với diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup> để nuôi tảo *H. pluvialis* pha xanh lục;

- **Nội dung 3:** Thử nghiệm áp dụng module TL-PSBR phương nghiêng diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup> để nuôi tảo *H. pluvialis* pha tích lũy astaxanthin;

- **Nội dung 4:** Thiết kế, chế tạo, vận hành thử nghiệm module TL-PSBR phương nghiêng quy mô pilot với diện tích MSH 2 m<sup>2</sup>;

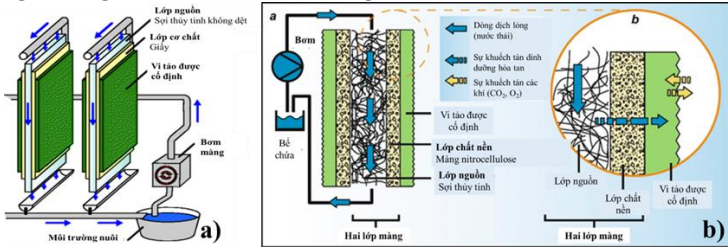
- **Nội dung 5:** Thử nghiệm áp dụng module TL-PSBR phương nghiêng quy mô pilot với diện tích MSH 2 m<sup>2</sup> để nuôi sinh khối tảo *H. pluvialis* giàu astaxanthin.

# CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

## 1.1. Các hệ thống nuôi vi tảo cố định trong MSH trên thế giới

Nuôi vi tảo kiểu cố định trong MSH là kiểu nuôi sử dụng sinh khối vi tảo cố định lên trên giá thể và tách phần lớn sinh khối tảo khỏi bề mặt môi trường nuôi cấy. So với các PBR nuôi kiểu huyền phù, các hệ thống PBR MSH có một số ưu điểm như mật độ sinh khối khô cao của MSH cho phép vận hành và thu hoạch hiệu quả hơn về mặt năng lượng. Nhìn chung, PBR MSH có thể được chia thành các dạng hệ thống có MSH ngập nước và hệ thống có MSH không ngập nước.

Hệ thống quang sinh học hai lớp màng chất nền xốp (twin-layer porous substrate photobioreactor, TL-PSBR) là kiểu có MSH không ngập nước, các chất dinh dưỡng vẫn có thể thấm qua lớp chất nền và cung cấp cho các tế bào tảo. Tuy nhiên, so với kiểu nuôi huyền phù, số lượng các nghiên cứu trên hệ thống TL-PSBR còn rất hạn chế.



**Hình 1.1. Mô hình module TL-PSBR phương thẳng đứng**

Các phân tích kích bản thiết kế cho hệ thống TL-PSBR đã cho thấy việc gia tăng khoảng cách giữa các module thẳng đứng hoặc module dạng phương nghiêng sẽ cho hiệu quả tương đương nhau, đặc biệt là đối với các loài vi tảo cần cường độ ánh sáng cao.

## 1.2. Cấu trúc của MSH vi tảo trong nuôi cấy kiểu cố định

Việc hiểu rõ cấu trúc cũng như phản ứng của MSH trước các yếu tố stress khác nhau sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho công đoạn tối ưu hóa về sau. Dưới cường độ ánh sáng thấp, các lớp tế bào *H. pluvialis* trong MSH hầu như có màu xanh với một lớp màu đỏ rất mỏng ở trên bề mặt, bề mặt hầu như trơn láng nhưng có một số phần lồi nhìn thấy được. Vì

vậy, với việc kiểm soát điều kiện môi trường và ánh sáng, tế bào *H. pluvialis* có thể được duy trì ở giai đoạn sinh dưỡng và tăng sinh khối. Khi nuôi kiểu quang tự dưỡng, ánh sáng, chất dinh dưỡng và carbon vô cơ hoà tan (dissolved inorganic carbon, DIC) là ba yếu tố chính ảnh hưởng đến năng suất trong các TL-PSBR. Trong các PBR MSH, sự hình thành các gradient bên trong MSH là không thể tránh khỏi. Do đó, việc kiểm soát độ dày của MSH trong TL-PSBR đảm bảo cho sự sinh trưởng thường xuyên của các tế bào bên dưới.

### **1.3. Các yếu tố chính trong thiết kế PBR**

*Ánh sáng:* Chất lượng quang phổ, sự thâm nhập và phân bố ánh sáng là những yếu tố chính khi đề cập đến ánh sáng trong thiết kế PBR. Mỗi loại ánh sáng với bước sóng khác nhau có thể ảnh hưởng đến sự sinh trưởng hoặc tích lũy các chất trong chu kì sống của vi tảo. Ánh sáng lam tím (380–480 nm) tăng lên làm kích thích sự tích lũy carotenoid ở các loài vi tảo làm tế bào chuyển sang màu vàng, cam hoặc đỏ, tùy vào loại carotenoid được tích lũy. Khả năng thâm nhập của bức xạ ánh sáng phụ thuộc vào bước sóng ánh sáng, nồng độ tế bào, hình dạng của PBR. Cường độ ánh sáng quá cao có thể gây ra sự ức chế quang, làm giảm tốc độ tăng trưởng nên cần tránh tối đa tình trạng ức chế ánh sáng.

*Sự khuấy trộn (mixing):* Thời gian trộn được định nghĩa là thời gian cần thiết để một lượng nhỏ dung dịch thuốc nhuộm được thêm vào chất lỏng để đi qua lò phản ứng. Sự khuấy trộn tốt đảm bảo cho tế bào ở trạng thái huyền phù, hạn chế lắng bám bề mặt nuôi cấy, phân phối chất dinh dưỡng đồng đều, cải thiện sự trao đổi khí, giảm mức độ che bóng lẫn nhau giữa các tế bào cũng như sự ức chế quang hợp.

*Nhiệt độ:* ảnh hưởng đến các phản ứng trong quang hợp cũng như trạng thái cân bằng hóa học của các chất, lượng khí hòa tan và pH môi trường. Đối với hầu hết vi tảo, nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng thường nằm trong khoảng 20 °C–24 °C. Một số vi tảo có thể chuyển trạng thái sinh lí của tế bào để chống chịu với điều kiện nhiệt độ bất lợi. Mỗi

phương pháp kiểm soát nhiệt độ đều có ưu nhược điểm riêng. Việc chọn phương pháp kiểm soát nhiệt độ dựa trên quy mô của hệ thống PBR.

*pH – sự bổ sung nguồn carbon vô cơ:* Hầu hết các loài vi tảo có thể được nuôi cấy trong phạm vi pH từ 7 đến 9. Hiện nay, hầu hết các PBR đều sử dụng hệ thống điều chỉnh pH thông qua việc bổ sung CO<sub>2</sub> trong quá trình nuôi bên cạnh các chất đóng vai trò hệ đệm. Ngược lại, pH môi trường chịu trách nhiệm chính cho khả năng hòa tan, tỉ lệ nồng độ của CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Khí CO<sub>2</sub> được bổ sung bằng cách sục khí có tỉ lệ CO<sub>2</sub> cao hoặc CO<sub>2</sub> tinh khiết. Việc bổ sung CO<sub>2</sub> vào PBR gồm có các phương thức: (1) Sục khí tạo bọt khí lớn (1–2 mm); (2) Công nghệ tạo vi bọt nhỏ (đường kính 10–50 μm); (3) Công tắc tơ màng.

Các biện pháp để tối ưu carbon trong PBR MSH gồm: (1) Điều chỉnh lượng cung cấp DIC cho phù hợp với điều kiện ánh sáng cụ thể; (2) Sử dụng hệ thống “máy chà” (algal turf scrubber) để làm tăng sự vận chuyển CO<sub>2</sub> từ pha khí sang dịch môi trường và từ môi trường đến MSH; (3) Sử dụng bicarbonate để tạo pH cao đối với các sinh vật quang dưỡng ưa kiềm có thể chịu được môi trường có tính kiềm cao; (4) Đối với PBR MSH bán ngập và PBR MSH chất nền xốp, việc bổ sung CO<sub>2</sub> đậm đặc và đặc tính dòng chảy của pha khí trên bề mặt màng sinh học là cần thiết để đạt năng suất cao và hiệu quả sử dụng CO<sub>2</sub>.

*Vốn và chi phí hoạt động:* Một hệ thống PBR hiệu quả cần thỏa mãn các yêu cầu sau: Tỉ lệ diện tích bề mặt được chiếu sáng/thể tích cao để tận dụng tối đa bức xạ chiếu sáng; Kiểm soát nhiệt độ dễ dàng, hiệu quả; Hiệu suất trộn và truyền khối tốt; Ứng suất cắt (shear stress) thấp; Chi phí vốn và chi phí vận hành thấp.

## **1.4. Vi tảo *H. pluvialis***

### **1.4.1. Phân loại và đặc điểm phân bố**

Vi tảo *H. pluvialis* Flotow là một loại tảo lục đơn bào nước ngọt. Loài này có đặc điểm phân loại như sau: Kingdom: Plantae; Subkingdom: Viridiplantae; Division: Chlorophyta; Class: Chlorophyceae; Order: Chlamydomonadales; Family:

Haematococcaceae; Genus: *Haematococcus*. Nhờ khả năng biến đổi nhanh chóng thành dạng bào tử nang (có các lớp bảo vệ dày bao bọc) cùng với khả năng tích lũy astaxanthin nên *H. pluvialis* có khả năng tồn tại ở các điều kiện sống khác nghiệt. Khi môi trường sống thuận lợi các bào tử nang này nảy mầm để tạo các thế hệ tế bào tiếp theo.

#### **1.4.2. Đặc điểm hình thái và sinh lý tế bào trong chu kì sống của vi tảo *H. pluvialis***

Trong chu kì sống, tảo *H. pluvialis* trải qua 4 loại hình thái tế bào khác nhau, có thể phân biệt khi quan sát dưới kính hiển vi: giai đoạn động bào tử lớn (macrozoid), giai đoạn palmella (coccoid), giai đoạn bào tử nang (aplanospore hoặc akinete) và giai đoạn giao tử nhỏ di động (microzoid). Các giai đoạn macrozoid, microzoid và palmella, tế bào thường có màu xanh lục nên thường được gọi là giai đoạn sinh dưỡng. Trong một số điều kiện, dạng macrozoid cũng có thể tích lũy nhiều astaxanthin và có màu đỏ. Giai đoạn nang bào tử là giai đoạn mà tế bào tảo không di động, đã tích lũy rất nhiều astaxanthin màu đỏ.

Tỉ lệ về hàm lượng carotenoid/chlorophyll là một thông số quan trọng cho phép phân biệt các dạng tế bào. Khi tỉ lệ carotenoid/chlorophyll vào khoảng 0,5, 1,0 và 7,0 thì tương ứng là các tế bào sinh dưỡng (màu lục), tế bào dạng bào nang còn non (lục-cam) và bào nang hoàn chỉnh (tế bào chín, màu đỏ). Những hiểu biết về chu kì sống cũng như các yếu tố giúp kiểm soát từng giai đoạn sống của *H. pluvialis* có ý nghĩa quan trọng ứng dụng nuôi cấy loài vi tảo này ở các quy mô từ phòng thí nghiệm đến quy mô công nghiệp, đặc biệt là trong sản xuất astaxanthin.

#### **1.4.3. Các yếu tố ảnh hưởng sự tăng sinh khối của *H. pluvialis* ở giai đoạn sinh dưỡng (màu lục)**

Tốc độ tăng trưởng của *H. pluvialis* trong giai đoạn sinh dưỡng phụ thuộc vào nhiều yếu tố môi trường. Vi tảo tăng trưởng tốt ở 15-27 °C. Tế bào đạt mật độ cao khi pH = 6,5 - 8. Nguồn carbon là yếu tố thiết yếu ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của vi tảo. Vi tảo có thể sử dụng các



nguồn carbon khác nhau như CO<sub>2</sub> từ khí quyển, các dạng carbonate, bicarbonate hòa tan. Natri nitrate là nguồn nitrogen tối ưu nhất. Cường độ ánh sáng thấp, dưới 100  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , thường được sử dụng để duy trì và tăng mật độ vi tảo trong thể huyền phù ở pha xanh lục. Tuy nhiên, ảnh hưởng của cường độ ánh sáng thấp cũng như quang phổ đến sự sinh trưởng và phân chia tế bào của *H. pluvialis* trong MSH khi nuôi trong TL-PSBR chưa được nghiên cứu chi tiết.

#### ***1.4.4. Astaxanthin và cơ chế tổng hợp astaxanthin của vi tảo H. pluvialis***

Astaxanthin là chất có khả năng chống oxy hóa mạnh có lợi cho hệ miễn dịch, hệ cơ tim, điều trị ung thư và trong điều trị lão hóa da. Trong chăn nuôi, astaxanthin có nguồn gốc nhân tạo, tổng hợp bằng con đường hoá học thường được dùng bổ sung để tạo màu cho cá hoặc trứng. Astaxanthin từ tảo *H. pluvialis* chứa 5% dạng tự do, còn lại ở dạng mono và diester. Đáng chú ý, astaxanthin từ vi tảo này đều ở dạng đồng phân 3S-3'S, là dạng đồng phân có hoạt sinh cao nhất.

Trong các điều kiện stress, tế bào vi tảo *H. pluvialis* tăng cường sinh tổng hợp astaxanthin cùng với tích tụ các triacylglycerol. Các chất này được tích lũy trong các thể lipid khi tế bào chuyển sang pha đỏ. Nhờ tính định hướng quá trình tổng hợp bởi các enzyme của vi tảo *H. pluvialis* nên sản phẩm astaxanthin được sinh tổng hợp ra chỉ có dạng đồng phân lập thể (3S, 3'S), là dạng có hoạt tính sinh học cao nhất và có giá trị cao hơn so với các loại astaxanthin tổng hợp hoặc có nguồn gốc từ các sinh vật khác.

#### ***1.4.5. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của H. pluvialis***

*Ảnh hưởng của cường độ và quang phổ ánh sáng:* Hiện tượng ức chế tăng sinh giai đoạn sinh dưỡng diễn ra khi cường độ ánh sáng cao hơn 150–170  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , nhưng cường độ ánh sáng tối ưu cho sự kích thích tích lũy astaxanthin lại rất cao, khoảng 1500 đến 2000  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Chất lượng ánh sáng cũng đã được chứng minh là

ảnh hưởng đến năng suất sinh khối và tích lũy astaxanthin. Trong đó, ánh sáng đỏ từ LED (light emitting diode) làm tăng sự tăng sinh của tế bào *H. pluvialis*, trong khi ánh sáng xanh lam tăng lại cường độ tổng hợp astaxanthin. Sự kết hợp các loại ánh sáng LED cho thấy hiệu quả tăng sinh khối và tích lũy astaxanthin. Ngoài cường độ ánh sáng, sự kết hợp giữa thiếu P và chiếu sáng liên tục đã kích thích sự tích lũy astaxanthin đạt đến 7% khối lượng khô. Việc chiếu sáng liên tục có thể được thực hiện với việc sử dụng các loại ánh sáng LED có hiệu quả chuyển đổi điện năng thành quang năng cao hơn.

*Ảnh hưởng của nguồn carbon:* Nguồn carbon là một yếu tố thiết yếu ảnh hưởng mạnh đến sự tăng trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis*. Trong cả hệ thống nuôi dạng huyền phù hay cố định, CO<sub>2</sub> với nồng độ cao thường được sử dụng như nguồn carbon cho tảo. Nguồn carbon vô cơ bicarbonate có ưu thế là khả năng hoà tan cao trong dịch môi trường nhờ tồn tại dưới dạng ion. Tảo *H. pluvialis* có khả năng sử dụng nguồn carbon này nhờ hoạt tính enzyme carbonic anhydrase giúp chuyển đổi HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> thành CO<sub>2</sub>. Số lượng các đề tài nghiên cứu trên sử dụng mô hình nuôi cấy tảo kiểu cố định còn ít, đặc biệt là trên mô hình nuôi cấy TL-PSBR.

*Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường khác:* Thành phần môi trường để kích thích sinh trưởng của vi tảo khác với thành phần lí tưởng cần thiết cho sự tích lũy nhiều astaxanthin. Môi trường nuôi cấy bị thiếu hụt chất dinh dưỡng, đặc biệt là N và P, sẽ dẫn đến sự tích tụ của astaxanthin trong tế bào. Các chất dinh dưỡng vi lượng như selen và crom dẫn đến tăng sinh khối và sản xuất astaxanthin. Yếu tố pH cũng có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng sinh tế bào và quá trình tổng hợp diệp lục, carotenoid ở *H. pluvialis*. Trong đa số các nghiên cứu, pH tối ưu nằm trong khoảng 7,0–7,8.

### **1.5. Tình hình nghiên cứu nuôi vi tảo *H. pluvialis***

Vi tảo *H. pluvialis* cũng như các loài tảo khác có thể được nuôi cấy kiểu quang tự dưỡng trong ao, ruộng hở hoặc các PBR kín. Vì các

điều kiện nuôi cấy huyền phù để tăng sinh tối đa và tích lũy astaxanthin tối đa là rất khác nhau, nên trong nghiên cứu cũng như sản xuất thương mại, chiến lược nuôi cấy hai pha thường được áp dụng. Khi nuôi huyền phù, astaxanthin cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng chiến lược nuôi tảo *H. pluvialis* một pha. Việc nuôi huyền phù một pha có vẻ ít phức tạp hơn so với hai pha, tuy nhiên, nhược điểm của phương thức nuôi này là tổng lượng astaxanthin thu được thấp hơn đáng kể và không phù hợp với môi trường nuôi ngoài trời do cường độ ánh sáng rất cao và biến đổi liên tục.

Phương pháp nuôi cấy tảo kiểu cố định đã được áp dụng thành công trong tăng sinh và cảm ứng *H. pluvialis* để sản xuất astaxanthin. Các nghiên cứu đó đã khảo sát ảnh hưởng của các tham số như mật độ mẫu cấy, nhiệt độ, cường độ sáng và nồng độ dinh dưỡng đối với quy trình nuôi cố định vi tảo *H. pluvialis*.

Ở Việt Nam, hướng nghiên cứu vi tảo *H. pluvialis* cũng như sản xuất astaxanthin chỉ mới bắt đầu trong khoảng 10 năm trở lại đây. Nhìn chung, các nghiên cứu ban đầu đều sử dụng các hệ thống nuôi kín kiểu huyền phù để tăng sinh khối tế bào cũng như kích thích tích lũy astaxanthin. Việc chuyển giao công nghệ nuôi vi tảo *H. pluvialis* kiểu cố định đã được thực hiện trong những năm gần đây. Tuy nhiên, việc áp dụng hệ thống TL-PSBR cần phải phù hợp với điều kiện thực tế ở Việt Nam cũng như chi phí đầu tư, vận hành phải hợp lí.

## **CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP**

### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

- Đối tượng nghiên cứu: Hệ thống nuôi vi tảo kiểu cố định, hệ thống quang sinh học màng đôi chất nền xốp (twin-layer porous substrate photobioreactor, TL-PSBR) và chủng vi tảo *Haematococcus pluvialis* CCAC 0125 được cung cấp bởi Culture Collection of Algae at the University of Cologne, Đức.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp thiết kế, chế tạo và vận hành thử nghiệm module TL-PSBR phương nghiên trải qua hai bước: thử nghiệm trên hệ thống quy mô phòng thí nghiệm (diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup>) và quy mô pilot (diện tích MSH 2 m<sup>2</sup>). Việc vận hành hệ thống TL-PSBR phương nghiên để điều chỉnh các yếu tố trong hệ thống gồm: ánh sáng, tốc độ trộn và cung cấp dinh dưỡng, nguồn carbon, nhiệt độ, pH, vốn và chi phí hoạt động.

- Bố trí thí nghiệm nuôi tảo *H. pluvialis* pha xanh lục trong TL-PSBR phương nghiên diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup>. Các thí nghiệm được thực hiện trong nội dung 3 này nhằm tối ưu các yếu tố: Nguồn sáng; Cường độ ánh sáng; Mật độ giống ban đầu.

- Bố trí thí nghiệm nuôi tảo *H. pluvialis* pha tích lũy astaxanthin trong TL-PSBR phương nghiên quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot: mật độ sinh khối ban đầu; Ảnh hưởng của thời gian lưu trữ tảo sau khi li tâm từ nuôi cấy huyền phù; Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng. Ở quy mô thí điểm trong TL-PSBR phương nghiên diện tích màng 2 m<sup>2</sup>, các thí nghiệm gồm: Ảnh hưởng của ánh sáng LED đơn sắc, Ảnh hưởng của chu kì sáng/tối của đèn LED lam-đỏ; Ảnh hưởng của sự bổ sung nguồn carbon.

- Phương pháp bảo quản giống vi tảo và nuôi tăng sinh trong phòng thí nghiệm. Phương pháp cố định và nuôi vi tảo trong hệ thống TL-BSPR phương nghiên gồm các bước: chuẩn bị hệ thống; chuẩn bị dịch tảo cô đặc để cố định thành MSH, cố định tảo thành MSH bằng cọ mềm, thời gian nuôi 10 ngày, môi trường BG11-H.

- Các phương pháp phân tích: Phương pháp xác định SKK vi tảo trong MSH; Phương pháp xác định tỉ lệ carotenoid/chlorophyll trong sinh khối tảo pha sinh dưỡng (xanh lục); Phương pháp xác định tỉ lệ astaxanthin trong sinh khối khô vi tảo; Phương pháp quan sát hình thái vi tảo trong MSH bằng kính hiển vi quang học

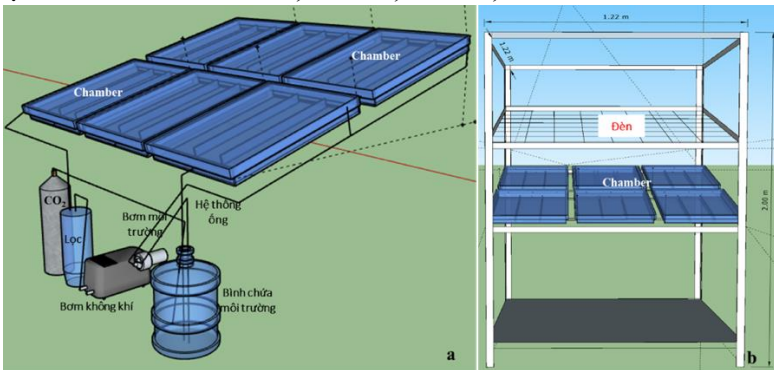
- Các số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 365, các phân tích thống kê, biểu đồ được thực hiện bằng phần mềm thống kê chuyên dụng R (version 3.5.2) và SPSS (version 20). Kiểm định Tukey's HSD (honestly significant difference) được sử dụng để phân tích sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong các thí nghiệm.

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

### 3.1. Thiết kế, chế tạo, vận hành thử nghiệm module TL-PSBR phương nghiêng quy mô phòng thí nghiệm diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup>

#### 3.1.1. Thiết kế, chế tạo

Hệ thống gồm các thành phần: buồng nuôi (chamber), hệ thống cung cấp, dẫn truyền và bơm hồi lưu dịch dinh dưỡng, hệ thống bơm và dẫn không khí (có bổ sung CO<sub>2</sub> hoặc không), hệ thống khung thép và hệ thống đèn chiếu sáng (**Hình 3.1**). **Buồng nuôi (chamber)**: Mỗi buồng nuôi được chia làm 3 ngăn, mỗi ngăn rộng 12 cm để có thể chứa được MSH có kích thước 0,5 m × 0,1 m = 0,05 m<sup>2</sup>.



**Hình 3.1. Sơ đồ hệ thống TL-PSBR phương nghiêng 0,05 m<sup>2</sup>**

**Hệ thống cung cấp dinh dưỡng**: Dịch dinh dưỡng được chứa trong bình 20 L; Máy bơm tăng áp lưu lượng 1,2 L.min<sup>-1</sup>; Ống nhựa dẻo (đường kính ngoài: 8 mm, dày: 2 mm) và các đầu nối; Ống nhỏ giọt điều áp (Capinet dripper, tốc độ nhỏ giọt 5 mL.min<sup>-1</sup>). **Hệ thống thông khí**: gồm một máy bơm không khí (160W, 115 L.min<sup>-1</sup>) và bộ lọc

không khí. Khí CO<sub>2</sub> có thể được bổ sung vào hệ thống nhờ ống dẫn vào trong bộ lọc không khí; **Hệ thống khung thép:** được thiết kế đảm bảo không tạo ra các vùng che tối có thể ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo; **Các hệ thống đèn chiếu sáng.** Các hệ thống máy móc và thiết bị đều được kiểm tra và duy trì định kì sau mỗi đợt nuôi vi tảo thí nghiệm để đảm bảo hoạt động ổn định.

### **3.1.2. Vận hành thử nghiệm**

*3.1.2.1. Góc nghiêng phù hợp của các buồng nuôi:* Thử nghiệm hệ thống TL-PSBR phương nghiêng với các góc nghiêng khác nhau của chamber, kết quả cho thấy góc nghiêng chamber 15° là phù hợp cho dòng chảy, thoát nước cũng như phân bố dung dịch đồng đều cho các lớp màng.

*3.1.2.2. Ánh sáng:* Kết quả đo và điều chỉnh cường độ sáng khi vận hành thử nghiệm các hệ thống chiếu sáng khác nhau cho thấy mỗi hệ thống chiếu sáng này có khả năng cung cấp cường độ ánh sáng, quang phổ ánh sáng khác nhau.

*3.1.2.3. Nhiệt độ:* Ở quy mô phòng thí nghiệm, nhiệt độ bên trong hệ thống TL-PSBR phương nghiêng quy mô nhỏ được kiểm soát chủ yếu bởi hệ thống điều hoà nhiệt độ để dịch môi trường nuôi khoảng 22-24 °C, nhiệt độ không khí trong các chamber biến động nhiều tùy theo hệ thống chiếu sáng được sử dụng, đảm bảo nhiệt độ nằm trong khoảng giới hạn để tiến hành thử nghiệm nuôi cấy hầu hết các loài vi tảo.

*3.1.2.4. Phương thức bổ sung CO<sub>2</sub> và kiểm soát pH:* Đối với thiết lập, vận hành ban đầu hệ thống TL-PSBR phương nghiêng 0,05 m<sup>2</sup>, phương thức bổ sung CO<sub>2</sub> bằng cách sủi bọt khí chứa 1% CO<sub>2</sub> vào môi trường BG11-H làm cho pH môi trường luôn duy trì ở mức ổn định từ 6,5 – 7,5. Tuy nhiên, hệ thống cung cấp này sau đó được tiếp tục cải tiến và một số nghiên cứu được thực hiện để tiếp tục hoàn thiện trong các module TL-PSBR phương nghiêng 2 m<sup>2</sup>.

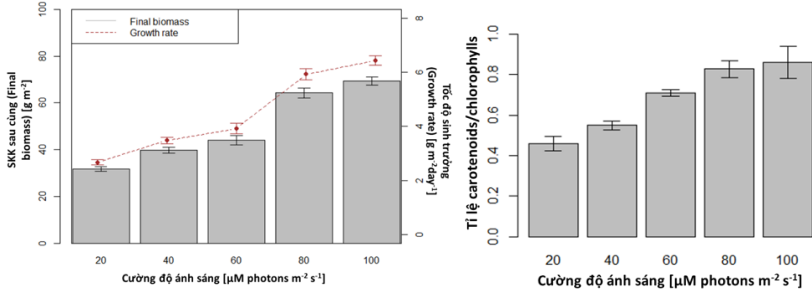
*3.1.2.5. Kết quả vận hành thử nghiệm để chọn lựa vật liệu twin-layer phù hợp:* Vật liệu cho các lớp trong TL-PSBR gồm: lớp nguồn là

tầm sợi thủy tinh không dệt, được cắt với kích thước 0,5×0,1 m; Lớp chất nền được chọn là giấy kraft 70 gsm do các ưu điểm của loại giấy này và giá thành rẻ.

### 3.2. Thử nghiệm áp dụng module TL-PSBR phương nghiêng với diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup> để nuôi tảo *H. pluvialis* pha xanh lục

#### 3.2.1. Thí nghiệm xác định nguồn sáng để tăng sinh khối tảo pha xanh lục

Với cùng cường độ ánh sáng 40 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, sự tăng sinh khối của vi tảo sau 10 ngày nuôi khi được chiếu sáng bằng LED đỏ cho kết quả cao hơn đáng kể so với đèn huỳnh quang (p<0,05, n=6). Tuy nhiên, ánh sáng LED đỏ gây ra sự kích thích làm cho các tế bào tích lũy astaxanthin và chuyển sang pha đỏ, trong khi đó các tế bào vẫn ở dạng palmella xanh khi dùng ánh sáng huỳnh quang trắng. Với mục tiêu nuôi tảo giai đoạn pha xanh, ánh sáng trắng từ đèn huỳnh quang là phù hợp hơn.



**Hình 3.2.** SKK và tỉ lệ carotenoid/chlorophyll của *H. pluvialis* ở các cường độ ánh sáng khác nhau (20-100 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

#### 3.2.2. Thí nghiệm xác định cường độ ánh sáng phù hợp để tăng sinh khối tảo pha xanh lục

Cường độ ánh sáng khoảng 80 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> từ đèn huỳnh quang trắng là phù hợp nhất cho sự tăng sinh của *H. pluvialis* (Hình 3.2) và vẫn duy trì các tế bào ở giai đoạn sinh dưỡng pha xanh trong MSH.

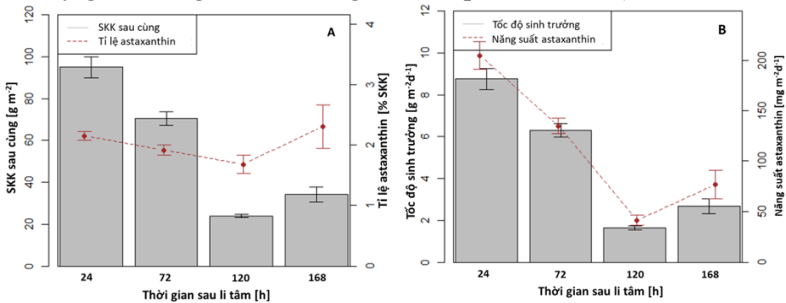
#### 3.2.3. Thí nghiệm xác định mật độ giống vi tảo ban đầu phù hợp để tăng sinh khối tảo pha xanh lục

Sinh khối khô sau cùng cao nhất là 71,4 và 71,9 g.m<sup>-2</sup> khi mật độ sinh khối ban đầu lần lượt là 6,5 và 8,0 g.m<sup>-2</sup>, và sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ,  $n = 6$ ). Với cùng cường độ ánh sáng thấp (80  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), tỉ lệ carotenoid/chlorophyll trong vi tảo đều nhỏ hơn 1, chỉ ra rằng các tế bào đều ở dạng palmella xanh lục.

### 3.3. Thử nghiệm áp dụng module TL-PSBR phương nghiêng diện tích MSH 0,05 m<sup>2</sup> để nuôi tảo *H. pluvialis* pha tích lũy astaxanthin

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian lưu trữ tảo sau khi li tâm

Năng suất sinh khối ở thời gian bảo quản 24, 72 và 120 giờ khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) trong khi năng suất sinh khối ở thời gian bảo quản 120 và 168 giờ thì không ( $p > 0,05$ ). Thời gian bảo quản tảo 24 giờ cho năng suất astaxanthin cao nhất (205 mg. m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>), năng suất này giảm đáng kể khi thời gian bảo quản lâu hơn (Hình 3.3).



**Hình 3.3. Sinh khối và astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* ở các thời gian bảo quản sinh khối ban đầu khác nhau sau khi li tâm** (Chú thích: SKK sau cùng và hàm lượng astaxanthin (A); Tốc độ tăng trưởng trung bình và năng suất astaxanthin (B))

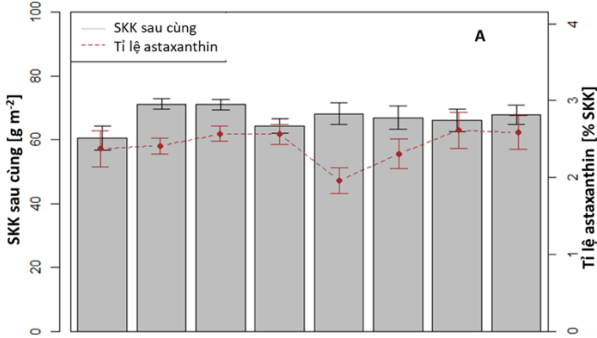
#### 3.3.2. Thí nghiệm xác định mật độ giống vi tảo ban đầu

Ở mật độ sinh khối ban đầu là 2,5, 5 và 7,5 g.m<sup>-2</sup>, năng suất sinh khối lần lượt là 5,6, 6 và 6,2 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. Năng suất sinh khối khô trung bình cao nhất đạt 7,23 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> ở mật độ sinh khối ban đầu là 10 g.m<sup>-2</sup> và khác biệt đáng kể so với ba giá trị còn lại ( $p < 0,05$ ). Tỉ lệ astaxanthin trong SKK đạt giá trị cao nhất là 2,17 % ở mật độ sinh khối ban đầu lần lượt là 5 và 7,5 g.m<sup>-2</sup>.



### 3.3.3. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến sinh trưởng sinh khối và tích lũy astaxanthin

Cường độ ánh sáng  $400 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  cho năng suất SKK trung bình cao nhất ( $6,6 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ ) và  $300 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  cho năng suất thấp nhất ( $5,56 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ ). Tuy nhiên, giá trị năng suất trong toàn dải  $300 - 1000 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

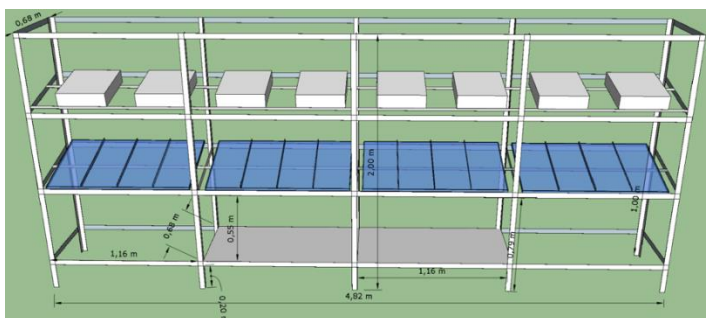


**Hình 3.4. SKK và astaxanthin ở *H. pluvialis* ở các cường độ ánh sáng khác nhau**

Cường độ  $500$  và  $600 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  cho hàm lượng astaxanthin cao nhất ( $2,56 \%$ ) và  $700 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  cho hàm lượng astaxanthin thấp nhất ( $1,96 \%$ ), (Hình 3.4). Ở các cường độ  $300, 400$  và  $500 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , năng suất tương ứng là  $9,2, 8,5, 7,2 \text{ mg.m}^{-2}.\text{mole photons}^{-1}$  ( $p > 0,05$ ).

## 3.4. Thiết kế, chế tạo, vận hành thử nghiệm module TL-PSBR phương nghiêng với diện tích MSH $2 \text{ m}^2$

### 3.4.1. Thiết kế, chế tạo module TL-PSBR phương nghiêng diện tích MSH $2 \text{ m}^2$



**Hình 3.5. Sơ đồ các thành phần của TL-PSBR phương nghiêng 15° diện tích MSH 2 m<sup>2</sup>**

Module TL-PSBR phương nghiêng diện tích MSH 2 m<sup>2</sup> gồm các thành phần tương tự như hệ thống nhỏ. Mỗi module gồm: 4 chamber lớn, tổng diện tích nuôi MSH vi tảo là 0,5 m<sup>2</sup> × 4 = 2 m<sup>2</sup>. Hệ thống cung cấp dinh dưỡng cho mỗi module: về cơ bản tương tự như ở hệ thống nhỏ; Hệ thống bổ sung CO<sub>2</sub>: Khí CO<sub>2</sub> được bổ sung vào hệ thống nhờ máy bơm khí, ống dẫn (đường kính ngoài: 5 mm, dày: 1 mm), van điều áp, sủi CO<sub>2</sub> vào dịch môi trường nuôi và không khí trong từng chamber của module; Hệ thống khung thép (Hình 3.5).

### **3.4.2. Vận hành thử nghiệm**

Các yếu tố quan trọng đã được vận hành thử nghiệm lại trên hệ thống 2 m<sup>2</sup> bao gồm: ánh sáng, nhiệt độ - độ ẩm, pH - bổ sung CO<sub>2</sub>.

*Ánh sáng, nhiệt độ và độ ẩm:* Các biện pháp được sử dụng, vận hành thử nghiệm để điều chỉnh, giữ nhiệt độ phù hợp trong các chamber lớn gồm: a. Nuôi hở (không nắp đậy); b. Chiều cao chamber và nắp chamber; c. Hệ thống chiller làm mát; d. Quạt thông khí gắn trên nắp để hút hơi ẩm.

*pH – sự bổ sung CO<sub>2</sub>:* Phương thức bổ sung CO<sub>2</sub> bằng cách sủi không khí có 1% CO<sub>2</sub> vào dịch môi trường BG11-H kết hợp với bơm không khí sạch vào pha khí lên bề mặt MSH chỉ có tác dụng chủ yếu duy trì pH dịch môi trường nuôi ổn định cho sự sinh trưởng của vi tảo. Tuy nhiên, hệ thống thiết bị dùng cho quá trình bổ sung CO<sub>2</sub> trong giai

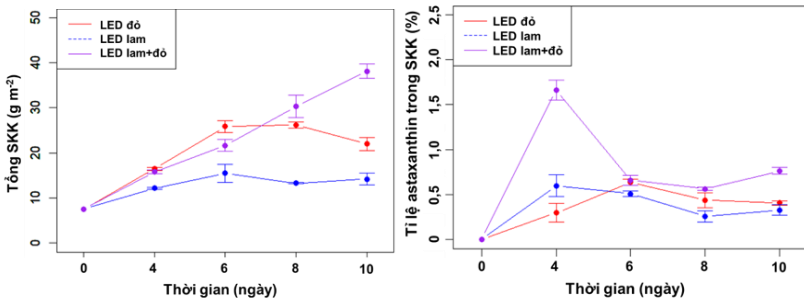
đoạn đầu chưa được hoàn thiện và chi phí vận hành còn cao, do vậy, hệ thống này sau đó được tiếp tục thay đổi, hoàn thiện để tăng hiệu quả sử dụng CO<sub>2</sub> để có thể áp dụng ở quy mô pilot.

### 3.5. Thử nghiệm áp dụng module TL-PSBR phương nghiêng quy mô pilot với diện tích MSH 2 m<sup>2</sup> để nuôi sinh khối tảo *H. pluvialis* giàu astaxanthin

#### 3.5.1. Thí nghiệm xác định nguồn sáng LED đơn sắc phù hợp cho sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*

Kết quả theo dõi các yếu tố môi trường trong hệ thống nuôi khi vận hành: kết quả theo dõi cho thấy pH duy trì ở mức 6,6-7,57 trong suốt thời gian nuôi, đảm bảo trong khoảng tối ưu cho sự phát triển của *H. pluvialis*. Nhiệt độ của môi trường BG-11H được duy trì ở mức 21-24°C trong suốt quá trình thí nghiệm.

Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc đến sự tăng sinh của *H. pluvialis*: SKK của vi tảo ở cả 3 nghiệm thức loại đèn LED đơn sắc (đỏ, lam hoặc kết hợp giữa lam và đỏ) đều tăng trong 6 ngày đầu tiên (**Hình 3.6**). Tuy nhiên, SKK của vi tảo được chiếu sáng bằng sự kết hợp của đèn LED xanh lam và đỏ, tăng liên tục trong thời gian nuôi cấy 10 ngày và tăng trưởng tuyến tính với tốc độ 3,06 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>.



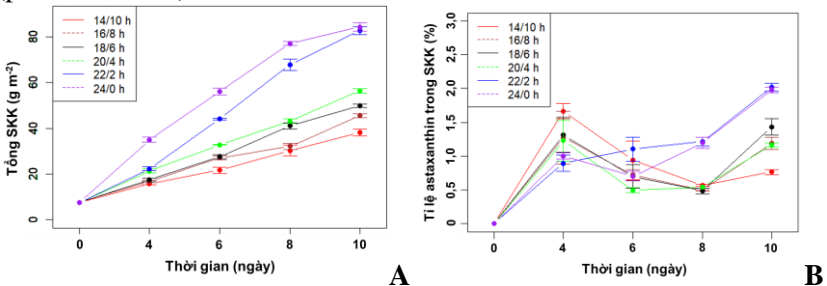
**Hình 3.6. Tổng SKK và tỉ lệ astaxanthin của *H. pluvialis* theo thời gian khi chiếu sáng bằng các loại ánh sáng đơn sắc khác nhau**

Ảnh hưởng của ánh sáng đơn sắc đến sự tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*: Sau 10 ngày, tỉ lệ phần trăm astaxanthin trong SKK là cao

nhất trong nghiệm thức kết hợp đèn LED xanh lam và đỏ (trung bình 0,76%), cao hơn đáng kể so với chỉ sử dụng đèn LED đỏ hoặc xanh lam ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ).

### 3.5.2. Thí nghiệm xác định chu kỳ sáng/tối phù hợp cho sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis*

*Ảnh hưởng của chu kỳ sáng/tối đến sự tăng sinh của H. pluvialis*: Nhìn chung, thời gian chiếu sáng trong mỗi chu kỳ chiếu sáng càng dài thì SKK vi tảo thu được càng cao (Hình 3.7A). Trong giai đoạn tuyến tính, tốc độ tăng trưởng trung bình của vi tảo cao nhất khi được chiếu sáng trong 22 giờ và 24 giờ, đạt xấp xỉ 11,4 và tương ứng là 10,5 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ,  $n = 3$ ).



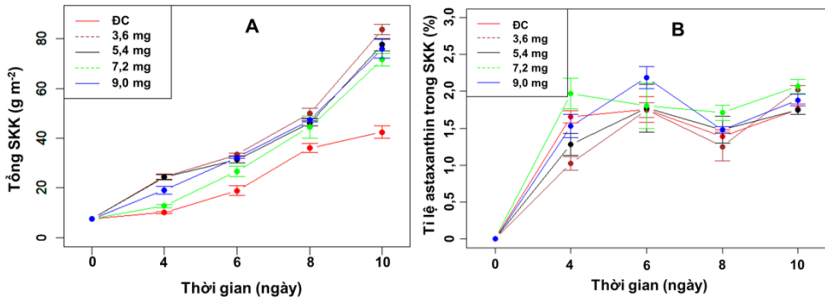
**Hình 3.7. Tổng SKK (A) và tỉ lệ astaxanthin (B) của *H. pluvialis* trong TL-PSBR phương nghiêng ở các chu kỳ sáng/tối khác nhau**

*Ảnh hưởng của chu kỳ sáng/tối đối với tích lũy astaxanthin*: Đối với hai chu kỳ sáng/tối có thời gian chiếu sáng 22 và 24 giờ/ngày, tổng astaxanthin tăng nhanh từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 10 và đạt cao nhất vào ngày thứ 10, với 1670 mg.m<sup>-2</sup> ( $p > 0,05$ ,  $n = 3$ ) (Hình 3.7B).

### 3.5.3. Ảnh hưởng của sự bổ sung nguồn carbon đến sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* trong TL-PSBR phương nghiêng quy mô pilot

3.5.3.1. *Ảnh hưởng của lượng CO<sub>2</sub> được bổ sung trong dịch môi trường*  
*a. Ảnh hưởng của việc bổ sung CO<sub>2</sub> đến sự tăng SKK của vi tảo*: sự gia tăng sinh khối tảo không tuyến tính với sự gia tăng CO<sub>2</sub> bổ sung vào hệ thống. Sinh khối tảo trong MSH sau mười ngày đạt 83,9, 77,7, 71,7 và

76,0 g.m<sup>-2</sup> với lưu lượng CO<sub>2</sub> bổ sung tương ứng là 3,6, 5,4, 7,2 và 9,0 mg.min<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ,  $n=3$ ). Việc bổ sung một lượng cao hơn 3,6 mg.min<sup>-1</sup> không làm tăng thêm sinh khối tảo (**Hình 3.8A**).



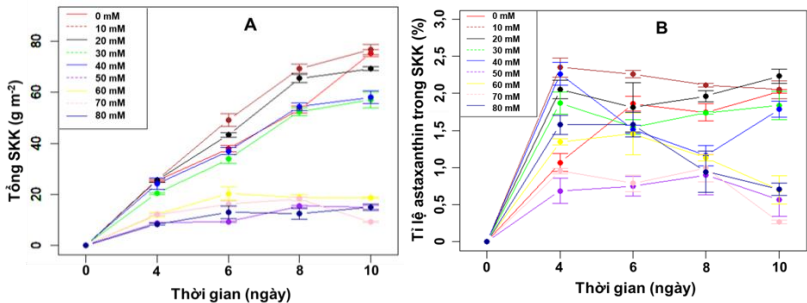
**Hình 3.8. Sự thay đổi tổng SKK (A) và astaxanthin trong sinh khối khô (B) của *H. pluvialis* ở các mức bổ sung CO<sub>2</sub> khác nhau**

*b. Ảnh hưởng của việc bổ sung CO<sub>2</sub> đến sự tích lũy astaxanthin của *H. pluvialis* trong MSH:* việc bổ sung CO<sub>2</sub> không ảnh hưởng trực tiếp đến tỉ lệ phần trăm astaxanthin trong SKK nhưng làm tăng tổng lượng astaxanthin thu được (**Hình 3.8B**).

### 3.5.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaHCO<sub>3</sub> được hòa tan trong môi

Trong thí nghiệm này, hệ thống được bố trí bổ sung NaHCO<sub>3</sub> vào môi trường với nồng độ từ 0 đến 80 mM kết hợp với sục khí CO<sub>2</sub> với lưu lượng 3,6 mg.min<sup>-1</sup>. Do tính kiềm của muối NaHCO<sub>3</sub>, lượng CO<sub>2</sub> bổ sung vào là không đủ để giữ pH < 8 ở tất cả các nghiệm thức.

*a. Ảnh hưởng của việc bổ sung NaHCO<sub>3</sub> đến sự tăng SKK vi tảo:* Khi nồng độ NaHCO<sub>3</sub> vượt quá 40 mM, sự tăng sinh của vi tảo hầu như không đáng kể. Bổ sung NaHCO<sub>3</sub> trong 10 ngày nuôi cấy không hiệu quả trong việc tăng sinh khối so với việc chỉ bổ sung CO<sub>2</sub>. Ngoài ra, tảo tăng sinh thuận lợi ở nồng độ khảo sát, khi nồng độ NaHCO<sub>3</sub> nhỏ hơn hoặc bằng 20 mM trong môi trường BG11-H (**Hình 3.9A**).



**Hình 3.9.** Sự thay đổi tổng SKK (A) và tỉ lệ astaxanthin (B) của *H. pluvialis* ở các nghiệm thức bổ sung  $\text{NaHCO}_3$  khác nhau

b. Ảnh hưởng của việc bổ sung  $\text{NaHCO}_3$  đến sự tích lũy astaxanthin: với kiểu nuôi cố định trong TL-PSBR, nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  cao trên 40 mM là yếu tố giới hạn đến sinh trưởng của vi tảo. Việc bổ sung  $\text{NaHCO}_3$  suốt 10 ngày nuôi không mang lại hiệu quả rõ rệt về tổng lượng astaxanthin thu được (**Hình 3.9B**).

### 3.6. Thảo luận

#### 3.6.1. Hệ thống TL-PSBR phương nghiêng 15° so với TL-PSBR phương thẳng đứng

Về cơ bản, hệ thống TL-PSBR phương nghiêng 15° có các thành phần tương tự hệ thống phương thẳng đứng. Tuy nhiên, một số thành phần được bổ sung, thay đổi khi chuyển đổi từ phương thẳng đứng sang phương nghiêng gồm: các buồng nuôi thay cho các khung đỡ các lớp màng, các quạt tản nhiệt, thông khí, vị trí lắp đặt hệ thống chiếu sáng... Buồng nuôi là thành phần khác biệt quan trọng của TL-PSBR phương nghiêng so với TL-PSBR phương thẳng đứng. Một trong những ưu điểm nổi bật của TL-PSBR phương nghiêng là việc chiếu sáng cường độ cao, đồng đều lên bề mặt MSH vi tảo thực hiện dễ dàng.

Quá trình nuôi vi tảo trong TL-PSBR phương nghiêng cũng có một số ưu điểm về mặt thao tác, quy trình vận hành. Ở giai đoạn khởi đầu quá trình nuôi, việc cố định vi tảo lên bề mặt cơ chất (lớp giấy) đã được cố định theo phương nghiêng các TL-PSBR thuận tiện, dễ thực hiện hơn.

Việc chuyển đổi từ phương thẳng đứng sang phương nghiêng cùng với sự thay đổi vật liệu sẵn có ở Việt Nam sẽ làm thay đổi nhiều thông số trong quá trình vận hành: ánh sáng, nhiệt độ, tốc độ bơm môi trường, tốc độ dòng môi trường, bổ sung nguồn carbon ( $\text{CO}_2$ , bổ sung  $\text{NaHCO}_3$ ), pH, mật độ vi tảo ban đầu. Trong giới hạn của luận án này, các yếu tố đã được nghiên cứu bước đầu để chọn các thông số vận hành phù hợp cho nuôi tảo *H. pluvialis* trong hệ thống TL-PSBR phương nghiêng.

### **3.6.2. Sinh khối tảo đầu vào cho hệ thống TL-PSBR**

**3.6.2.1. Mật độ sinh khối tảo ban đầu:** Kết quả nghiên cứu trên hệ thống TL-PSBR phương thẳng đứng đã xác định được mật độ ban đầu thích hợp cho *H. pluvialis* là  $5 \text{ g.m}^{-2}$  và SKK sau cùng là  $213 \text{ g SKK.m}^{-2}$  sau 16 ngày nuôi cấy. Trong TL-PSBR phương nghiêng,  $5-7,5 \text{ g.m}^{-2}$  là mật độ sinh khối ban đầu tối ưu để sản xuất astaxanthin.

**3.6.2.2. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản sinh khối tảo ban đầu:** Các nghiên cứu trước cho biết rằng khi tiếp xúc với nhiệt độ thấp ( $4^\circ\text{C}$ ) *Haematococcus* chủ yếu tồn tại ở giai đoạn palmella không di động. Tuy nhiên, thời gian lưu trữ lâu hơn ( $>24$  giờ) của sinh khối ban đầu đã dẫn đến giảm năng suất sinh khối và astaxanthin trên TL-PSBR có lẽ là do tỉ lệ chết tế bào tăng lên trong huyền phù cô đặc cao.

**3.6.2.3. Khả năng ứng dụng module TL-PSBR phương nghiêng nuôi cố định vi tảo *H. pluvialis* ở pha sinh dưỡng:** Việc nuôi cấy pha xanh vi tảo *H. pluvialis* trong TL-PSBR phương nghiêng trong các điều kiện được kiểm soát về quang phổ ánh sáng, cường độ ánh sáng, và mật độ ban đầu,... đảm bảo một nguồn sinh khối ban đầu đáng tin cậy cho ứng dụng trong các hệ thống TL-PSBR quy mô lớn hơn. Đây là điểm mới quan trọng của nghiên cứu này trong việc giải quyết bài toán về sinh khối ban đầu chuẩn bị sinh khối khi tăng quy mô sản xuất, giảm thiểu công lao động, năng lượng cho li tâm so với kiểu nuôi huyền phù.

### **3.6.3. Ánh sáng trong TL-PSBR phương nghiêng và *H. pluvialis***

3.6.3.1. *Cường độ ánh sáng*: Trong khoảng cường độ ánh sáng từ 300–1000  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , năng suất SKK và sự tích lũy astaxanthin không có sự khác biệt đáng kể giữa các cường độ sau 10 ngày nuôi. Kết quả này khác với kết quả của Kiperstok *et al.*, trong đó tổng SKK đạt được cao nhất ở 1000  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ~130  $\text{g.m}^{-2}$  (so với ~70  $\text{g.m}^{-2}$  trong nghiên cứu này). Điều này có thể liên quan đến nồng độ CO<sub>2</sub> cao hơn được sử dụng trong các thí nghiệm của Kiperstok *et al.* và phương thức bổ sung CO<sub>2</sub> cũng khác nhau (trong pha khí so với trong môi trường nuôi cấy). Các nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành để tối ưu hóa việc bổ sung CO<sub>2</sub> cho MSH vi tảo.

3.6.3.2. *Chất lượng ánh sáng trong hệ thống TL-PSBR*: Nghiên cứu này cho thấy rằng đèn LED có tiềm năng lớn để nuôi cấy *H. pluvialis* trong TL-PSBR bằng cách tăng sinh khối và kích thích tích lũy astaxanthin.

3.6.3.3. *Chu kỳ sáng/tối trong hệ thống TL-PSBR*: Việc tăng thời gian chiếu sáng mỗi ngày bằng đèn LED đã làm tăng sinh khối tảo và lượng astaxanthin thu được một cách hiệu quả.

### **3.6.4. Sự bổ sung nguồn carbon và pH trong TL-PSBR phương nghiêng khi nuôi *H. pluvialis***

Kết quả nuôi *H. pluvialis* kiểu cố định trong TL-PSBR phương nghiêng cho thấy rằng sự tích lũy astaxanthin diễn ra tốt ở nồng độ NaHCO<sub>3</sub> thấp trong môi trường nuôi cấy đầy đủ dinh dưỡng. Trong MSH, nồng độ bicarbonate thấp hơn có thể được sử dụng trong thời gian nuôi cấy dài hơn để tăng tổng SKK và astaxanthin. Hơn nữa, bicarbonate có thể góp phần làm tăng tỉ lệ C/N khi cạn kiệt N và P, và các tế bào tảo vẫn quang hợp, tích lũy carotenoid (bao gồm astaxanthin) và tăng kích thước tế bào. Việc bổ sung pha khí CO<sub>2</sub> chỉ khả thi với các hệ thống có kích thước nhỏ và mức độ lưu thông không khí thấp.



## CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

*Từ kết quả nghiên cứu, 2 mục tiêu chung đạt được là:*

(1). Nghiên cứu để áp dụng công nghệ nuôi cấy vi tảo kiểu cố định trong hệ thống nuôi TL-PSBR phương nghiêng phù hợp với điều kiện thực tế ở Việt Nam, trong đó:

- Thiết kế, chế tạo và hoàn thiện được TL-PSBR phương nghiêng với diện tích MSH  $0,05 \text{ m}^2$  và thiết lập được quy trình nuôi tảo vi kiểu cố định trong hệ thống này.

- Thiết kế, chế tạo được hệ thống TL-PSBR phương nghiêng diện tích màng  $2 \text{ m}^2$  dạng module; xây dựng được quy trình vận hành để nuôi vi tảo trong hệ thống này ở quy mô pilot.

(2). Vận hành hệ thống TL-PSBR phương nghiêng để nuôi cấy thành công chủng vi tảo *H. pluvialis* CCAC 0125 ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot:

- Nuôi cấy thành công *H. pluvialis* pha xanh trong TL-PSBR phương nghiêng diện tích MSH  $0,05 \text{ m}^2$  để tạo nguồn sinh khối ban đầu, cung cấp một giải pháp thay thế cho việc nuôi cấy huyền phù. Điều kiện nuôi *H. pluvialis* pha xanh: cường độ ánh sáng  $80 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  từ đèn huỳnh quang, mật độ sinh khối ban đầu là  $6,5 \text{ g.m}^{-2}$ .

- Với mục tiêu nuôi *H. pluvialis* trong TL-PSBR phương nghiêng thu sinh khối giàu astaxanthin, các điều kiện, yếu tố ảnh hưởng đã được xác định gồm:

+ Việc sử dụng hệ thống đèn natri cao áp làm nguồn sáng dẫn đến làm tăng cao kinh phí vận hành hệ thống, khó kiểm soát kiểm soát nhiệt độ so với sử dụng đèn LED đơn sắc. Năng suất sinh khối và astaxanthin trên mỗi mole photon giảm khi tăng cường độ ánh sáng, đạt được cao nhất ở cường độ sáng 300 và  $400 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Mật độ sinh khối tảo ban đầu để bắt đầu nuôi cố định là  $7,5 \text{ g.m}^{-2}$  cho tỉ lệ và năng suất astaxanthin cao nhất là 2,17 % và  $151 \text{ mg.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ .

+ Thời gian bảo quản và trạng thái sinh lí của sinh khối tảo ban đầu có ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng sinh sau này và năng suất astaxanthin của *H. pluvialis* trong TL-PSBR, thời gian bảo quản 24 giờ cho năng suất astaxanthin cao nhất ( $205 \text{ mg.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ ), năng suất astaxanthin giảm đáng kể khi tăng thời gian bảo quản.

+ Khi nuôi tảo *H. pluvialis* trong hệ thống TL-PSBR phương nghiêng quy mô pilot với diện tích màng  $2 \text{ m}^2$ , sự kết hợp của đèn LED xanh lam và đỏ dẫn đến tăng sinh khối và tích lũy astaxanthin cao nhất so với việc chỉ sử dụng đèn LED màu xanh hoặc đỏ. Chế độ chiếu sáng 22 giờ sáng: 2 giờ tối bằng LED xanh lam và đỏ cho khả năng tăng sinh và tích lũy astaxanthin cao nhất.

+ Việc bổ sung khí  $\text{CO}_2$  vào môi trường BG11-H với lưu lượng  $3,6 \text{ mg.min}^{-1}$  là phù hợp cho sự sinh trưởng và tích lũy astaxanthin của vi tảo *H. pluvialis* trong TL-PSBR phương nghiêng. Môi trường BG11-H được bổ sung  $\text{NaHCO}_3$  10-20 mM trong suốt 10 ngày nuôi *H. pluvialis* trong TL-PSBR phương nghiêng không mang lại hiệu quả tích lũy astaxanthin so với chỉ bổ sung  $\text{CO}_2$ . Việc bổ sung  $\text{NaHCO}_3$  với nồng độ cao hơn 30 mM làm giảm tổng lượng astaxanthin thu được. Sự bổ sung  $\text{NaHCO}_3$  khi nuôi vi tảo *H. pluvialis* kiểu cố định làm cho các tế bào tích lũy astaxanthin với tỉ lệ cao chỉ sau 4 ngày.

Với các điều kiện nuôi cấy trên, tảo *H. pluvialis* đã được nuôi thành công trong TL-PSBR phương nghiêng quy mô pilot với diện tích MSH  $2 \text{ m}^2$  cho kết quả năng suất sinh khối trung bình đạt khoảng  $7,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  và hàm lượng astaxanthin xấp xỉ 2,0 % chỉ sau mười ngày.

#### **4.2. Kiến nghị**

Tiếp tục hoàn thiện quy trình sản xuất sinh khối tảo *H. Pluvialis* giàu astaxanthin trên hệ thống TL-PSBR phương nghiêng; Nghiên cứu để ứng dụng hệ thống TL-PSBR phương nghiêng để nuôi các loài vi tảo có giá trị kinh tế khác.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

- [1]. 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.
- [2]. **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). <https://doi.org/10.3390/biology8030068>
- [3]. **Do, T.-T.**, Ong, B.-N., Le, T.-L., Nguyen, T.-C., Tran-Thi, B.-H., Thu Hien, B. T., Melkonian, M., & Tran, H.-D. (2021). Growth of *Haematococcus pluvialis* on a small-scale angled porous substrate photobioreactor for green stage biomass. Applied Sciences (Switzerland), 11(4), 1788. <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/4/1788>
- [4]. **Do, T.-T.**, Tran-Thi, B.-H., Ong, B.-N., Le, T.-L., Nguyen, T.-C., Quan, Q.-D., Le, T.-C., Tran, D.-L., Melkonian, M., & Tran, H.-D. (2021). Effects of red and blue light emitting diodes on biomass and astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* in pilot scale angled twin-layer porous substrate photobioreactors. Ministry of Science and Technology, Vietnam, 63(2), 81–88. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.63\(2\).81-88](https://doi.org/10.31276/VJSTE.63(2).81-88)
- [5]. **Do, T. T.**, Quach-Van, T. E., Nguyen, T. C., Show, P. L., Nguyen, T. M. L., Huynh, D. H., Tran, D. L., Melkonian, M., & Tran, H. D. (2023). Effect of LED illumination cycle and carbon sources on biofilms of *Haematococcus pluvialis* in pilot-scale angled twin-layer porous substrate photobioreactors. Bioengineering 2023, Vol. 10, Page 596, 10(5), 596. <https://doi.org/10.3390/Bioengineering10050596>