

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÀI NGUYÊN VÀ MÔI TRƯỜNG HÀ NỘI**  
**KHOA MÔI TRƯỜNG**



**BÁO CÁO TỔNG KẾT**  
**ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN**  
**NĂM HỌC 2018 - 2019**

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG CO<sub>2</sub> ĐỂ NUÔI TẢO**  
**SPIRULINA PLATENISIS NHẪM SẢN XUẤT POLYHYDROXYBUTYRATE**

Thuộc nhóm ngành khoa học: Công nghệ kỹ thuật môi trường

**HÀ NỘI - NĂM 2019**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÀI NGUYÊN VÀ MÔI TRƯỜNG HÀ NỘI**  
**KHOA MÔI TRƯỜNG**



**BÁO CÁO TỔNG KẾT**  
**ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN**  
**NĂM HỌC 2018 – 2019**

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG CO<sub>2</sub> ĐỂ NUÔI TẢO**  
**SPIRULINA PLATENISIS NHẪM SẢN XUẤT POLYHYDROXYBUTYRATE**

Thuộc nhóm ngành khoa học: Công nghệ kỹ thuật môi trường

Nhóm SV thực hiện: Nguyễn Thị Nga  
Nguyễn Thị Hà  
Trần Thị Uyên  
Khổng Thị Nhung

Dân tộc : Kinh

Lớp, khoa : ĐH6M2; ĐH6M3;

Khoa Môi trường Năm thứ: 3/4

Ngành học : Công nghệ kỹ thuật môi trường

Người hướng dẫn: ThS. Lương Thanh Tâm

**HÀ NỘI - NĂM 2019**

## **THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI**

### **1. Thông tin chung:**

- Tên đề tài:

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG CO<sub>2</sub> ĐỂ NUÔI TẢO SPIRULINA PLATENSIS NHẪM SẢN XUẤT POLYHYDROXYBUTYRATE**

- Nhóm Sinh viên thực hiện:

1. Nguyễn Thị Nga

2. Nguyễn Thị Hà

3. Trần Thị Uyên

4. Không Thị Nhung

- Lớp: ĐH6M2; ĐH6M3

Khoa: Môi trường

Năm thứ: 03

Số năm đào tạo: 04

- Giáo viên hướng dẫn: ThS. Lương Thanh Tâm

### **2. Mục tiêu đề tài:**

- Mục tiêu chung : Góp phần giảm thiểu khí CO<sub>2</sub> tập trung trong môi trường không khí.

- Mục tiêu cụ thể : Thu sinh khối khô của tảo có thể sử dụng để sản xuất chất dẻo polyme sinh học từ việc sử dụng CO<sub>2</sub> để nuôi Spirulina platensis.

### **3. Tính mới và sáng tạo:**

Việc nghiên cứu sử dụng CO<sub>2</sub> để nuôi Spirulina platensis nhằm sản xuất Polyhydroxybutyrate là một hướng nghiên cứu khá mới với việc phân tích ảnh hưởng nồng độ CO<sub>2</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng tích lũy trong sinh khối Spirulina platensis SP8 trong các điều kiện nuôi khác nhau.

#### **4. Kết quả nghiên cứu:**

Bước đầu nhận thấy sinh khối khô của *Spirulina platensis* có thể sử dụng để sản xuất chất dẻo polyme sinh học (polyhydroxybutyrate) từ việc sử dụng CO<sub>2</sub> để nuôi *Spirulina platensis*. Khối lượng PHB đạt cực đại ở các điều kiện: nồng độ 1,36g/L NaHCO<sub>3</sub> + 2g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + sục CO<sub>2</sub>; sục CO<sub>2</sub> – pure nồng độ 5%, tốc độ sục khí 0,1 L/phút trong thời gian 1 giờ có kết hợp với sục không khí sạch (có 0,032% CO<sub>2</sub>) với tốc độ sục khí 1,2 L/L/phút trong thời gian 8h; cường độ ánh sáng là 5000 lux với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày được cấp bởi các đèn huỳnh quang công suất 40 Wat, nhiệt độ tối ưu là 30<sup>0</sup>C.

#### **5. Đóng góp về mặt kinh tế - xã hội, giáo dục và đào tạo, an ninh, quốc phòng và khả năng áp dụng của đề tài:**

Sự nóng lên toàn cầu và biến đổi khí hậu đã và đang là một vấn đề cấp thiết mà toàn thế giới quan tâm hàng đầu. Trong đó carbon dioxide là khí nhà kính và là nguyên nhân chính dẫn đến hiện tượng ấm lên toàn cầu. Vì vậy việc nghiên cứu sử dụng CO<sub>2</sub> để nuôi *Spirulina platensis* nhằm sản xuất polyhydroxybutyrate vừa giúp giảm lượng CO<sub>2</sub> phát thải ra môi trường bằng phương pháp sử dụng sinh vật, vừa tạo ra được sản phẩm phụ là polyhydroxybutyrate dễ phân hủy và thân thiện môi trường.

*Hà Nội, Ngày tháng 4 năm 2019*

**Sinh viên chịu trách nhiệm  
chính thực hiện đề tài**

**Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài**

Trong quá trình nghiên cứu khoa học, nhóm sinh viên đã chủ động tìm tòi các kiến thức, thông tin liên quan đến đề tài, chủ động thực hiện các thí nghiệm phân tích và lắp đặt mô hình. Thông qua nghiên cứu khoa học, sinh viên đã nắm được bản chất của quá trình hấp thụ CO<sub>2</sub> nuôi tảo nhằm sản xuất polyhydroxybutyrate hiệu quả ở quy mô phòng thí nghiệm.

*Ngày tháng 4 năm 2019*

**Xác nhận của trường đại học**

**Người hướng dẫn**

**Lương Thanh Tâm**

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục không khí.....	15
Bảng 3.2. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO <sub>2</sub> 1% .....	15
Bảng 3.3. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO <sub>2</sub> 2% .....	16
Bảng 3.4. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO <sub>2</sub> 5% .....	16
Bảng 3.5. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO <sub>2</sub> 10% .....	16
Bảng 3.6. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO <sub>2</sub> 15% .....	17
Bảng 3.7. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 16,8 g/L NaHCO <sub>3</sub> +sục không khí .....	18
Bảng 3.8. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 11 g/L NaHCO <sub>3</sub> +sục không khí .....	19
Bảng 3.9 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 4 g/L NaHCO <sub>3</sub> +sục không khí .....	20
Bảng 3.10. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 1,36 g/L NaHCO <sub>3</sub> + 2 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> +sục không khí .....	20
Bảng 3.11. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 16,8 g/L NaHCO <sub>3</sub> +sục CO <sub>2</sub> 5% .....	22
Bảng 3.12. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 11 g/L NaHCO <sub>3</sub> +sục CO <sub>2</sub> 5% .....	22
Bảng 3.13. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 4 g/L NaHCO <sub>3</sub> +sục CO <sub>2</sub> 5% .....	23

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1. Cấu trúc của Polyhydroxylalkanoates .....	3
Hình 2: Cấu trúc hóa học của Polyhydroxybutyrate .....	5
Hình 3. Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ CO <sub>2</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối <i>Spirulina platensis</i> SP8.....	17
Hình 4. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO <sub>3</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối <i>Spirulina platensis</i> SP8 .....	21
Hình 5. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO <sub>3</sub> trong điều kiện sục 5% CO <sub>2</sub> tinh khiết lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối <i>Spirulina platensis</i> SP8..	24
Hình 6. Sinh trưởng của chủng <i>Spirulina platensis</i> nuôi cấy trong các môi trường Zarrouk .....	28

## **DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT**

PHB - polyhydroxybutyrate

SKK - sinh khối khô

VSV - vi sinh vật

TLK - trọng lượng khô

VKL - vi khuẩn lam

PHA - Polyhydroxylalkanoates

PE - polyeten

PLA - polylactic acid



## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU .....	2
1.1. Giới thiệu chung về chất dẻo sinh học.....	2
1.2. Giới thiệu về Polyhydroxylalkanoates .....	3
1.3. Ứng dụng của Polyhydroxylalkanoates trong đời sống .....	4
1.4. Sản xuất Polyhydroxylalkanoates.....	4
1.5. Giới thiệu về Polyhydroxybutyrate .....	5
1.6. Sản xuất polyxyhydrobutyrate từ vi khuẩn cyanobacteria .....	5
1.7. Giới thiệu về tảo Spirulina Platensis .....	7
1.7.1. Phân loại .....	7
1.7.2. Cấu tạo.....	7
1.8. Sản xuất và ứng dụng Spirulina platensis.....	8
1.9. Tình hình nghiên cứu sử dụng CO <sub>2</sub> trong nuôi Spirulina platensis nhằm sản xuất Polyhydroxybutyrate ở Việt Nam.....	9
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	11
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu .....	11
2.2. Vật liệu nghiên cứu.....	11
2.2.1. Môi trường nuôi tảo.....	11
2.2.2. Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu .....	11
2.3. Nội dung thí nghiệm.....	12
2.4. Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu.....	13
2.4.1. Xác định tốc độ sinh trưởng .....	13
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ KẾT LUẬN.....	15
3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ CO <sub>2</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối Spirulina platensis SP8 .....	15
3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO <sub>3</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối <i>Spirulina platensis</i> SP8 .....	18
3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO <sub>3</sub> trong điều kiện sục 5% CO <sub>2</sub> tinh khiết lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối <i>Spirulina platensis</i> SP8 .....	22
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	26
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	27
PHỤ LỤC HÌNH ẢNH .....	28

## MỞ ĐẦU

Sự nóng lên toàn cầu là vấn đề cấp thiết trong thời đại chúng ta. Trong đó khí carbon dioxide là khí nhà kính và là nguyên nhân chính dẫn đến hiện tượng ấm lên toàn cầu. Hiện nay, đã có rất nhiều hoạt động nghiên cứu nhằm giảm thiểu khí carbon dioxide, chẳng hạn như thu hồi CO<sub>2</sub> từ khí thải của các khu công nghiệp, lưu trữ CO<sub>2</sub> dưới lòng đất hoặc dưới biển, hay chuyển hóa CO<sub>2</sub> thành vật liệu công nghiệp, tuy nhiên các hướng nghiên cứu này chưa mang tính bền vững. Chính vì vậy, điều này đã gợi mở cho các nhà nghiên cứu ý tưởng mới về cố định CO<sub>2</sub> bằng phương pháp sinh học dựa trên các hoạt động quang hợp của các sinh vật. Trong đó, giảm thiểu CO<sub>2</sub> thông qua quá trình quang hợp của các vi sinh vật cho thấy hiệu quả hơn cả về hiệu quả hấp thu CO<sub>2</sub> cũng như sinh khối thu hồi được. Sinh khối được sản xuất bởi các vi sinh vật quang hợp cần phải được sử dụng như một tài nguyên.

Ngày nay, chất dẻo sinh học và các hóa chất có nguồn gốc tự nhiên khác tiếp tục thu hút sự chú ý sản phẩm hóa dầu dựa trên sự biến động giá của dầu thô, tăng nhu cầu giảm phát thải khí nhà kính và nhận thức của cộng đồng về các vấn đề môi trường. *Spirulina (Arthrospira) platensis* - một loài Vi khuẩn lam có giá trị thương mại, có thể tổng hợp polyhydroxybutyrate, một dạng chất dẻo sinh học có khả năng phân hủy nhanh thông qua quá trình quang hợp sử dụng CO<sub>2</sub>. Chính vì vậy, điều này đã gợi ý cho chúng tôi ý tưởng thực hiện đề tài “*Bước đầu nghiên cứu sử dụng CO<sub>2</sub> để nuôi tảo Spirulina platensis nhằm sản xuất Polyhydroxybutyrate*”.

# CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

## 1.1. Giới thiệu chung về chất dẻo sinh học

Chất dẻo là các hợp chất cao phân tử, còn được gọi là nhựa hoặc polyme. Chúng có khả năng bị biến dạng khi chịu tác dụng của nhiệt độ, áp suất và vẫn giữ được sự biến dạng đó khi thôi tác dụng. Chất dẻo sinh học (bioplastic) là một nguồn vật liệu polyme mới đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Không chỉ được tổng hợp từ thực vật và các loài ngũ cốc quen thuộc trong đời sống hàng ngày như ngô, lúa mì, củ cải, khoai tây, dầu đậu nành,... chất dẻo sinh học còn có nguồn gốc từ các loài VSV, trong đó có tảo lam *Spirulina (Arthrospira)*. Chất dẻo sinh học có thời gian phân hủy khá nhanh trong môi trường. Nếu như chất dẻo truyền thống như polyetilen (PE) phải mất gần bốn thế kỷ mới hoàn toàn bị thoái hóa thì việc trộn lẫn PE với chất dẻo sinh học, thời gian thoái hóa rút ngắn chỉ còn 4 đến 5 năm trong điều kiện môi trường bình thường, thậm chí chỉ còn 20 ngày nếu trộn lẫn với phân hữu cơ compost và ủ trong điều kiện nhiệt độ khoảng 50 - 60<sup>0</sup>C với sự có mặt các vi khuẩn ưa nhiệt.

Chất dẻo sinh học có đặc tính của hợp chất polyme giống như chất dẻo thông thường như: có trọng lượng phân tử lớn, có tính chịu nhiệt và đàn hồi cao. Tuy nhiên, chất dẻo sinh học có những ưu điểm hơn hẳn so với chất dẻo thông thường như: khả năng tái sử dụng cao, có thể thay thế các nguồn nhiên liệu truyền thống là dầu mỏ và lợi thế quan trọng nhất là không gây ô nhiễm môi trường do có nguồn gốc chủ yếu từ thực vật, các loại VSV và thời gian phân hủy tương đối ngắn. Chính vì những ưu điểm nổi trội này mà chất dẻo sinh học được coi là giải pháp tiết kiệm năng lượng trong quá trình sản xuất, làm giảm sự lệ thuộc vào dầu mỏ - một loại tài nguyên quý báu đang có nguy cơ cạn kiệt và có thể mở ra một kỷ nguyên công nghiệp mới.

Quá trình tổng hợp chất dẻo sinh học có thể chia thành 3 loại dựa vào nguồn nguyên liệu tổng hợp ban đầu:

- +/ Dựa vào hợp chất polyme tự nhiên;
- +/ Dựa vào quá trình lên men của thực vật;
- +/ Tổng hợp trực tiếp từ VSV.

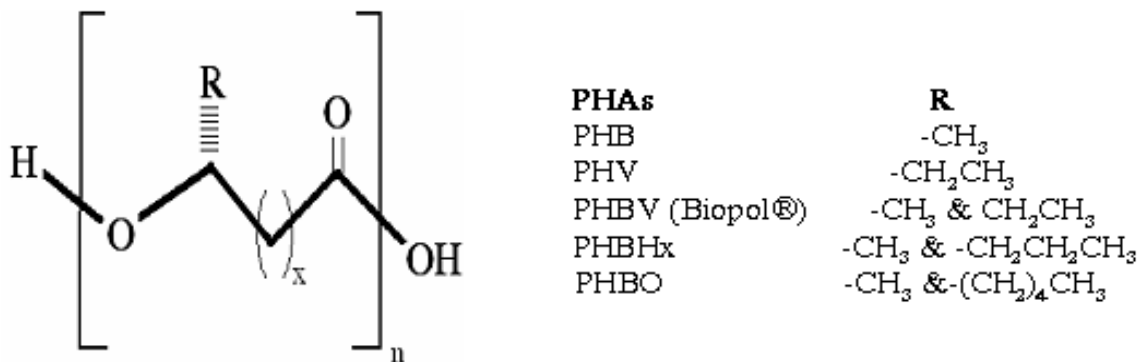
Chất dẻo sinh học bao gồm nhiều loại như: PLA (polylactic acid), PHAs (Poly-3-hydroxylalkanoates), aliphatic polyeste, polysaccarit, cellulose acetate, polyamide đang được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực sản xuất công nghiệp.

Hiện nay trên thế giới có khoảng 60% bioplastic đang được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp dệt và công nghệ đóng gói. Năm 2002, bioplastic đã được các tập

đoàn công nghiệp và điện tử lớn như Toyota, Fujitsu của Nhật Bản ứng dụng để chế tạo một số bộ phận thiết bị sử dụng cho ngành điện tử và công nghệ thông tin. Năm 2007, PLA cũng đã được sản xuất tại Hàn Quốc với công suất 5000 tấn/năm. Các nghiên cứu về bioplastic ngày càng thu hút nhiều nhà khoa học trên thế giới. Năm 2009, các nhà khoa học tại Bắc Ai-Len đã nghiên cứu sử dụng thành công kỹ thuật mới để sản xuất chất dẻo sinh học từ cây chuối. Năm 2010, các nhà khoa học thuộc Trung tâm Nghiên cứu Almaden của tập đoàn IBM ở Nam California (Mỹ) đã nghiên cứu thành công phương pháp sản xuất chất dẻo sinh học từ thực vật thân thiện với môi trường.

## 1.2. Giới thiệu về Polyhydroxylalkanoates

Polyhydroxylalkanoates (PHAs) là một trong các loại chất dẻo sinh học, có bản chất là polyeste của hydroxyalkanoates. Lần đầu tiên PHAs được tìm thấy ở một loài vi khuẩn có tên là *Bacillus megaterium* năm 1926. Nhiều năm sau, PHAs bắt đầu được phát hiện trong cơ thể của nhiều loài VSV khác. PHAs được tổng hợp và giữ trong tế bào chất ở dạng không hòa tan, được coi là một dạng năng lượng dự trữ của tế bào. Chúng có thể bị phân hủy nhờ quá trình trao đổi và xúc tác của enzym nội bào thành cacbon và giải phóng năng lượng, hỗ trợ dinh dưỡng cho tế bào. Trong tế bào, PHAs thường được giữ dưới dạng các hạt riêng biệt (granules), kích thước và số lượng của các hạt biến đổi tùy thuộc vào các loài VSV. Riêng trong một tế bào ở loài *Alcaligenes eutrophus* có khoảng 8-13 hạt với đường kính hạt tương ứng khoảng 0,2 – 0,5  $\mu\text{m}$  quan sát được dưới kính hiển vi điện tử. PHAs gồm hơn 150 monome, chiều dài mạch từ 3 – 14 nguyên tử cacbon với trọng lượng phân tử khoảng 50.000 – 1000.000 daltons.



**Hình 1. Cấu trúc của Polyhydroxylalkanoates**

PHAs được chia thành hai nhóm tùy thuộc vào số nguyên tử cacbon trong phân tử:

+/ PHAs mạch ngắn: bao gồm 3 – 5 nguyên tử cacbon;

+/ PHAs mạch dài: bao gồm 6 – 14 nguyên tử cacbon.

PHAs có đặc tính của các polyme chịu nhiệt như trọng lượng phân tử lớn, độ đàn hồi cao, nhiệt độ nóng chảy từ 50 – 180<sup>0</sup>C [33]. Dựa vào số lượng nguyên tử cacbon

trong phân tử, PHAs có thể chia thành nhiều loại như: poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), poly (3-hydroxyvalerate) (PHV) và poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PH-PV).

### **1.3. Ứng dụng của Polyhydroxylalkanoates trong đời sống**

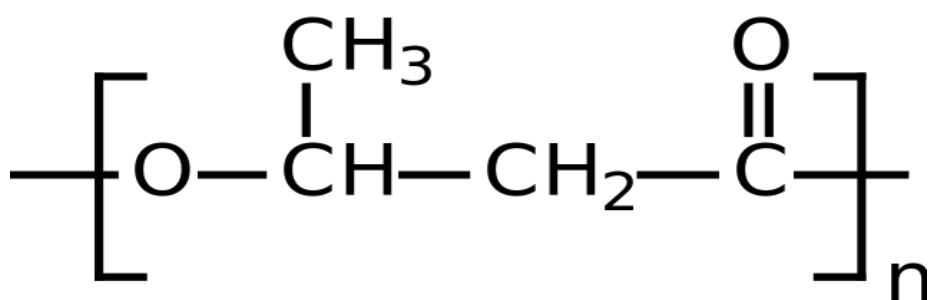
Trong 2 – 3 thập kỷ qua, số lượng và chủng loại PHAs được sử dụng trong đời sống ngày càng được mở rộng. Cho đến nay, chỉ riêng tại châu Âu lượng PHAs tiêu thụ đã đạt khoảng 50.000 tấn/năm. Trong nhóm PHA thì poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) lẫn các copolyme của chúng như poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) có tầm quan trọng lớn và được tổng hợp nhiều nhất. P (HB-HV) đã được sử dụng làm film, các chai nhựa và có thể dùng làm nguyên liệu sản xuất giấy. Ngoài ra, với khả năng tự phân hủy, P (HB-HV) cũng được sử dụng trong y học. Sự phân hủy của PHB đã được phát hiện thấy trong các tế bào máu của người, vì vậy có thể sử dụng PHB trong các mô của động vật có vú mà không lo ngại đến khả năng bị ngộ độc. PHB và một số PHA khác thích hợp cho sử dụng làm bao bì và vật liệu tráng nhưng cũng dùng cho các mặt hàng vệ sinh như tã giấy hoặc băng vệ sinh.

### **1.4. Sản xuất Polyhydroxylalkanoates**

Từ những năm 1980, hai loại PHAs là 3-hydroxybutyrate và hydroxyvalerianacid đã được một công ty hóa chất lớn của Anh sản xuất trên thị trường với sản phẩm tên gọi là "Biopol". Sản phẩm này sau đó được phân phối từ công ty Monsanto và Metabolix tại Mỹ và tiếp tục được phát triển rộng rãi trên thế giới. Hiện nay, các tập đoàn công nghiệp sản xuất PHAs lớn trên thế giới gồm có: công ty Metabolix (Mỹ), công ty Biocycle (Brazil), công ty vật liệu sinh học Tianan thuộc tập đoàn Ningbo (Trung Quốc) và thị trường châu Âu là nơi tiêu thụ chính. Cho đến nay, việc tìm kiếm các nguồn nguyên liệu tự nhiên có khả năng tổng hợp PHA đang ngày càng thu hút sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên toàn thế giới. Theo nhiều nghiên cứu, hàm lượng PHA thu được trong quá trình sinh tổng hợp từ VSV có thể lên tới 80% so với trọng lượng khô của tế bào. Trong tế bào chất của một số loài thực vật bậc cao và tảo lam, enzym  $\beta$ -ketothiolase tham gia vào quá trình tổng hợp và tích lũy PHAs đã được phát hiện. Ở một số thực vật bậc cao và tảo lam, hàm lượng PHA được tích lũy có thể đạt 14% so với trọng lượng của tế bào nhờ áp dụng kỹ thuật chuyển gen vào thực vật. Ở điều kiện bình thường, hàm lượng PHA ở tảo lam chỉ đạt có 5%. Chính vì vậy, nếu tận dụng các kỹ thuật hiện đại của công nghệ sinh học nhằm nâng cao hiệu suất tổng hợp PHAs từ các nguyên liệu tự nhiên không những mang lại hiệu quả kinh tế cao mà còn có ý nghĩa lớn trong bảo vệ môi trường.

## 1.5. Giới thiệu về Polyhydroxybutyrate

Polyhydroxybutyrate (PHB) là đặc điểm sinh học đầu tiên, phổ biến nhất và được đặc trưng tốt nhất thuộc về PHA. Nó được đặc trưng đầu tiên vào giữa những năm 1920 bởi nhà vi sinh học người Pháp Maurice Lemoigne từ công trình của ông với vi khuẩn *Bacillus megaterium*. Cấu trúc hóa học của PHB được thể hiện trong hình 2, nó là đẳng hướng, với 100% các nguyên tử cacbon bất đối xứng trong cấu hình lập thể (R). Kết quả là PHB có độ tinh thể cao và giòn. Trọng lượng phân tử của nó có thể thay đổi từ 50.000 - 5.000.000. Nó đặc biệt hấp dẫn đối với các tính chất cơ học tương tự của nó và khả năng xử lý nhiệt dẻo đối với polypropylene.



**Hình 2: Cấu trúc hóa học của Polyhydroxybutyrate**

Bởi vì PHB là hợp chất giòn và cứng với cường độ cơ học tương đối cao, nó vốn đã thích hợp cho các ứng dụng kỹ thuật mô cứng, chẳng hạn như mô xương, nơi cần có độ bền cơ học cao. PHB đã được đề xuất sử dụng trong kỹ thuật mô xương do tỷ lệ suy thoái thuận lợi của chúng (tức là chậm) và các sản phẩm phân hủy không độc hại. Sự suy giảm trong cơ thể của PHB mang lại D-3-hydroxybutyrate, một thành phần bình thường của máu. PHA cũng thể hiện tính áp điện, kích thích tăng trưởng xương và hỗ trợ chữa lành vết thương. Ngoài ra, các đơn vị monome chiral của PHB có thể được sử dụng như các phân tử cơ bản để sản xuất hóa chất của các tác nhân được phân chiral phức tạp.

## 1.6. Sản xuất polyhydroxybutyrate từ vi khuẩn cyanobacteria

Khả năng của cyanobacteria để tổng hợp PHB lần đầu tiên được báo cáo vào năm 1966. PHB được chiết xuất từ các mẫu vi khuẩn cyanobacterium *Chlorogloea fritschii* đơn bào và được đặc trưng bởi quang phổ cơ sở hạ tầng (IR). Kể từ đó, hơn 90 chủng vi khuẩn thuộc nhóm 25 chi khác nhau đã được thử nghiệm cho sự hiện diện của PHA. Kết quả cho thấy 60% chứa PHA, và tất cả các tác giả đều báo cáo rằng PHB là PHA chi phối (nếu không chỉ) được tổng hợp bởi cyanobacteria. Cần lưu ý rằng không có sự xuất hiện của PHB ở một số loài và không thống nhất về hàm lượng PHB trong các loài thuộc cùng một chi, cho thấy sự tích lũy PHB trong vi khuẩn lam có vẻ là loài cụ thể. Ví dụ, trong cùng điều kiện tăng trưởng tự hủy, sự xuất hiện của PHB ở xã *Nostoc* không thể phát hiện được, trong khi hàm lượng PHB 3,6% và 8,5% trọng lượng khô tế bào (cdw) được phát hiện ở *N. linckia* và *N. muscorum*, tương ứng.

Hầu hết các vi khuẩn cyanobacteria có khả năng tổng hợp PHB được báo cáo là tích lũy <10% cdw PHB dưới sự tăng trưởng quang tự dưỡng.

Cyanobacteria đang được nghiên cứu như là hệ thống máy chủ thay thế cho sản xuất PHB chi phí thấp vì yêu cầu dinh dưỡng tối thiểu của chúng, thời gian thế hệ ngắn và tính chất quang tự dưỡng. Cyanobacteria tổng hợp cacbon hữu cơ của chúng từ carbon vô cơ bằng năng lượng mặt trời. Trong vi khuẩn, chất nền carbon như đường hoặc chất béo được yêu cầu. Chi phí của nguồn carbon là khoảng 40% tổng chi phí hoạt động. Hiện nay các nỗ lực đang được thực hiện để phát triển vi khuẩn trên các nguồn carbon không tốn kém như các loại dầu thực vật tái tạo khác nhau và các sản phẩm chất thải khác nhau.

Có ý nghĩa quan trọng là không giống như vi khuẩn hiện đang được sử dụng cho sản xuất PHB thương mại, vi khuẩn lam không chứa lipopolysaccharide gây viêm, cho thấy rằng PHB vi khuẩn có thể ít pyrogen hơn và thích hợp hơn cho sử dụng y sinh.

Lipopolysaccharides được tìm thấy trong màng ngoài của vi khuẩn gram âm và hoạt động như nội độc tố thu hút các phản ứng miễn dịch mạnh mẽ, mà phải được loại bỏ.

Tuy nhiên, hầu hết các vi khuẩn cyanobacteria đều tích tụ <10% trọng lượng khô tế bào (cdw) PHB dưới sự tăng trưởng quang tự do trong khi các chủng vi khuẩn được thể hiện tích lũy tới 50-80% cdw PHB. Mặc dù việc sử dụng ánh sáng mặt trời có thể hiệu quả hơn và ít có khả năng thanh lọc rộng hơn theo yêu cầu sử dụng vi khuẩn lam để sản xuất PHB, nhưng sản lượng PHB của chúng vẫn phải được cải thiện để giảm chi phí nguyên vật liệu và xử lý hạ lưu.

Sử dụng các hợp chất hữu cơ như acetate, pyruvate, propionate, valerate, glucose hoặc citrate có tác dụng kích thích lên sản xuất PHB. Hầu hết các chủng, cả vi khuẩn và vi khuẩn lam, cho thấy sự tích lũy PHB cao nhất trong sự hiện diện của acetate. Vì vậy, nhiều nhà nghiên cứu đang sử dụng điều kiện tăng trưởng hỗn hợp với vi khuẩn lam để tăng năng suất PHB. Hàm lượng PHB cao tới 45,6% đã đạt được ở *N. muscorum* khi bổ sung acetate và glucose.

Sự hiện diện của acetate trong môi trường tăng trưởng được biết là làm tăng nồng độ trong tế bào của acetyl-CoA, một hợp chất trung gian phổ quát có thể dễ dàng được chuyển đổi thành PHB bởi nhiều vi sinh vật. Con đường tổng hợp sinh tổng hợp PHB được mô tả cho vi khuẩn cyanobacteria. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng chỉ có ba nhóm enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PHB từ acetyl-CoA trong cả vi khuẩn và vi khuẩn lam: 3-ketothiolase, adenosyletyl-CoA phụ thuộc NADPH, và PHA synthase. Nói chung, quá trình sinh tổng hợp của PHB bắt đầu với hai phân tử acetyl-CoA phản ứng qua quá trình ngưng tụ thành acetoacetyl-CoA qua 3-ketothiolase. Acetoacetyl-CoA sau đó được giảm bởi acetoacetyl-CoA reductase để tạo thành monomer (R) -3hydroxybutyryl-CoA. Cuối cùng, nhóm enzyme quan trọng PHA synthase thực hiện phản ứng trùng hợp để tạo ra PHB.

Được biết rằng sinh tổng hợp PHB được điều chỉnh ở mức enzyme. Ngoài nồng độ nội bào cao của acetyl-CoA, người ta đã chỉ ra rằng nồng độ NADPH nội bào cao (hoặc tỷ lệ NADPH / NADP cao) kích thích sản xuất PHB. Nó được báo cáo rằng vai trò của PHB trong vi khuẩn lam là cung cấp cho các tế bào một cơ chế loại bỏ các tương đương giảm dư thừa do sự gián đoạn của sự hình thành cân bằng của ATP và NADPH từ quá trình quang hợp. Hơn nữa, trong cyanobacterium *Synechococcus* sp. MA19, nó đã được chỉ ra rằng hoạt động tổng hợp PHB được kích hoạt do thiếu nitơ trong điều kiện ánh sáng.

Tính chất nhiệt và cơ học của PHB chiết xuất từ cyanobacterium *Nostoc muscorum* cho thấy tính chất tương tự khi so sánh với phạm vi giá trị được báo cáo trong tài liệu cho thương mại PHB.

Nhìn chung, sản xuất PHB thường là một quá trình canh tác hai bước, theo đó các tế bào được trồng trong môi trường giàu chất dinh dưỡng để sản xuất sinh khối, sau đó chuyển sang môi trường thiếu để bắt đầu sản xuất PHB cao. Bổ sung nguồn cacbon bổ sung thường được áp dụng trong bước giới hạn chất dinh dưỡng. Trong bước đầu tiên, canh tác, hàm lượng PHB đạt đến mức tối đa trong giai đoạn bắt đầu của giai đoạn dừng, và sau đó bắt đầu giảm khi các vi sinh vật bắt đầu huy động các phân tử lưu trữ năng lượng.

## 1.7. Giới thiệu về tảo *Spirulina Platensis*

### 1.7.1. Phân loại

Theo phân loại mới nhất, *Spirulina platensis* thuộc:

- Chi *Arthrospira*
- Họ *phormidiacacac*
- Bộ *Oscillatoriales*
- Lớp *Chroobacteria*
- Nhánh *Cyanobacteria*

Do hình dạng giống “lò xo xoắn” dưới kính hiển vi nên được gọi là spirulina với tên khoa học là *spirulina platensis* (bắt nguồn từ chữ spire, spiral có nghĩa là xoắn ốc) và trước đây được coi thuộc chi *Spirulina*.

Thực ra đây không phải là sinh vật thuộc tảo (alage) vì tảo thuộc sinh vật có nhân thật (eukaryote). *Spirulina* thuộc vi khuẩn lam nên chúng thuộc sinh vật nhân sơ hay nhân nguyên thủy (Prokaryote).

### 1.7.2. Cấu tạo

Bằng lát cắt cực mỏng khi quan sát dưới kính hiển vi, thành tế bào của spirulina có 4 lớp:



- Lớp ngoài cùng: gọi là lớp thứ IV được sắp xếp đều nhau, song song với trục chính. Lớp này được xem như là thành tế bào của vi khuẩn gram âm.
- Lớp thứ III được tạo thành từ những sợi protein bao quanh cơ thể
- Lớp thứ II chứa peptidoglycan, được sắp xếp gấp lại vào hướng trong của sợi tảo.
- Lớp thứ I nằm sát với lớp thứ II.

Vách tế bào được ví như cái đĩa mỏng, bao lấy phần bên trong cơ thể và được cấu tạo chủ yếu bằng peptidoglycan nên nhạy cảm với lysozyme và dễ dàng tiêu hóa trong ống tiêu hóa của người và động vật. Nhưng khi phân tích các hoạt chất muốn chiết suất thì nhất thiết phá vỡ màng tế bào.

Tế bào có dạng hình trụ, liên kết lại thành chuỗi. Giữa các tế bào có vách ngăn, những vách ở đầu sợi thường dày hơn. Vì vậy, đây là cơ thể đa bào, mỗi sợi có khoảng cách 100 tế bào.

Các tế bào riêng rẽ thường có kích thước khoảng  $5\mu m$ , rộng khoảng  $2\mu m$ . Tế bào chưa có nhân điển hình, vùng nhân không rõ ràng.

Trong tế bào chất có chứa túi không bào khí, có đường kính khoảng  $0.065\mu m$  dài  $1\mu m$ . Nhờ các túi khí này mà tế bào nổi được trên mặt nước, tạo điều kiện thuận lợi cho thu vớt sinh khối.

### 1.8. Sản xuất và ứng dụng *Spirulina platensis*

Sản lượng sinh khối hàng năm của *S. platensis* là hơn 3000 tấn trọng lượng khô, vượt trội so với *Chlorella* (trọng lượng khô 2000 tấn) và *Dunaliella salina* (trọng lượng khô 1200 t), khiến nó trở thành vi khuẩn được trồng nhiều nhất trên thế giới [19]. Nhà sản xuất chính DIC LIFETEC (Nhật Bản) sở hữu hai công ty, Earthrise Nutritionals (California, USA) và Hải Nam DIC Microalgae (Trung Quốc), sản xuất hơn 700 tấn mỗi năm trong khoảng 1,85 km<sup>2</sup>. Cyanotech (Hawaii, Mỹ) sản xuất khoảng 300 tấn trong khoảng 0,36 km<sup>2</sup>. Hiện nay, tất cả các nhà sản xuất chính của *Spirulina* trên thế giới đều sử dụng các ao ruộng để trồng đại trà và các ứng dụng chủ yếu cho dinh dưỡng của con người và động vật, và mỹ phẩm.

*S. platensis* hiện là sinh vật được sử dụng để sản xuất thương mại phycobiliprotein (sắc tố protein) phycocyanin màu xanh. Phycocyanin đã được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm và đồ uống và trong ngành công nghiệp mỹ phẩm làm thuốc nhuộm tự nhiên, thay thế các chất màu tổng hợp. Gần đây, phycocyanin đã thu hút sự chú ý cho các tính chất dược phẩm mà nó sở hữu. Ví dụ, phycocyanin được sử dụng trong chẩn đoán y tế như thử kháng thể huỳnh quang trong ung thư, và trong nghiên cứu y sinh như một sản phẩm dược phẩm tiềm năng do đặc tính chống oxy hóa, chống

viêm và tăng cường miễn dịch của nó. Tổng giá trị thị trường phycoyanin ước tính khoảng 10-50 triệu USD / năm, làm cho nó trở thành một chiết xuất có giá trị cao từ *S. platensis* (~ 15% phycoyanin cdw).

### **1.9. Tình hình nghiên cứu sử dụng CO<sub>2</sub> trong nuôi *Spirulina platensis* nhằm sản xuất Polyhydroxybutyrate ở Việt Nam**

Từ cuối những năm 1970, tảo *Spirulina* được sản xuất đại trà ở một số nước như Mỹ, Nhật Bản, Mêhicô, Trung Quốc, Ấn Độ, Thái Lan, Đài Loan, Cuba và Việt Nam.

Ở nước ta, tảo *Spirulina* được nhập nội từ Pháp năm 1972. Nó đã trở thành một đối tượng nghiên cứu sinh lý, sinh hoá, tại Viện Sinh Vật học (nay là Viện Công nghệ Sinh học) do cố Giáo sư Nguyễn Hữu Thước chủ trì. Những nghiên cứu về tác động của ánh sáng, nhiệt độ, pH đã cho phép đẩy nhanh quá trình thích ứng của tảo này với điều kiện khí hậu của Việt Nam. Một môi trường dinh dưỡng rẻ tiền, thích hợp cho tảo này cũng đã được đưa ra dựa trên những nghiên cứu về tác động của các nguyên tố khoáng lên sinh trưởng và quang hợp của tảo *Spirulina*. Sử dụng các môi trường này tảo *Spirulina* đã được đưa vào nuôi trồng thử nghiệm đại trà tại Hà Nội, Bình Thuận, Bến Tre, Thành phố Hồ Chí Minh với một kỹ thuật bổ sung môi trường trong nuôi trồng đại trà đã được thiết lập. Trong khoảng thời gian 1981 – 1985, nuôi trồng *Spirulina* ở quy mô lớn tại suối nước khoáng Vĩnh Hảo giàu bicacbonat và các chất khoáng khác, có nhiệt độ cao, gió và ánh sáng quanh năm đã được tiến hành với quy mô ban đầu là 60 bể (mỗi bể 45m<sup>3</sup>) với năng suất 8 – 10g khô/m<sup>2</sup>/ngày. Cũng trong thời gian này, hàng loạt nghiên cứu ứng dụng sinh khối *Spirulina* cho gia cầm, cá, vịt, ong, tằm cũng đã được thực hiện.

Vào đầu thời điểm những năm 1980s, ở Thuận Hải hai sản phẩm *Spirulina* - “Linavina” và “Lactogyl” đã có mặt trên thị trường được dùng làm thuốc bổ dưỡng. Các bệnh viện Thống Nhất, Bệnh viện phụ sản Từ Dũ, Bệnh viện tỉnh Thuận Hải, Trung tâm dinh dưỡng trẻ em thành phố Hồ Chí Minh cũng tiến hành thử nghiệm sử dụng sinh khối *Spirulina* trong phòng chống suy dinh dưỡng ở trẻ em và người già. Trong giai đoạn 1986 – 1990, diện tích nuôi trồng *Spirulina* ở Thuận Hải được nâng lên 5000m<sup>2</sup> với sản lượng đạt được 6 tấn khô/ năm, giá bán 10 – 12 USD/ 1kg.

Những nghiên cứu sâu về nguồn cacbon và công nghệ sử dụng CO<sub>2</sub> trực tiếp (không qua phối trộn khí) đã được thử nghiệm thành công tại hai cơ sở nuôi trồng tảo này ở Bến Tre và Đồng Nai. Hàng loạt công trình nghiên cứu nhằm đánh giá tổng quát hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học của *Spirulina* cũng đã được các nhà khoa học Việt Nam nghiên cứu. Nhằm tận dụng nguồn nước biển, nước lợ cho khả năng sản xuất *Spirulina* trong tương lai nên những nghiên cứu về khả năng chống chịu muối NaCl của tảo này cũng đã được nghiên cứu. Khả năng sử dụng nước khoáng Đắc Min (tỉnh

Đắc Lắc) để sản xuất đại trà tảo *Spirulina* với công nghệ thích hợp cũng đã được quan tâm nghiên cứu trong giai đoạn này. Một quy trình công nghệ tách chiết sắc tố lam từ *Spirulina* để ứng dụng cho bệnh nhân ung thư và tai, mũi, họng cũng đã được hoàn chỉnh. Chế phẩm “Phycobleu” đã được trường Đại học Y khoa Hà Nội thử độc tính và dùng thử nghiệm cho bệnh nhân tại Viện Tai Mũi Họng Hà Nội.

Sinh khối của tảo lam *Spirulina* dùng để tách chiết các chất có hoạt tính sinh học có giá trị dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật, nguồn phân bón sinh học và vai trò của nó trong xử lý môi trường cũng đã được đi sâu nghiên cứu.

Sinh khối của tảo lam *Spirulina* không chỉ được nghiên cứu dùng để tách chiết các chất có hoạt tính sinh học có giá trị dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho con người và động vật mà vai trò quan trọng trong xử lý môi trường của tảo lam *Spirulina* cũng được đi sâu nghiên cứu. Tảo lam *Spirulina* đã được sử dụng trong xử lý nước thải giàu amoni từ một số nguồn phân hoá học trong trồng trọt ở Việt Nam để giảm thiểu ô nhiễm môi trường và giảm giá thành sản phẩm từ *Spirulina*. Ngoài ra, các thử nghiệm nuôi trồng tảo này bằng nguồn nước thải ươm tơ tằm, nước thải của nhà máy phân đạm, nước thải từ hầm biogas....đã được triển khai, ngay cả các nguồn phế thải hữu cơ như rỉ đường, phế thải công nghiệp rượu bia cũng đã được thử nghiệm để nuôi trồng và thu sinh khối tảo này. Nhiều cơ sở nuôi trồng, sản xuất và chế biến các sản phẩm từ tảo *Spirulina* đã được thành lập với công nghệ nuôi tảo trên các bể nông xây bằng xi măng sử dụng khí CO<sub>2</sub> của công nghệ tạo nguồn cacbon, nguồn CO<sub>2</sub> trực tiếp lấy từ các nhà máy bia, cồn, rượu...nén hóa lỏng vào bình chứa. Đó là các cơ sở như Vĩnh Hảo (Bình Thuận), Châu Cát, Suối Nghệ (Đồng Nai), Đắc Min (Đắc Lắc).

Trước thực trạng gia tăng CO<sub>2</sub> trong môi trường không khí ở Việt Nam, việc sử dụng *Spirulina* để xử lý môi trường là hoàn toàn có thể áp dụng được, có tính khả thi cao. Tuy nhiên, giá thành xử lý sẽ cao do chi phí cho các thiết bị để lắp đặt, xây dựng hệ thống các bể xử lý nước thải lớn....Trong bối cảnh trên, việc lựa chọn được các chủng *Spirulina* có khả năng tổng hợp cao các chất có hoạt tính sinh học (như chất dẻo sinh học) cũng như hấp thu tốt CO<sub>2</sub> là một hướng đi đúng, có tính khả thi cao. Việc kết hợp xử lý CO<sub>2</sub> bằng *Spirulina* với việc tách chiết các chất có hoạt tính sinh học như chất dẻo sinh học từ sinh khối tảo sẽ làm giảm giá thành xử lý, có tính khả thi cao và có ý nghĩa cả về mặt khoa học và thực tiễn.

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

#### \* *Đối tượng nghiên cứu:*

+ Vi khuẩn lam *Spirulina platensis* được cung cấp bởi Phòng Thủy sinh học Môi trường, Viện Công Nghệ Môi Trường, Viện Hàn lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam.

+ Khí CO<sub>2</sub>

+ Polyhydroxybutyrate

#### \* *Phạm vi nghiên cứu:* Phòng thí nghiệm.

+ Địa điểm: Đề tài được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Khoa Môi trường – Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội.

+ Thời gian thực hiện từ tháng 10 - 3/2019.

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.2.1. Môi trường nuôi tảo

Môi trường Zarrouk dùng để nuôi *Spirulina platensis* có thành phần như sau (1 lít): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,5 g NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,0 g NaCl; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O; 0,04 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>; 0,08 g Na<sub>2</sub>EDTA; vi lượng số 1; số 2 và A5 (mỗi loại 1 ml).

Dung dịch vi lượng số 1 trong 1 lit có các thành phần: 28,46 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O và 30,2 g EDTA-Na<sub>2</sub>.

Dung dịch vi lượng số 2 trong 1 lit có các thành phần: 0,023 g NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>; 0,096 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>).24H<sub>2</sub>O; 0,0478 g NiSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,0178 g Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,04 g Ti<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>; 0,044 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.

Dung dịch vi lượng A<sub>5</sub> cho 1 lit có các thành phần: 2,86 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 g MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O; 0,222 g ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,39g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0,079 g CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O.

#### 2.2.2. Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu

Các thiết bị và dụng cụ nghiên cứu được sử dụng trong nghiên cứu gồm: Cân kỹ thuật; Máy đo quang phổ; máy đo pH; hệ thống bình 1 lít cho nuôi tảo; máy sục khí SB-9903 và Hailea AC0-388D; máy nén khí Puma PX-20100(2HP), box cấy tảo.

### 2.3. Nội dung thí nghiệm

**Thí nghiệm 1:** Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ CO<sub>2</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8

Để xác định nồng độ CO<sub>2</sub> phù hợp cho sinh trưởng của chủng *Spirulina platensis* SP8, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ CO<sub>2</sub> tinh khiết lên sinh trưởng và phát triển của chủng vi tảo này. *Spirulina platensis* SP8 được nuôi trong các ống thủy tinh hình trụ 1 lít có chiều cao 412 mm, đường kính 60mm, thể tích  $1,16 \cdot 10^{-3}$  m<sup>3</sup>. Môi trường nuôi cấy là Zarrouk 16,8g/l NaHCO<sub>3</sub>; được sục không khí với tốc độ sục khí 1,2 L/phút trong thời gian 8h kết hợp với sục khí CO<sub>2</sub> tinh khiết: 1%, 2 %, 5 %, 10 %, 15 % với tốc độ sục khí 0,1 L/phút trong thời gian 1 giờ; cường độ ánh sáng là 5000 lux với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày, nhiệt độ nuôi 30°C. Tỷ lệ cấp giống ban đầu là 0,15 g/L SKK. Thí nghiệm được theo dõi trong vòng 10 ngày. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần.

**Thí nghiệm 2:** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO<sub>3</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8

Trong thí nghiệm này, để tìm hiểu khả năng giảm số lượng bicacbonat trong môi trường nuôi và ảnh hưởng của nó đến năng suất của VKL, tiến hành nghiên cứu thăm dò ảnh hưởng của nồng độ NaHCO<sub>3</sub> lên sinh trưởng của *S. platensis* SP8 trong nuôi thử nghiệm trong các ống thủy tinh hình trụ 1 lít có chiều cao 412 mm, đường kính 60mm; sục khí bằng không khí thường với tốc độ sục khí 1,2 L/phút trong thời gian 8h. Cường độ ánh sáng là 5000 lux với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày, nhiệt độ nuôi 30°C. Tỷ lệ cấp giống ban đầu là 0,15 g/L SKK. Các công thức thí nghiệm như sau:

Công thức 1 (CT1): Môi trường Zarrouk có chứa 16,8 g/L NaHCO<sub>3</sub>;

Công thức 2 (CT2) : Môi trường Zarrouk có chứa 11 g/L NaHCO<sub>3</sub>;

Công thức 3 (CT3): Môi trường Zarrouk có chứa 4 g/L NaHCO<sub>3</sub>;

Công thức 4 (CT4): Môi trường Zarrouk có chứa 1,36 g/L NaHCO<sub>3</sub> + 2 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Môi trường Zarrouk cải tiến).

Các thí nghiệm được theo dõi trong 20 ngày. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần.

**Thí nghiệm 3:** Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO<sub>3</sub> trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> tinh khiết lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8

Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ NaHCO<sub>3</sub> trong điều kiện sục nguồn CO<sub>2</sub>

ting khiết lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối của *Spirulina platensis* SP8, nuôi *S. platensis* SP8 trong nuôi trồng thử nghiệm trong các ống thủy tinh hình trụ 1 lít có chiều cao 412 mm, đường kính 60mm. Tỷ lệ cấp giống ban đầu là 0,15 g/L SKK. Môi trường nuôi cấy là Zarrouk 16,8 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 11 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 4 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 1,36 g/l NaHCO<sub>3</sub> + 2 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;

Mỗi công thức thí nghiệm được sục CO<sub>2</sub> – pure 5 % với tốc độ sục khí 0,1 L/phút trong thời gian 1 giờ có kết hợp với sục không khí sạch (có 0,032% CO<sub>2</sub>) với tốc độ sục khí 1,2 L/phút trong thời gian 8h; Cường độ ánh sáng là 5000 lux với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày được cấp bởi các đèn huỳnh quang công suất 40 Wat. Nhiệt độ nuôi là 30°C. Thí nghiệm được theo dõi trong vòng 20 ngày. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần.

## 2.4. Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu

### 2.4.1. Xác định tốc độ sinh trưởng

Sinh trưởng của các mẫu vi tảo *Spirulina platensis* được đánh giá thông qua các thông số: đo OD<sub>445nm</sub> hoặc sinh khối khô (SKK, g/L) ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau.

Xác định mật độ quang ở bước sóng 445 nm: MĐTB vi tảo trong môi trường có thể được xác định gián tiếp nhờ phương pháp đo OD<sub>445nm</sub> trên máy quang phổ UV-Vis. Theo phương pháp này, số lượng photon ánh sáng bị hấp thụ tỉ lệ thuận với lượng sinh khối tế bào trong mẫu đo (trừ những mẫu có nồng độ tế bào quá đậm đặc), hay nói cách khác là trong những điều kiện sinh trưởng nhất định thì OD tỉ lệ thuận với mật độ tế bào. Đối với mỗi lần đo, thu 3,5 ml dịch tảo, đo OD. Trong quá trình đo, nếu giá trị OD > 1,0 thì cần pha loãng dịch tảo sao cho OD luôn ≤ 1,0.

Xác định sinh khối khô:

Sinh khối khô vi tảo (SKK, g/L) được tính theo phương pháp sấy khô mẫu ở 105°C được tiến hành như sau:

Bước 1: Sấy cốc cân ở 105°C trong 3h. Lấy cốc ra để nguội trong silicator (trong 30 phút). Cân khối lượng cốc và lặp lại cho đến khi khối lượng cốc không đổi, được m<sub>1</sub> (g).

Bước 2: Lấy 50 ml dịch vi tảo cho vào cốc đã sấy ở bước 1 và sấy tiếp ở 105°C trong 24 giờ, lấy ra để nguội trong silicator (30 phút), cân khối lượng cốc và sinh khối. Lặp lại quá trình sấy đến khối lượng không đổi được m<sub>2</sub> (g). Tiến hành tương tự với 50 ml môi trường nuôi (không có vi tảo) được m<sub>3</sub> (g).

Bước 3: Tính trọng lượng khô của vi tảo theo công thức sau:

$$\text{SKK (g/L)} = [(m_2 - m_1) - (m_3 - m_1)] * 1000/50$$

Trong đó:  $(m_2 - m_1)$  là khối lượng khô của (sinh khối vi tảo + môi trường)

$(m_3 - m_1)$  là khối lượng khô của môi trường

#### **2.4.2. Phương pháp tách chiết PHB**

PHB được tách chiết từ sinh khối khô *Spirulina platensis* bằng dung môi chloroform sau đó thực hiện phản ứng giải trùng ngưng trong môi trường axit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ở nhiệt độ 100°C, trong thời gian 10 phút để chuyển PHB thành axit crotonic, sau đó phân tích trên máy *UV-VIS* ở bước sóng 235 nm.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ KẾT LUẬN

#### 3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ CO<sub>2</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8

Trong nghiên cứu này trình bày ảnh hưởng của nồng độ CO<sub>2</sub> lên hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào *Spirulina platensis* SP8 theo thời gian trong điều kiện sục không khí

*Bảng 3.1. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục không khí*

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C(g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	6	0,40	0,14
1	0,17	0,06	7	0,47	0,16
2	0,19	0,07	8	0,55	0,19
3	0,23	0,08	9	0,63	0,22
4	0,28	0,09	10	0,71	0,24
5	0,33	0,11			

Từ bảng 3.1 nhận thấy sinh khối khô và hàm lượng PHB trong điều kiện sục không khí tăng dần sau 10 ngày theo dõi. Sinh khối khô trong 5 ngày đầu khá ít kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào chưa nhiều. Trong các ngày tiếp theo sinh khối khô đã tăng hơn so với 5 ngày đầu nhưng chưa rõ rệt, do đó hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào cũng khá ít ỏi.

*Bảng 3.2. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 1%*

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	6	0,51	0,18
1	0,16	0,06	7	0,64	0,22
2	0,19	0,07	8	0,76	0,26
3	0,24	0,08	9	0,88	0,30
4	0,31	0,11	10	0,98	0,34
5	0,40	0,14			

Từ bảng 3.2 sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 1% nhận thấy sinh khối khô và hàm lượng PHB trong điều kiện sục không khí tăng dần theo thời gian nuôi. Sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy cao hơn so với trường hợp sục không khí nhưng chưa rõ rệt.



*Bảng 3.3. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 2%*

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	6	0,65	0,22
1	0,16	0,06	7	0,78	0,27
2	0,20	0,07	8	0,91	0,32
3	0,30	0,11	9	1,01	0,35
4	0,40	0,14	10	1,09	0,38
5	0,52	0,18			

Từ bảng 3.3 sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 2% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu tiên là 0,15 g/l, sau 5 ngày là 0,52g/l tăng gấp 3,5 lần so với ngày đầu và sau 10 ngày là 1,09g/l tăng gấp 2 lần so với ngày thứ 5.

*Bảng 3.4. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 5%*

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	6	0,69	0,24
1	0,16	0,06	7	0,83	0,29
2	0,21	0,07	8	0,97	0,34
3	0,32	0,11	9	1,07	0,37
4	0,43	0,15	10	1,14	0,40
5	0,56	0,19			

Từ bảng 3.4 sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 5% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu là 0,15g/l, ở ngày thứ 5 là 0,56 g/l tăng 3,7 lần so với ngày đầu tiên và ở ngày thứ 10 là 1,14g/l tăng 2 lần so với ngày thứ 5.

*Bảng 3.5. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 10%*

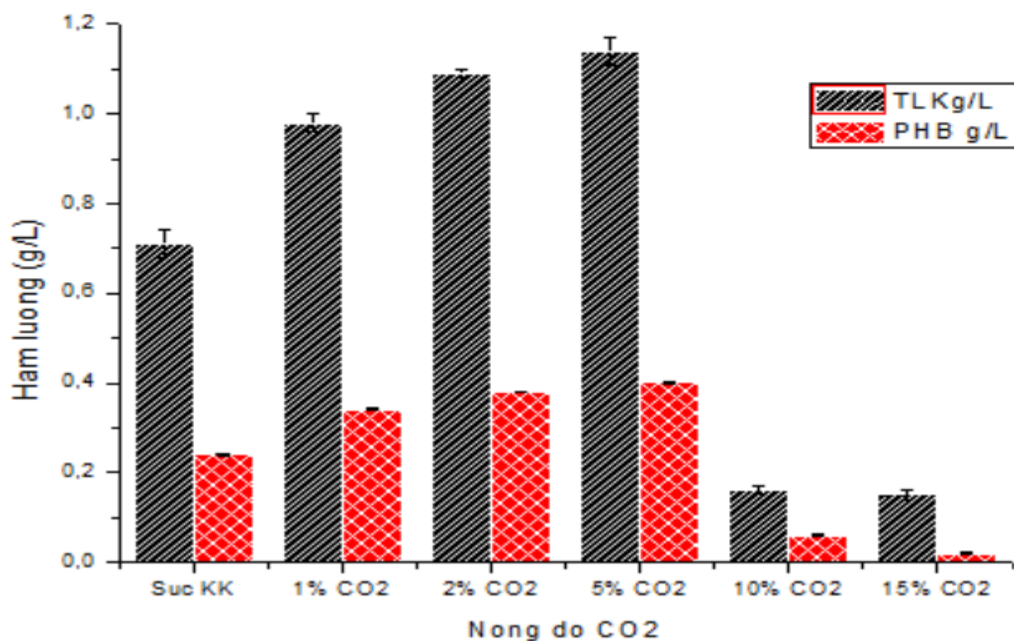
Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,150	0,05	6	0,159	0,05
1	0,151	0,05	7	0,160	0,06
2	0,153	0,05	8	0,160	0,06
3	0,154	0,05	9	0,162	0,06
4	0,156	0,05	10	0,163	0,06
5	0,158	0,05			

Từ bảng 3.5 sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 10% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu là 0,15g/l, ở ngày thứ 5 là 0,158 g/l tăng 1,05 lần so với ngày đầu tiên và ở ngày thứ 10 là 0,163g/l tăng 1,03 lần so với ngày thứ 5.

Bảng 3.6. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 15%

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05
1	0,15	0,05
2	0,15	0,05
3	0,15	0,04
4	0,15	0,03
5	0,15	0,03
6	0,15	0,02

Từ bảng 3.6 sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện sục CO<sub>2</sub> 15% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu là 0,15g/l, ở ngày thứ 6 là 0,15 g/l. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được của 5 ngày sau không có sự thay đổi so với 5 ngày đầu.



**Hình 3. Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ CO<sub>2</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8**

Như vậy nhìn vào biểu đồ ta nhận thấy trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ CO<sub>2</sub> lên khả năng tích lũy PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8. Nồng

độ CO<sub>2</sub> 1-5% thì tảo phát triển tốt, SKK và PHB cao, nồng độ CO<sub>2</sub> 10-15% tảo phát triển kém, SKK và PHB sản sinh ra không thay đổi so với ban đầu. Do khi sục CO<sub>2</sub> 10-15% kéo theo PH của môi trường thấp dẫn tới tảo phát triển kém.

### 3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO<sub>3</sub> lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8

Bảng 3.7. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 16,8 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục không khí

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	11	0,80	0,28
1	0,16	0,06	12	0,90	0,31
2	0,19	0,07	13	0,97	0,34
3	0,22	0,08	14	1,01	0,35
4	0,27	0,09	15	1,05	0,36
5	0,33	0,11	16	1,10	0,38
6	0,39	0,14	17	1,15	0,40
7	0,47	0,16	18	1,19	0,41
8	0,54	0,19	19	1,24	0,43
9	0,62	0,22	20	1,26	0,44
10	0,71	0,24			

Từ bảng 3.7 sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong với nồng độ 16,8 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục không khí nhận thấy sinh khối trong ngày đầu là 0,15g/l, ở ngày thứ 10 là 0,71 g/l tăng 4,7 lần so với ngày đầu tiên và ở ngày thứ 20 là 1,26 g/l tăng 1,7 lần so với ngày thứ 5. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được trong 5 ngày đầu khá nhiều và 5 ngày sau giảm so với 5 ngày đầu. Từ sự thay đổi của sinh khối khô kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong ngày thứ 5 cũng tăng gấp 4,7 lần so với ngày đầu và ngày thứ 10 gấp 1,7 lần so với ngày thứ 5. Do vậy từ bảng số liệu trên ta nhận thấy sự phát triển của tảo 5 ngày đầu khá nhiều và sau 5 ngày tiếp thì kém dần dẫn tới sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong điều kiện nồng độ 16,8 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục không khí cũng là điều kiện tốt để tảo sinh trưởng và phát triển.

Bảng 3.8. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 11 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục không khí

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	11	0,68	0,24
1	0,16	0,06	12	0,77	0,27
2	0,18	0,06	13	0,86	0,30
3	0,21	0,07	14	0,93	0,32
4	0,24	0,08	15	0,99	0,34
5	0,28	0,10	16	1,04	0,36
6	0,33	0,12	17	1,08	0,37
7	0,39	0,14	18	1,10	0,38
8	0,46	0,16	19	1,12	0,39
9	0,53	0,18	20	1,13	0,39
10	0,60	0,21			

Từ bảng 3.8 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 11 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục không khí nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu tiên là 0,15g/l, sau 5 ngày là 0,28 g/l gấp 1,8 lần so với ngày đầu và sau 10 ngày là 0,60 g/l tăng gấp 2,1 lần so với ngày thứ 5. Sau 20 ngày là 1,13 g/l tăng gấp 1,8 lần so với ngày thứ 10. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được của 5 ngày sau tăng so với 5 ngày đầu, nhưng sinh khối thu được của 10 ngày sau giảm so với 10 ngày đầu. Từ sự thay đổi của sinh khối khô thì kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong ngày thứ 5 cũng gấp 1,8 lần so với ngày đầu, ngày thứ 10 gấp 2,1 lần so với ngày thứ 5 và ngày thứ 20 gấp 1,8 lần so với ngày thứ 10. Do vậy từ bảng số liệu ta nhận thấy sự phát triển của tảo trong 10 ngày đầu khá nhiều và sau 10 ngày tiếp theo thì giảm dần dẫn tới sinh khối khô và hàm lượng PHB cũng bị ảnh hưởng.

*Bảng 3.9 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 4 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục không khí*

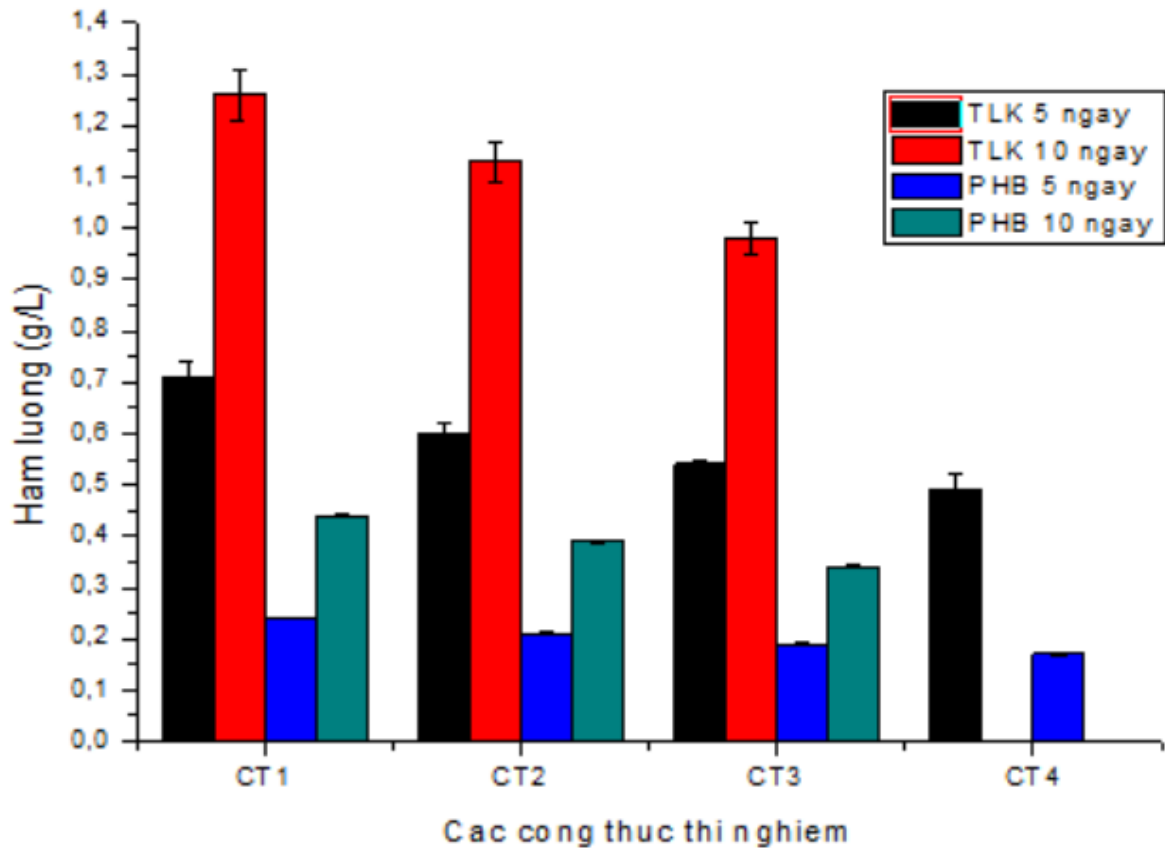
Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	11	0,60	0,21
1	0,16	0,06	12	0,66	0,23
2	0,17	0,06	13	0,71	0,25
3	0,19	0,07	14	0,76	0,26
4	0,22	0,08	15	0,80	0,28
5	0,26	0,09	16	0,84	0,29
6	0,31	0,11	17	0,88	0,30
7	0,36	0,12	18	0,91	0,32
8	0,42	0,14	19	0,95	0,33
9	0,48	0,17	20	0,98	0,34
10	0,54	0,19			

Từ bảng 3.9 sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian trong với nồng độ 4 g/L NaHCO<sub>3</sub> NaHCO<sub>3</sub> + sục không khí nhận thấy sinh khối khô và hàm lượng PHB trong điều kiện sục không khí tăng dần sau 20 ngày theo dõi. Sinh khối khô trong 10 ngày đầu tăng khá ít do đó hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào chưa có sự thay đổi nhiều, trong 10 ngày tiếp theo sinh khối khô đã tăng so với 10 ngày đầu tuy nhiên chậm và chưa rõ ràng. Do đó hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào đã nhiều hơn 10 ngày đầu theo dõi nhưng sự tích lũy chưa có sự thay đổi nhiều.

*Bảng 3.10. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 1,36 g/L NaHCO<sub>3</sub> + 2 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + sục không khí*

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	6	0,30	0,10
1	0,16	0,06	7	0,35	0,12
2	0,17	0,06	8	0,41	0,14
3	0,19	0,07	9	0,46	0,16
4	0,22	0,08	10	0,49	0,17
5	0,26	0,09	11	0,50	0,17

Từ bảng 3.10 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 1,36 g/L  $\text{NaHCO}_3$  + sục không khí nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu tiên là 0,15g/l, sau 5 ngày là 0,26 g/l gấp 1,7 lần so với ngày đầu và sau 10 ngày là 0,49 g/l tăng gấp 1,9 lần so với ngày thứ 5. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được của 5 ngày sau tăng so với 5 ngày đầu và của 10 ngày sau tăng so với 5 ngày đầu. Từ sự thay đổi của sinh khối khô thì kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong ngày thứ 5 cũng gấp 1,7 lần so với ngày đầu, ngày thứ 10 gấp 1,8 lần so với ngày thứ 5.



**Hình 4. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8**

Như vậy nhìn vào biểu đồ ta nhận thấy trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  lên khả năng tích lũy PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8 thì ở cả 4 nồng độ sục không khí thì tảo đều phát triển tốt. Tuy nhiên ở những nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  thấp : 4g/l hoặc 1,36g/l thì cần thu hoạch sớm do sau 10 ngày nguồn dinh dưỡng bị hết đòi hỏi cần cung cấp nguồn C. Điều này gợi mở cho chúng tôi nghiên cứu tiếp theo: sục  $\text{CO}_2$  và giảm nồng độ  $\text{NaHCO}_3$ .

### 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ $\text{NaHCO}_3$ trong điều kiện sục 5% $\text{CO}_2$ tinh khiết lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8

Bảng 3.11. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 16,8 g/L  $\text{NaHCO}_3$  + sục  $\text{CO}_2$  5%

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	11	1,22	0,42
1	0,16	0,06	12	1,30	0,45
2	0,21	0,07	13	1,38	0,48
3	0,32	0,11	14	1,46	0,50
4	0,43	0,15	15	1,53	0,53
5	0,56	0,19	16	1,61	0,56
6	0,69	0,24	17	1,69	0,58
7	0,83	0,29	18	1,76	0,61
8	0,97	0,34	19	1,84	0,63
9	1,07	0,37	20	1,92	0,66
10	1,15	0,40			

Từ bảng 3.11 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 16,8 g/L  $\text{NaHCO}_3$  + sục  $\text{CO}_2$  5% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu tiên là 0,15g/l, sau 5 ngày là 0,56 g/l gấp 3,7 lần so với ngày đầu và sau 10 ngày là 1,15 g/l tăng gấp 2,1 lần so với ngày thứ 5. Sau 20 ngày là 1,92 g/l tăng gấp 1,7 lần so với ngày thứ 10. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được của 10 ngày sau giảm so với 10 ngày đầu. Từ sự thay đổi của sinh khối khô thì kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong ngày thứ 5 cũng gấp 3,7 lần so với ngày đầu, ngày thứ 10 gấp 2,1 lần so với ngày thứ 5 và ngày thứ 20 gấp 1,7 lần so với ngày thứ 10.

Bảng 3.12. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 11 g/L  $\text{NaHCO}_3$  + sục  $\text{CO}_2$  5%

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	11	1,46	0,51
1	0,16	0,06	12	1,60	0,55
2	0,22	0,08	13	1,72	0,59
3	0,32	0,11	14	1,82	0,63
4	0,43	0,15	15	1,89	0,65
5	0,54	0,19	16	1,96	0,68
6	0,67	0,23	17	2,02	0,70
7	0,80	0,28	18	2,07	0,72
8	0,96	0,33	19	2,11	0,73
9	1,13	0,39	20	2,09	0,72
10	1,31	0,45			

Từ bảng 3.12 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 11 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục sục CO<sub>2</sub> 5% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu tiên là 0,15g/l, sau 5 ngày là 0,54 g/l gấp 3,6 lần so với ngày đầu và sau 10 ngày là 1,31 g/l tăng gấp 2,4 lần so với ngày thứ 5. Sau 20 ngày là 2,09 g/l tăng gấp 1,6 lần so với ngày thứ 10. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được của 15 ngày sau giảm so với 5 ngày đầu. Từ sự thay đổi của sinh khối khô thì kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong ngày thứ 5 cũng gấp 3,6 lần so với ngày đầu, ngày thứ 10 gấp 2,4 lần so với ngày thứ 5 và ngày thứ 20 gấp 1,6 lần so với ngày thứ 10.

*Bảng 3.13. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 4 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục sục CO<sub>2</sub> 5%*

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	11	1,48	0,51
1	0,17	0,06	12	1,59	0,55
2	0,22	0,08	13	1,69	0,58
3	0,32	0,11	14	1,78	0,62
4	0,43	0,15	15	1,87	0,65
5	0,57	0,20	16	1,95	0,67
6	0,75	0,26	17	2,02	0,70
7	0,94	0,32	18	2,08	0,72
8	1,10	0,38	19	2,13	0,74
9	1,24	0,43	20	2,19	0,75
10	1,37	0,47			

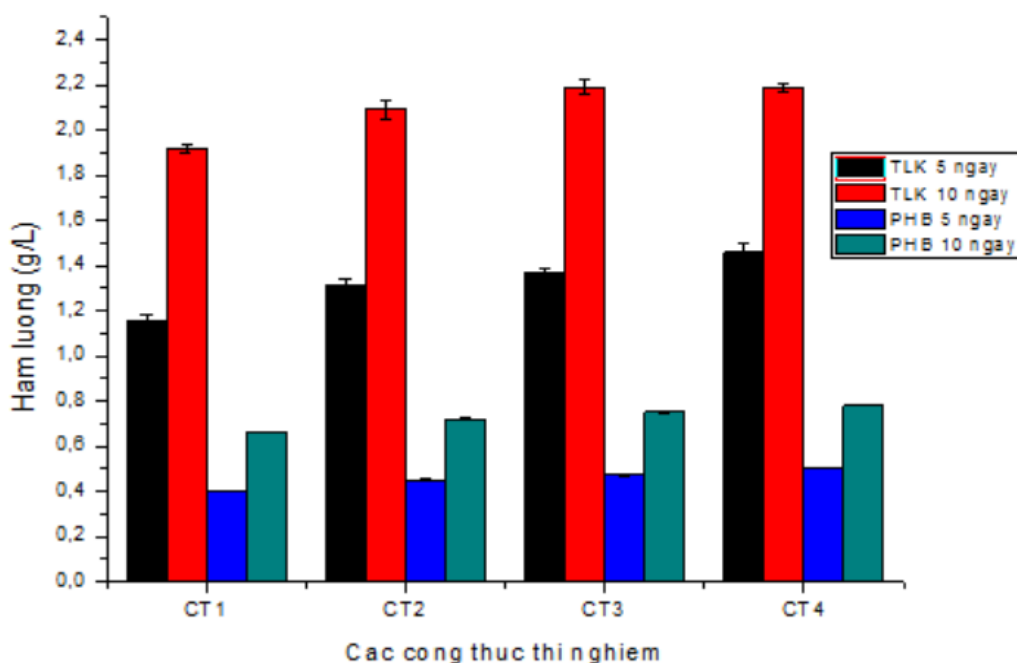
Từ bảng 3.13 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 4 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục sục CO<sub>2</sub> 5% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu tiên là 0,15g/l, sau 5 ngày là 0,57 g/l gấp 3,8 lần so với ngày đầu và sau 10 ngày là 1,37 g/l tăng gấp 2,4 lần so với ngày thứ 5. Sau 20 ngày là 2,19 g/l tăng gấp 1,6 lần so với ngày thứ 10. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được của 15 ngày sau giảm so với 5 ngày đầu. Từ sự thay đổi của sinh khối khô thì kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong ngày thứ 5 cũng gấp 3,8 lần so với ngày đầu, ngày thứ 10 gấp 2,4 lần so với ngày thứ 5 và ngày thứ 20 gấp 1,6 lần so với ngày thứ 10.



Bảng 3.14. Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 1,36 g/L NaHCO<sub>3</sub> + 2g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + sục CO<sub>2</sub> 5%

Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)	Thời gian (ngày)	TLK C (g/l)	PHB (g/g)
0	0,15	0,05	11	1,71	0,59
1	0,16	0,06	12	1,97	0,68
2	0,21	0,07	13	2,19	0,76
3	0,28	0,10	14	2,36	0,81
4	0,37	0,13	15	2,36	0,81
5	0,48	0,17	16	2,36	0,81
6	0,63	0,22	17	2,36	0,81
7	0,80	0,28	18	2,31	0,80
8	0,99	0,34	19	2,27	0,78
9	1,20	0,42	20	2,19	0,78
10	1,46	0,50			

Từ bảng 3.14 Sự thay đổi sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào theo thời gian với nồng độ 1,36 g/L NaHCO<sub>3</sub> + sục sục CO<sub>2</sub> 5% nhận thấy sinh khối khô trong ngày đầu tiên là 0,15g/l, sau 5 ngày là 0,48 g/l gấp 3,2 lần so với ngày đầu và sau 10 ngày là 1,46 g/l tăng gấp 3,0 lần so với ngày thứ 5. Sau 20 ngày là 2,19 g/l tăng gấp 1,5 lần so với ngày thứ 10. Ta nhận thấy sinh khối khô thu được của 5 ngày sau giảm so với 10 ngày đầu. Từ sự thay đổi của sinh khối khô thì kéo theo hàm lượng PHB tích lũy trong ngày thứ 5 cũng gấp 3,2 lần so với ngày đầu, ngày thứ 10 gấp 3,0 lần so với ngày thứ 5 và ngày thứ 20 gấp 1,5 lần so với ngày thứ 10.



Hình 5. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaHCO<sub>3</sub> trong điều kiện sục 5% CO<sub>2</sub> tinh khiết lên khả năng tích lũy hàm lượng PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8

Như vậy nhìn vào biểu đồ ta nhận thấy trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  lên khả năng tích lũy PHB trong sinh khối *Spirulina platensis* SP8 khi sục  $\text{CO}_2$  thì PHB và SKK thu được ở các nồng độ  $\text{NaHCO}_3$  thấp gần như tương đương  $\text{NaHCO}_3$  ở nồng độ cao. Do vậy có thể lựa chọn điều kiện nuôi tảo ở nồng độ  $1,36\text{g/l NaHCO}_3 + 2\text{g Na}_2\text{CO}_3 + \text{sục CO}_2 5\%$ .

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. Kết luận

Trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học “ Bước đầu nghiên cứu sử dụng CO<sub>2</sub> để nuôi tảo *Spirulina platensis* nhằm sản xuất *Polyhydroxybutyrate* ” nhóm nghiên cứu đã thu được những kết quả sau:

Sinh khối khô của tảo có thể sử dụng để sản xuất chất dẻo polyme sinh học từ việc sử dụng CO<sub>2</sub> để nuôi tảo. Hàm lượng PHB đạt cực đại ở các điều kiện: nồng độ 1,36g/L NaHCO<sub>3</sub> + 2g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + sục CO<sub>2</sub> – pure nồng độ 5%, tốc độ sục khí 0,1 L/phút trong thời gian 1 giờ có kết hợp với sục không khí sạch (có 0,032% CO<sub>2</sub>) với tốc độ sục khí 1,2 L/L/phút trong thời gian 8h; cường độ ánh sáng là 5000 lux với thời gian chiếu sáng 8 giờ/ ngày được cấp bởi các đèn huỳnh quang công suất 40 Wat, nhiệt độ tối ưu là 30<sup>0</sup>C.

### 2. Kiến nghị

- Cần tiếp tục nghiên cứu sâu đối với các nguồn CO<sub>2</sub> từ khí thải.
- Đưa mô hình vào ứng dụng thực tế.

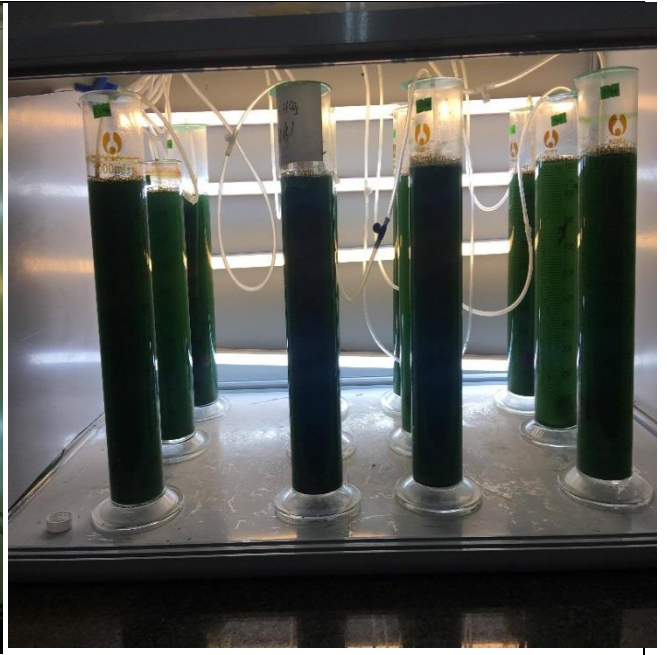
## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adrianna Mika, 2016. Polyhydroxybutyrate Production in a Photobioreactor Using *Spirulina Platensis*. The University of Western Ontario.
2. Luận văn Nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật và vi tảo lam *Spirulina* trong xử lý nước thải làng nghề bún Phú Đô.
3. Thạch Thị Mộng Hằng, (2015). “Nghiên cứu các thành phần dinh dưỡng và một số yếu tố môi trường thích hợp trong nuôi tảo *Spirulina platensis* tại Trà Vinh”. Luận văn tốt nghiệp Đại học. Chuyên ngành Nuôi trồng Thủy sản. Trường Đại học Trà Vinh.
4. Đặng Đình Kim, Đặng Hoàng Phước Hiền (1999). Công nghệ Sinh học Vi tảo. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội.
5. Đặng Đình Kim (2015). Nghiên cứu công nghệ sử dụng khí thải đốt than để sản xuất sinh khối vi tảo có giá trị dinh dưỡng. Đề tài cấp nhà nước. Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. KC.08.08/11-15.
6. Vũ Thành Lâm (2006). Nuôi trồng tảo *Spirulina*. Trung tâm Công nghệ Sinh học Đại học Quốc gia Hà Nội.

## PHỤ LỤC HÌNH ẢNH



A. Sinh trưởng của chủng *Spirulina platensis* nuôi cấy trong các môi trường Zarrouk (trước khi nuôi cấy)



B. Sinh trưởng của chủng *Spirulina platensis* nuôi cấy trong các môi trường Zarrouk (sau 20 ngày khi nuôi cấy)

**Hình 6. Sinh trưởng của chủng *Spirulina platensis* nuôi cấy trong các môi trường Zarrouk**