

Harvesting of *Chlorella vulgaris* grown in closed-photobioreactor with chitosan for use in food

Vinh T.*, Vy T. Truong, Tu T. C. Ho, Dat Q. Nguyen, & Thuy T. T. Nguyen
Department of Chemical Engineering, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research paper

Received: March 05, 2018

Revised: April 03, 2018

Accepted: April 09, 2018

Keywords

Chitosan

Chlorella vulgaris

Flocculation

Functional food

Photobioreactor

*Corresponding author

Trương Vinh

Email: tv@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Chlorella vulgaris was cultured in chemostat mode and harvested on a semi-continuous basis with 50% of broth volume every two days, giving the highest biomass yield. The flocculation efficiency of microalgae using chitosan depended on dose use, quality of chitosan such as degree of deacetylation (DD) and solubility. The flocculation efficiency was 99% after 30 minute, and 95% after 10 minute for DD of 87% and 89.8%, respectively. *Chlorella vulgaris* grown in 500 liter-tubular photobioreactor using Basal medium was harvested semi-continuously by three washing times in 2% acetic acid following chitosan flocculation to obtain clean biomass with lower 2% chitosan content (w/w). Analysis of physicochemical composition of algal biomass showed no heavy metal, reaching microbiological criteria, containing outstanding natural nutrients such as protein, lipid, chlorophyll superior to some other food materials. These nutrients are the essential components for human body, suitable for functional food application.

Cited as: Truong, V., Truong, V. T., Ho, T. T. C., Nguyen, D. Q., & Nguyen, T. T. T. (2018). Harvesting of *Chlorella vulgaris* grown in closed-photobioreactor with chitosan for use in food. *The Journal of Agriculture and Development* 17(4), 102-111.

Thu hoạch tảo *Chlorella vulgaris* nuôi trong hệ thống quang hợp tuần hoàn kín bằng chitosan để ứng dụng trong thực phẩm

Trương Vĩnh*, Trương Thảo Vy, Hồ Thị Cẩm Tú,
Nguyễn Quốc Đạt & Nguyễn Thị Thanh Thúy

Bộ Môn Công Nghệ Hóa, Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 05/03/2018

Ngày chỉnh sửa: 03/04/2018

Ngày chấp nhận: 09/04/2018

Từ khóa

Chitosan

Chlorella vulgaris

Kết tụ

Thiết bị quang hợp sinh học

Thực phẩm chức năng

*Tác giả liên hệ

Trương Vĩnh

Email: tv@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Tảo *Chlorella vulgaris* nuôi trong trạng thái hóa tính và thu hoạch theo qui trình bán liên tục 2 ngày/lần với lượng thu 50% thể tích nuôi, cho năng suất sinh khối cao nhất. Thu hoạch tảo bằng chitosan cho thấy hiệu suất lắng phụ thuộc liều dùng, chất lượng chitosan là độ deacetyl (DD) và độ hòa tan. Ở DD 87% hiệu suất lắng đạt 99% sau 30 phút, và ở DD 89,8% hiệu suất lắng là 95% sau 10 phút. Tảo *Chlorella vulgaris* nuôi trong thiết bị quang hợp tuần hoàn kiểu ống 500 lít bằng môi trường Basal, được thu hoạch bán liên tục, lắng bằng chitosan và rửa 3 lần bằng dịch acid acetic 2% thu được sinh khối sạch với hàm lượng chitosan dưới 2% (w/w). Phân tích thành phần hóa lý sinh khối tảo cho thấy không có kim loại nặng, đạt chỉ tiêu vi sinh, có chứa các dưỡng chất từ thiên nhiên vượt trội so với một số loại nguyên liệu thực phẩm khác như đạm, béo, chlorophyll... đây là những thành phần rất cần thiết cho cơ thể con người, phù hợp làm thực phẩm chức năng.

1. Đặt Vấn Đề

Chlorella là một chi của tảo xanh đơn bào, thuộc ngành Chlorophyta. *Chlorella* có dạng hình cầu, đường kính khoảng 2 - 10 μm và không có tiên mao. *Chlorella* có màu xanh lá cây nhờ sắc tố quang hợp chlorophyll-a và b trong lục lạp. *Chlorella* đã được sử dụng rộng rãi làm thực phẩm chức năng do giàu protein, vitamins, khoáng, và các amino acids thiết yếu. So sánh với nhiều nguồn thực phẩm cho thấy *Chlorella vulgaris* giàu protein hơn đậu nành, sữa, trứng, gạo, thịt và men bánh mì (Becker, 1994). Hiện nay *Chlorella vulgaris* đã được dùng làm màu thực phẩm, chất chống oxy hóa, và chất điều vị. Việc sử dụng tảo *C. vulgaris* là an toàn theo tiêu chuẩn của Hiệp hội thực phẩm và thuốc của Mỹ- FDA (Carlson, 2011).

Tảo có thể nuôi trong ao, bể kiểu kênh (raceway) hay thiết bị quang hợp sinh học (photobioreactor-PBR). Nuôi ao hay bể kiểu kênh

rẻ tiền hơn thiết bị PBR vì ít chi phí xây dựng và hoạt động, tuy nhiên năng suất thấp hơn, tiêu hao nhiều CO₂ do bốc hơi nhiều nước, dễ nhiễm vi sinh vật lạ và tảo khác (Chisti, 2007). Ngược lại, PBR cho năng suất sinh khối cao hơn, hoạt động kín nên khó nhiễm tạp, ít bốc hơi nước nên dùng CO₂ hiệu quả (Ugwu, 2008). Hệ thống PBR kiểu ống tuần hoàn kín được dùng rộng rãi trên thế giới. Hệ thống PBR giá rẻ được Bộ môn Công nghệ Hóa học Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM phát triển với nhiều thể tích khác nhau từ 170 lít cho sinh khối 0,67 g/L (Truong, 2010), cho đến 400 lít-28000 lít (Truong, 2013) sẽ được dùng trong nghiên cứu này để sản xuất tảo sạch.

Tảo *Chlorella vulgaris* có kích thước rất nhỏ (2-10 μm) nên khó thu hoạch. Ngoài ra, sinh khối tảo thấp (0,5-0,8 g/L) nên thu hoạch tốn năng lượng nếu dùng phương pháp ly tâm (Beuckel& ctv., 2013). Nếu dùng phương pháp lắng bằng kết tụ thì sẽ giảm được giá thành do chỉ cần lắng tự nhiên (Uduman & ctv., 2010). Phương pháp kết

tụ dựa trên nguyên lý phá vỡ lực đẩy tĩnh điện giữa các tế bào tảo bằng cách dùng một ion kim loại hay polymer điện tích dương để trung hòa lực tĩnh điện dẫn đến phát huy lực van de Waals liên kết các tế bào và lắng chúng xuống (Henderson & ctv., 2008). Thu hoạch tảo bằng các ion kim loại như Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} được sử dụng nhiều trong việc dùng tảo làm nhiên liệu sinh học (Henderson & ctv., 2008; Vandamme & ctv., 2011). Tuy nhiên khi sử dụng cho thực phẩm, các ion kim loại liên kết với tảo lúc thu hoạch sẽ khó xử lý vì chúng ở dạng kết tủa của muối phosphat như $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ hoặc $\text{Mg}_2(\text{PO}_4)_3$ do trong môi trường nuôi tảo có phosphorus. Ngoài ra, cần một lượng lớn hóa chất để lắng, ví dụ Papazi & ctv. (2010) dùng 1000 mg/L muối $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ sau 6 giờ chỉ lắng được 60% tảo. Do vậy, sử dụng một polymer tự nhiên như chitosan sẽ dễ dàng xử lý hơn do chitosan không độc hại và lượng dùng sẽ ít hơn, ví dụ với 120 mg/L chitosan lắng được 92% tảo trong 3 phút (Rashid & ctv., 2013).

Chitosan có nhiều trong tự nhiên và được sản xuất từ vỏ của loài giáp xác. Chitosan có nhiều đặc tính ưu việt như phân hủy sinh học, thích ứng sinh học, tính hấp thụ và không độc hại nên được dùng nhiều trong công nghiệp thực phẩm (Dutta & ctv., 2004; Zuidam & Nedovic, 2010). Chitosan là chất đa điện phân có điện tích dương không vĩnh cửu. Đặc tính của chitosan phụ thuộc vào khối lượng phân tử và độ deacetyl (DD). Chitosan có đặc tính kiềm và chỉ tan trong acid khi DD > 60% (Zuidam & Nedovic, 2010). Nhờ điện tích dương của chitosan (nhóm amino NH_2^+) sẽ trung hòa điện tích âm trên bề mặt tảo dẫn đến lắng tảo.

Chitosan dùng lắng tảo chỉ có hiệu quả với DD cao. Tác giả Lavoie & de la Noüe (1983) sử dụng chitosan nồng độ 20 mg/L lắng tảo *Scenedesmus* sp. đạt hiệu suất 99% trong 15 phút với DD là 80%. Tác giả Rashid & ctv. (2013) dùng chitosan của hãng Sigma chất lượng cao. Khi ứng dụng trong nước với mong muốn giá thành rẻ, ta có thể dùng các nguồn chitosan của Trung Quốc hoặc Việt nam sản xuất, nhưng khó hòa tan ngay cả với acid acetic 2% (Truong & ctv., 2017). Thông thường các mặt hàng này trên thị trường không ghi rõ độ DD của sản phẩm. Thực tế các nghiên cứu trên thế giới chỉ tập trung về ảnh hưởng của nồng độ chitosan, độ pH, nhiệt độ dịch mà không nghiên cứu ảnh hưởng của độ deacetyl lên hiệu suất lắng (Lavoie & de la Noüe, 1983; Morales & ctv., 1985; Rashid & ctv., 2013). Ngoài ra, hiệu

suất lắng còn phụ thuộc liều dùng chất gây lắng ứng với sinh khối tảo. Chẳng hạn Rashid & ctv. (2013) thay đổi liều dùng 3-12% khối lượng chitosan so với khối lượng tảo cho thấy hiệu quả lắng tăng từ 40% đến 92%. Đối với chất gây lắng khác như Mg^{2+} phải tăng nồng độ từ 0,5mM lên 1,5mM tương ứng với sinh khối *Chlorella vulgaris* cần lắng là 0,4 g/L và 0,8 g/L (García-Pérez & ctv., 2013). Các nghiên cứu trong nước không nói rõ chất lượng và liều dùng của chitosan (Ngo, 2016; Tran, 2016). Do vậy, cần khảo sát ảnh hưởng của chất lượng chitosan (DD) và liều dùng lên hiệu suất lắng. Cũng có thể dùng NaOH tăng độ pH để lắng tảo, tuy nhiên trong thời gian 30 phút ở độ pH 10 hầu như không lắng và ở pH 12 chỉ lắng 18% nếu không có sự trợ giúp của Mg^{2+} (García-Pérez & ctv., 2013). Tảo *Chlorella vul.* lắng 95% ở pH 11 nếu thời gian lắng là 2 ngày (Truong, 2013).

Nghiên cứu này khảo sát qui trình sản xuất tảo *Chlorella vulgaris* sạch trên thiết bị quang hợp tuần hoàn kín để có thể sử dụng cho con người. Nội dung bao gồm khảo sát quá trình thu hoạch tảo và lắng tảo bằng chitosan, qui trình rửa sạch tảo, phân tích các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh để bảo đảm thu được tảo sạch làm thực phẩm.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Tảo *Chlorella vulgaris* (giống Bỉ) nuôi theo công thức Bold Basal. Vỏ tôm sú tươi được thu mua tại công ty thủy sản Ba Tri, Bến Tre. Thiết bị quang hợp tuần hoàn kín LCP-400 của Bộ môn Công nghệ Hoá học, trường Đại học Nông lâm TP.HCM.

2.2. Sản xuất chitosan với nhiều độ deacetyl khác nhau

Chitosan với các độ deacetyl khác nhau được sản xuất từ vỏ tôm theo qui trình thông dụng (Marcin, 2002; Zvezdova, 2010). Vỏ tôm tươi sấy khô và xay nhuyễn, sàng qua rây 0,5 mm. Mẫu được khử khoáng (CaCO_3) bằng HCl 2M ở 100°C trong 2 giờ, rửa đến trung hòa và sấy khô, sau đó khử protein và acetyl bằng dung dịch NaOH (tỉ lệ 1:10 w/v) ở các nồng độ, thời gian và nhiệt độ khác nhau, rửa đến trung hòa, ly tâm và sấy khô để thu chitosan có các độ DD khác nhau.

Độ độ deacetyl của mẫu được xác định theo

công thức:

$$DD(\%) = \frac{c-a}{b-a} \cdot 100 \quad (1)$$

Trong đó, c (%) là hàm lượng Nitơ toàn phần trong mẫu chitosan đo bằng Kejl Dahl, a = 6,89% là hàm lượng Nitơ toàn phần trong mẫu chitin tính theo lý thuyết và b = 8,69% là hàm lượng phần trăm Nitơ toàn phần trong mẫu chitosan tính theo lý thuyết.

2.3. Thí nghiệm thu hoạch tảo sạch từ thiết bị quang hợp tuần hoàn kín

Tảo trước khi thu hoạch có pH trong khoảng 8,8-9,5. Theo nghiên cứu của Morales & ctv. (1985), sau khi cho chitosan vào dịch tảo đạt pH tối ưu 7,1 để kết tụ, điều chỉnh pH dịch về 8-9.6 để lắng có hiệu quả thu hoạch 98% không đổi theo pH. Trong nghiên cứu này, chọn điều chỉnh pH về 10 để lắng. Qui trình cụ thể như sau:

Pha chitosan trong dung dịch acid acetic 2% (nồng độ chitosan 1 g/L). Sau đó lấy hỗn hợp vừa pha cho vào dịch tảo (tỉ lệ dịch chitosan:dịch tảo = 1:20, khuấy 30 giây, điều chỉnh pH về 10, để lắng 30 phút và gạn bỏ lớp nước trên, ly tâm 3000 v/p trong 5 phút, rửa sạch bằng nước hoặc dịch acid acetic 2% hai đến ba lần theo tỉ lệ tảo:nước = 1:10 (v/v). Năng suất thu hoạch dạng mẻ được so sánh với dạng bán liên tục cách nhau 2, 3 và 4 ngày với thể tích thu 17%, 33% và 50% thể tích nuôi cho mẻ 1,5 lít trong nhà. Mẫu tối ưu được ứng dụng trên thiết bị kiểu ống tuần hoàn kín nuôi ngoài trời để thu sinh khối, rửa sạch và phân tích thành phần hóa lý.

Công thức tính hiệu suất lắng tảo:

$$H_T(\%) = \frac{OD_{đầu} - OD}{OD_{đầu}} \quad (2)$$

Trong đó: OD_{đầu} và OD là giá trị quang phổ của mẫu tảo ban đầu và sau khi lắng ở bước sóng 780 nm đo bằng thiết bị Spectro UV11 (MRC – Israel).

Xác định hàm lượng chitosan (C_{SL}, mg) hoặc tỉ lệ chitosan (C, %) có trong tảo sau lắng và sau rửa theo các công thức (3) và (4), trong đó C₁ (%) và C₂ (%) theo thứ tự là hàm lượng đạm của mẫu tảo không kết tụ và có kết tụ bằng chitosan, m (mg) là khối lượng tảo trong dịch và 0,0869 là tỉ lệ của N trong Chitosan.

$$C_{SL} = 0,0869 \frac{m(C_2 - C_1)}{100} H_T \quad (3)$$

$$C\% = 0,0869(C_2 - C_1)H_T \quad (4)$$

Độ hòa tan chitosan trong dịch 2% acid acetic được xác định như sau: Cân chính xác 1 gam chitosan hoà tan trong 100 mL dung dịch acid acetic 2%, khuấy đảo 15 phút cho chitosan tan rồi ly tâm 3000 v/p trong 5 phút. Thu lấy phần rắn rồi đem đi sấy khô đến khối lượng không đổi. Hàm lượng chất tan được tính theo công thức:

$$X = \frac{t_1 - t_2}{t_1} \cdot 100 \quad (5)$$

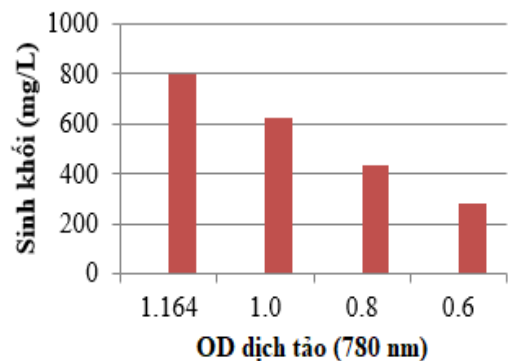
Trong đó X là độ hòa tan của chitosan tạo thành (%), t₁ là khối lượng chitosan đem thí nghiệm (g) và t₂ là khối lượng chitosan còn lại sau khi sấy (g).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Sinh khối tảo theo phương pháp thu hoạch bán liên tục

Sinh khối của tảo được xác định bằng đo quang phổ dịch tảo (OD) ở bước sóng 780nm. Sự tương quan có thể mô tả bằng phương trình hồi qui sau đây (R² = 0,99) với k là hệ số pha loãng dịch tảo, x là OD và y là sinh khối (g/L): y = k(0,404x² + 0,2018x + 0,0183).

Hình 1 là tương quan giữa giá trị OD của dịch tảo và sinh khối tảo (mg/L). Để xác định cách thu hoạch cho năng suất sinh khối cao nhất, các thí nghiệm được thu bằng phương pháp ly tâm.



Hình 1. Tương quan giữa mật độ quang (OD) và sinh khối tảo.

Thí nghiệm trên thể tích nuôi 1,5 lít cho thấy phương pháp nuôi bán liên tục mang lại kết quả khả quan hơn so với dạng mẻ (Bảng 1). Ví dụ

dạng mẻ thu 100% thể tích với chu kỳ nuôi 7 ngày thì thu 3 lần trong 21 ngày được 112,5 mg/ngày; chu kỳ nuôi 10,5 ngày thì thu 2 lần được 116 mg/ngày; chu kỳ nuôi 21 ngày thu 1 lần được 138.1 mg/ngày. Trong lúc nuôi dạng bán liên tục bắt đầu thu sau ngày thứ 7 và tiến hành thu cách nhau 2 ngày với thể tích thu 50% thể tích nuôi (và bù lại 50% dinh dưỡng, thu được 8 lần) là phương pháp tối ưu cho sinh khối (684 mg/ngày) gấp 5 lần so với dạng mẻ ứng cùng số ngày nuôi là 21 ngày. Với các thể tích thu ít hơn (17% và 33%) vẫn cho thấy chu kỳ thu 2 ngày là tốt nhất so với 3 và 4 ngày. Với cùng chu kỳ thu, thể tích thu càng lớn ($\leq 50\%$) càng hiệu quả.

Bảng 1. Trắc nghiệm phân hạng của thí nghiệm 2 yếu tố ngày thu và thể tích thu trong chu kỳ nuôi 21 ngày, thể tích nuôi 1,5 lít¹

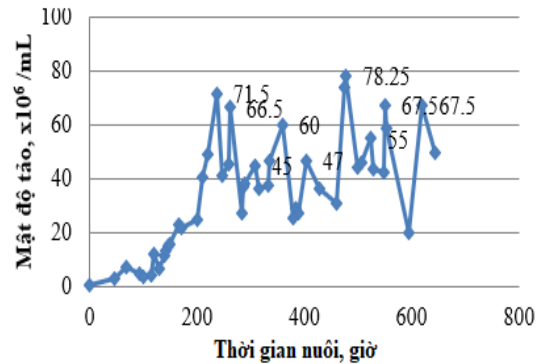
Thể tích thu (%)	Chu kỳ thu (ngày)	Sinh khối (mg/ngày)	SD
17	2	141.9 ^c	13.53
17	3	59.6 ^a	5.72
17	4	55.5 ^a	18.33
33	2	281.7 ^f	38.19
33	3	96.0 ^b	4.00
33	4	67.3 ^a	1.15
50	2	684.0 ^g	10.31
50	3	218.8 ^e	3.03
50	4	175.0 ^d	2.17
100	7	112.5 ^{bc}	18.61
100	10,5	116.0 ^{bc}	2.50
100	21	138.1 ^c	22.89

¹Thí nghiệm lặp lại 3 lần, riêng thể tích thu 100% thì lặp lại 2 lần. Các số liệu có kí hiệu khác nhau thì khác biệt với ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

Phương pháp thu bán liên tục đã được ứng dụng trên các thiết bị nuôi tảo kiểu tuần hoàn kín dạng ống giá rẻ với các thể tích 170 lít, 400 lít, 6000 lít và 28000 lít do Bộ môn Công nghệ Hóa học (Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM) thiết kế chế tạo. Hình 2 là kết quả nuôi tảo *Chlorella vulgaris* trong thiết bị LPC-400 (thể tích 400 lít) điều kiện ngoài trời trong khoảng tháng 3 đến tháng 4 tại Thủ Đức, TP.HCM. Lần thu hoạch đầu tiên là sau 10 ngày nuôi đạt 71,5 triệu tế bào/mL. Với chu kỳ 2 ngày thu 50% thể tích, mật độ tảo thu được trong khoảng 45-78 triệu tế bào/mL.

Do ảnh hưởng của thời tiết ngoài trời, chu kỳ thu không thể cố định 2 ngày. Ví dụ sau hai lần thu đầu, lần thứ 3 phải kéo dài 4 ngày mới có

sinh khối 45 triệu tế bào/mL do trời nhiều mây, ít nắng. Tuy nhiên, đa số các khoảng thu hoạch đều đạt 2 ngày và hệ thống thu hoạch được liên tục trong 1 tháng.



Hình 2. Sự phát triển của tảo *Chlorella vulgaris* trong thiết bị quang hợp tuần hoàn kín dạng ống LPC-400. Mật độ ban đầu là 1 triệu tế bào trong 1 mL.

3.2. Chitosan với các độ deacetyl khác nhau

Chitosan đã được xử lý NaOH với các chế độ thời gian, nhiệt độ và nồng độ khác nhau để cho ra sản phẩm có độ DD khác nhau nhằm phục vụ thí nghiệm lắng (Bảng 2). Độ DD thấp nhất (73,36%) với nồng độ 14M, nhiệt độ 150°C và thời gian 60 phút. Độ DD cao nhất (89,86%) tương ứng với 16M, 160°C và 90 phút. Độ DD càng cao thì độ hòa tan trong acid acetic 2% càng cao. Số liệu cho thấy ở DD trên 88% thì tan hoàn toàn và có thể dự đoán là DD trên 87% sẽ tan hoàn toàn.

3.3. Ảnh hưởng của độ DD và độ hòa tan của chitosan lên hiệu suất lắng tảo

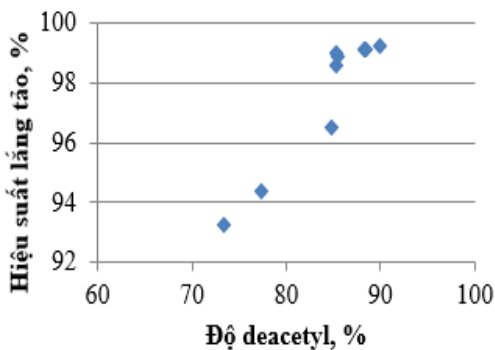
Thí nghiệm trên tảo có OD là 1.164 (sinh khối 800 mg/L) với hàm lượng 50mg chitosan cho 1 lít dịch tảo cho thấy hiệu suất lắng càng cao khi độ deacetyl của chitosan cao (Hình 3). Tuy nhiên hiệu suất lắng và độ deacetyl không có sự tương quan hồi qui. Trong khoảng độ deacetyl dưới 85% thì tương quan có vẻ tuyến tính. Khi độ deacetyl vượt quá 87% thì hiệu suất lắng tăng không đáng kể.

Sự tương quan giữa hàm lượng chitosan hòa tan X (mg/100 mg tảo khô) và hiệu suất lắng tảo Y (%) rất rõ ràng và chặt chẽ (Hình 4) với phương trình hồi qui: $Y = 21,209 X, R^2 = 0,999$

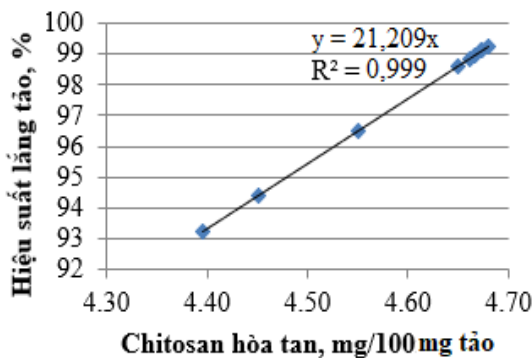
Bảng 2. Ảnh hưởng của các chế độ xử lý NaOH lên độ DD và độ hòa tan của chitosan¹

T, °C	C	t, phút	Deacetyl, %	Độ hòa tan, %
150	14M	60	73,36 ± 0,322	71,58 ± 0,445
150	16M	30	77,34 ± 0,488	79,08 ± 0,560
150	15M	60	84,84 ± 0,166	95,41 ± 0,215
140	16M	90	85,31 ± 0,169	96,54 ± 0,325
150	16M	60	85,31 ± 0,012	97,02 ± 0,116
150	16M	90	88,36 ± 0,332	100,00 ± 0,00
160	16M	90	89,86 ± 0,162	100,00 ± 0,00

¹T: nhiệt độ xử lý NaOH, C: nồng độ NaOH, t: thời gian xử lý NaOH.



Hình 3. Tương quan giữa độ deacetyl của chitosan và hiệu suất lắng tảo.



Hình 4. Tương quan giữa hàm lượng chitosan hòa tan trong dịch tảo và hiệu suất lắng tảo.

($P < 0.05$). Như vậy, hàm lượng dùng chitosan còn phụ thuộc sinh khối tảo. Kết luận này phù hợp với các báo cáo của Rashid & ctv. (2013) thay đổi liều dùng 3-12% khối lượng chitosan so với khối lượng tảo cho thấy hiệu quả lắng tăng từ 40% đến 92%. Hoặc chất gây lắng khác như Mg^{2+} phải tăng nồng độ từ 0.5 mM lên 1.5 mM tương ứng với sinh khối *Chlorella vulgaris* cần

lắng là 0,4 g/L và 0,8 g/L (García-Pérez & ctv., 2013). Hoặc theo Henderson & ctv. (2008) là liều dùng ion sắt hay nhôm cao khi sinh khối tảo cao. Từ lý luận này, ta có thể dùng phương trình hồi qui để tính được hàm lượng chitosan cần thiết để thu hoạch (lắng) 100% tảo là $X = 4,71$ mg cho 100 mg sinh khối tảo.

Ở DD bằng 87% chitosan tan hoàn toàn trong dịch 2% acid acetic và lượng chitosan hòa tan cần dùng tối đa là 37,72 mg ($= 4,71 * 8$) cho 1 lít theo tính toán ở trên. Do vậy, khi sử dụng 50 mg chitosan/L là hoàn toàn dư với các mẫu chitosan có DD $\geq 87\%$, dẫn đến hiệu suất lắng hầu như không đổi. Do vậy, đồ thị tương quan giữa hiệu suất lắng và độ deacetyl có một bước nhảy tại DD = 85-87% ở đó chitosan tan hoàn toàn (Hình 3). Kết quả dùng 37.72 mg chitosan/L dịch tảo có sinh khối 800 mg/L tương đối phù hợp với các tác giả khác. Ví dụ Tran (2016) là 40 mg/L nhưng không cho biết sinh khối, hoặc Morales & ctv. (1985) cũng là 40 mg/L với sinh khối là 80,4 triệu tế bào/mL. Bảng 3 cho kết quả tính toán lượng chitosan cần thiết theo sinh khối tảo và chất lượng chitosan sử dụng để lắng 100% tảo trong 30 phút. Từ đó, việc sử dụng nồng độ chitosan 40 mg/L sẽ phù hợp để lắng với các trường hợp sau: độ DD 75% với sinh khối tối đa 624 mg/L; hoặc độ DD 85% với sinh khối tối đa 800 mg/L.

Chất lượng chitosan sử dụng để lắng thể hiện qua độ deacetyl và độ hòa tan của chitosan trong dịch 2% acid acetic. Độ deacetyl càng cao, hiệu suất lắng càng cao. Điều này có thể giải thích là điện tích dương của chitosan càng cao khi độ deacetyl cao.

Bảng 3 cho thấy hàm lượng chitosan sử dụng phải tăng lên khi sinh khối tảo tăng hoặc khi độ DD giảm. Ví dụ, ở độ deacetyl 75%, khi mật độ quang OD dịch tảo tăng từ 0,6 (sinh khối là 285

Bảng 3. Dự đoán lượng chitosan cần thiết (mg/L dịch tảo) để lắng 100% tảo *Chlorella vul.* tùy theo sinh khối tảo và chất lượng chitosan

Deacetyl %	Độ hòa tan %	OD (780 nm)			
		1,164	1	0,8	0,6
75	74,6	50,57	39,43	27,69	17,99
80	84,5	44,63	34,79	24,43	15,88
85	95,8	39,38	30,70	21,56	14,01
> 87	100	37,72	29,41	20,65	13,42
Sinh khối tảo (mg/L)		800	624	438	285

mg/L) lên 1.164 (sinh khối là 800 mg/L) thì lượng dùng của chitosan tăng từ 17,99 mg lên 50,57 mg cho một lít dịch tảo. Nhưng khi DD là 87% thì lượng dùng tương ứng chỉ 13,42 mg/L và 37,72 mg/L. Ý nghĩa của Bảng 3 còn giúp ước lượng liều dùng chitosan trên thị trường khi không biết DD để thu hoạch dựa vào độ hòa tan trong 2% acid acetic sẽ nhanh hơn đo DD.

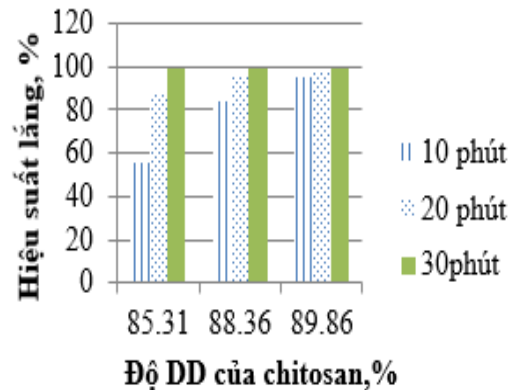
3.4. Ảnh hưởng của độ DD của chitosan lên thời gian lắng tảo

Bảng 2 và hình 3 cho thấy ba nghiệm thức có độ DD 85,31%, 88,36% và 89,86% có độ hòa tan 97-100% và hiệu suất lắng sau 30 phút là 98-99% ít khác biệt. Tuy nhiên khi so sánh hiệu suất thu hoạch theo thời gian ta thấy sự khác biệt rõ hơn (Hình 5). Ở 10 phút lắng mẫu DD 89,86% có hiệu suất lắng trên 95% còn mẫu DD 85,31% chỉ có hiệu suất 55%, liều dùng chitosan là 50 mg/L tương ứng nồng độ chitosan/tảo là 6,25 mg/100 mg.

Tác giả Rashid & ctv. (2013) lắng tảo chỉ trong 3 phút với hiệu suất lắng 92%, liều dùng chitosan là 120 mg/L tương ứng nồng độ 12 mg/100 mg. Liều dùng trong nghiên cứu này chỉ bằng khoảng 50% so với tác giả Rashid & ctv. (2013).

3.5. Qui trình thu hoạch tảo sạch

Để xây dựng qui trình thu hoạch tảo sạch, tảo nuôi trong thiết bị quang hợp tuần hoàn kín được thu hoạch ở các thời điểm khác nhau với lượng thu khác nhau, lắng bằng chitosan trong 30 phút, gạn lớp nước trên, cho nước sạch vào tỉ lệ nước:tảo là 10:1 (v/v) để ngâm rửa trong 20 phút, gạn nước và lặp lại rửa (2-3 lần), ly tâm và sấy khô. Sinh khối tảo (M_o , g/L) của 6 mẫu thu bằng chitosan trước khi rửa cho trên Bảng 4. Với hiệu suất lắng 99%, trung bình tỉ lệ chitosan



Hình 5. Ảnh hưởng của độ DD lên thời gian lắng tảo.

sử dụng là 74,76% và tỉ lệ chitosan có trong mẫu tảo kết tụ là 4,72%. Tỉ lệ giảm phospho trong môi trường Basal trung bình là 20% (w/w) so với sinh khối tảo thu do ly tâm (M_L , g/L), trong đó 1,3% M_L là phospho do tảo hấp thu (Truong, 2016) và phần còn lại (M_m , g/L) do phospho lắng dưới dạng muối phosphate của Ca và Mg được tính tổng muối như sau.

$$M_m = (0.02M_L - 1,3\%M_L) \frac{M_2 + M_3}{M_1} \quad (6)$$

Trong đó M_1 , M_2 và M_3 lần lượt là khối lượng phân tử của phospho, muối $Ca_2(PO_4)_3$ và $Mg_2(PO_4)_3$. Khi thu bằng ly tâm, tổng muối này nằm lẫn trong sinh khối tảo. Gọi M_c (g/L) và M_t (g/L) lần lượt là khối lượng chitosan có trong mẫu tảo kết tụ và khối lượng tảo tổn thất do rửa qui về 1 lít tảo, lượng tảo sạch M_s (g/L) được xác định theo (7), khối lượng tảo tổn thất qua các lần rửa theo (8).

$$M_s = M_o - M_m - M_c - M_t \quad (7)$$

$$M_t = M_o f(n - (n - 1)f(f + 1)) \quad (8)$$

Bảng 4. Hàm lượng tạp chất trong mẫu tảo sau lắng chitosan và sau 2 lần rửa nước và acid acetic

M _o , g/L	M _n	M _a	M _s , g/L	I _n , %	I _a , %
0,432	0,343	0,33	0,307	11,6	7,3
0,446	0,354	0,339	0,317	11,5	6,8
0,705	0,56	0,538	0,502	11,6	7,2
0,886	0,703	0,676	0,631	11,5	7,2
0,975	0,775	0,742	0,694	11,7	6,9
1,218	0,97	0,932	0,867	11,9	7,5

Bảng 5. Hàm lượng tạp chất trong mẫu tảo sau lắng chitosan và 3 lần rửa nước và rửa acid acetic

M _o , g/L	M _n	M _a	M _s , g/L	I _n , %	I _a , %
0,432	0,313	0,296	0,290	8,2	2,2
0,446	0,323	0,303	0,299	8,1	1,4
0,705	0,512	0,482	0,473	8,2	2,0
0,886	0,642	0,606	0,594	8,1	2,0
0,975	0,708	0,664	0,654	8,3	1,6
1,218	0,887	0,837	0,817	8,6	2,4

Bảng 6. Chỉ tiêu hóa lý của tảo *Chlorella vulgaris* nuôi trong thiết bị quang hợp LCP-400¹

Chỉ tiêu	Quy trình kiểm tra	Kết quả	Giới hạn phát hiện GRAS*
Protein	Phương pháp Kjeldahl	57%	
Lipid	Soxhlet	11%	
Cacbohydrat	Robert Copper và DNS	2,2%	
Carotenoid	Phương pháp quang phổ	526 mg/100 g	≥500 mg/100 g
Chlorophyll	Phương pháp quang phổ	Chlo a: 708 mg/100 g	
Chlo b: 355 mg/100 g	≥ 1000 mg/100 g		
Kim loại nặng			
Chì	QTTN/KT3 083:2012	1,1 ppm	≤ 2 ppm
Thủy ngân	QTTN/KT3 064:2012	Không phát hiện	
Asen	AOAC 2010 (986.15)	1 ppm	≤ 1 ppm
Vì sinh			
Nấm men	ISO 21527-2:2008	<10 cfu/g	≤300 cfu/g
Coliforms	ISO 4831:2006	0,92 cfu/g	≤ 10 cfu/g
Clostridium perfringens	ISO 4831:2006	<10cfu/g	≤ 100 cfu/g

¹Carlson, 2011.

Với n là số lần rửa, f là hệ số tổn thất sinh khối mỗi lần rửa xác định bằng thực nghiệm là 5%. Bảng 4 và 5 cho kết quả tính toán tảo sạch M_s, tảo rửa bằng nước M_n và bằng 2% acid acetic M_a ứng với 2 lần và 3 lần rửa. Từ đó tính được tỉ lệ tạp chất trong mẫu rửa nước (I_n) và acid (I_a).

Kết quả cho thấy rửa nước 2 lần và 3 lần có tỉ lệ tạp chất lần lượt là 11,6 ± 0,15% và 8,3 ± 0,21%. Trong lúc đó rửa bằng acid tương ứng có tỉ lệ tạp chất lần lượt là 7,2 ± 0,26% và 2,0 ± 0,37%. Vì chitosan chỉ chiếm 4,72% các mẫu rửa

còn tạp chất trên 7% sẽ có lẫn hóa chất. Vậy chỉ có mẫu rửa acid acetic 3 lần có tạp chất 2% là hầu như chỉ còn chitosan và sạch hóa chất.

3.6. Phân tích thành phần hóa lý tảo nuôi trong thiết bị quang hợp

Mẫu tảo sạch thu được từ thiết bị quang hợp tuần hoàn kín được sấy khô và phân tích các chỉ tiêu hóa lý như trên Bảng 6. Hàm lượng đạm đạt 57%, các chỉ tiêu carotenoids và chlorophyll, kim loại nặng hoàn toàn đạt ngưỡng chất lượng của

GRAS. Chất lượng vi sinh cũng đạt yêu cầu.

4. Kết Luận

Hiệu suất lắng phụ thuộc vào chất lượng chitosan là độ deacetyl nhưng tương quan chặt với độ hòa tan của chitosan trong dịch 2% acid acetic. Với liều dùng 6,25 mg chitosan cho 100 mg tảo, khi DD dưới 87%, càng tăng DD hiệu suất lắng càng tăng. Ở DD 87% hiệu suất lắng đạt 99% sau 30 phút và khi DD trên 87% hiệu suất lắng tăng không đáng kể nhưng chitosan tan hoàn toàn sau 15 phút trong dịch 2% acid acetic. Giảm thời gian lắng xuống 10 phút mẫu chitosan DD 89,8% có hiệu suất lắng là 95% khác biệt rõ rệt so với mẫu DD 85,3% có hiệu suất lắng chỉ 55%. Có sự tương quan tuyến tính giữa liều dùng chitosan và hiệu suất lắng. Điều này cho thấy mật độ sinh khối càng cao cần nhiều chitosan để lắng. Kết quả phân tích một số thành phần của tảo *Chlorella vulgaris* nuôi trong thiết bị quang hợp tuần hoàn kín cho thấy trong tảo có chứa các dưỡng chất từ thiên nhiên vượt trội so với một số loại nguyên liệu thực phẩm khác như đạm, béo, chlorophyll... đây là những thành phần rất cần thiết cho cơ thể con người. Với hàm lượng đạm và chất béo cao là nguồn cung cấp năng lượng dồi dào cho cơ thể, có thể làm thực phẩm bổ sung dinh dưỡng cho người ốm yếu, trẻ em suy dinh dưỡng và hỗ trợ phục hồi sức khỏe cho bệnh nhân. Bên cạnh đó, sản phẩm không nhiễm các vi sinh vật cơ bản và hoàn toàn không có kim loại nặng nên rất an toàn cho người sử dụng. Đây chính là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất ra các loại thực phẩm chức năng.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge, New York: Cambridge University Press.
- Beuckel, A., Depraetere, K., Vandamme, D., Foubert, I., Smolders, E., & Muylaert K. (2013). Influence of organic matter on flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium phosphate precipitation. *Biomass and Bioenergy* 54, 107-114.
- Carlson, S. (2011). *Chlorella vulgaris* (GRAS notice Review 000396). Retrieved July 25, 2011, from U.S. Food and Drug Administration.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3), 294-306.
- Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research* 63, 20-31.
- García-Pérez, J. S., Beuckels, A., Vandamme, D., Depraetere, O., Foubert, I., Parra, R., & Muylaert, K. (2013). Influence of magnesium concentration, biomass concentration and pH on flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Algal Research* 3, 24-29.
- Henderson, R. K., Parsons, S. A., & Jefferson, B. (2008). Successful removal of algae through the control of zeta potential. *Separation Science and Technology* 43(7), 1653-1666.
- Lavoie, A., & de la Noüe, J. (1983). Harvesting microalgae with chitosan. *Journal of the World Aquaculture Society* 14(1-4), 685-694.
- Marcin, H. S. (2002). Chitin and Chitosan. *Polimery* 47, 316-325.
- Morales, J., de la Noüe, J., & Picard G. (1985). Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. *Aquacultural Engineering* 4(4), 257-270.
- Ngo, T. T. T. (2016). Evaluating flocculation efficiency and quality of flocculated *Chaetoceros* spp. algae at different concentrations of chitosan. *Can Tho University Journal of Science* 43b, 106-115.
- Papazi, A., Makridis, P., & Divanach, P. (2010). Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *Journal of Applied Phycology* 22(3), 349-355.
- Rashid, N., Rehmana, S. U., & Han, J. I. (2013). Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochemistry* 48(7), 1107-1110.
- Tran, S. N. (2016). *Effects of algae harvesting and preservation on growth of rotifer Brachionus plicatilis*. Retrieved May 1, 2016, from <https://caf.ctu.edu.vn>.
- Truong, V. (2010). *Biodiesel production from Vietnam microalgae*. Retrieved March 1, 2011, from <http://cnhh.hcmuaf.edu.vn>.
- Truong, V. (2013). *Biodiesel production from closed-algae growing systems using wastewater of ethanol plant in Vietnam*. Retrieved May 12, 2014, from <http://cnhh.hcmuaf.edu.vn>.
- Truong, V. (2016). *Algal biomass production for bioproducts through treatment of wastewater of rubber processing plants in Vietnam*. Retrieved April 15, 2016, from <http://cnhh.hcmuaf.edu.vn>.
- Truong, V., Tran, B. V., & Truong, V. T (2017). *Study on production of Chlorella vulgaris algae for food in a closed system*. Retrieved November 10, 2017, from <http://cnhh.hcmuaf.edu.vn>.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2(1), 1-15.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour Technology* 99(10), 4021-4028.

- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. (2011). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology* 105, 114-119.
- Zvezdova, D. (2010). Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in black sea. *Scientific Works of the Rousse University by Bulgaria* 49, 65-69.
- Zuidam, N. J., & Nedovic, V. A. (2010). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Berlin, Germany: Springer.