



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003634

(51) **C12N 1/12; A23L 33/00; A61K 36/02**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00217

(22) 31/05/2022

(45) 25/07/2024 436

(43) 25/08/2022 413

(73) Trung tâm Sinh học thực nghiệm - Viện Ứng dụng công nghệ (VN)
C6 Thanh Xuân Bắc, Thanh Xuân, Hà Nội

(72) Trương Thị Chiên (VN); Nguyễn Thị Hiền (VN); Trần Bảo Trâm (VN); Mai Vũ
Hoàng Giang (VN); Vũ Xuân Tạo (VN); Nguyễn Thị Thanh Mai (VN); Phạm Thị
Minh Hạnh (VN).

(54) QUY TRÌNH TĂNG SINH HOẠT CHẤT PHYCOCYANIN TRONG NUÔI TRỒNG SINH
KHỐI TẢO SPIRULINA MAXIMA BẰNG NƯỚC LỢ BỔ SUNG CHIẾU SÁNG ĐÈN
LED ĐỎ

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tăng sinh hoạt chất phycocyanin trong nuôi trồng sinh
khối tảo *S. maxima* bằng nước lợ bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ. Quy trình bao gồm các
bước (i) nhân giống cấp I, (ii) Nhân giống cấp II trong điều kiện tự nhiên có mái che, (iii)
Nuôi sinh khối *S. maxima* bằng nước lợ trong bể hở bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ vào
ban đêm nhằm tăng sinh hoạt chất phycocyanin, và (iv) Thu hoạch sinh khối.

Quy trình theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện giúp tăng năng suất, chất lượng
(phycocyanin) của tảo, đồng thời tận dụng được nguồn nước biển có sẵn trong tự nhiên
giúp giảm chi phí trong sản xuất sinh khối tảo *Spirulina*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình tăng sinh hoạt chất phycocyanin trong nuôi trồng sinh khối tảo *Spirulina maxima* bằng nước lợ bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ làm nguyên liệu phục vụ chế biến thực phẩm và dược mỹ phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Spirulina maxima là một vi tảo thuộc chi *Athrospira* (*Spirulina*) được ứng dụng phổ biến trong ngành công nghiệp thực phẩm, dược mỹ phẩm vì chúng chứa hàm lượng protein cao (50-70%) và nhiều chất dinh dưỡng thiết yếu như các axit amin, vitamin, khoáng chất cũng như các hoạt chất sinh học như phycocyanin, carotenoid,... Trong thành phần *S. maxima* có chứa phycocyanin – một phức sắc tố protein thuộc họ phycobiliprotein đóng vai trò hấp thụ ánh sáng mặt trời trong quá trình quang hợp của tảo. Phycobiliprotein chiếm khoảng 40% tổng số protein hòa tan của tế bào và nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học do có đặc tính không gây độc và không gây ung thư. Phycobiliprotein tồn tại ở 3 dạng là C-phycocyanin (C-PC), allophycocyanin (APC) và phycoerythrin (PE). Trong số này, PC và PE đặc biệt có lợi cho sức khỏe con người nhờ tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm và hỗ trợ điều trị ung thư. Với giá trị ứng dụng cao nên nhu cầu về sắc tố này ngày càng tăng, do đó việc tìm kiếm các công nghệ nuôi trồng sinh khối khác nhau nhằm tăng năng lực sản xuất phycocyanin đã được thực hiện.

Phycocyanin được chiết xuất từ các loài thuộc chi *Spirulina* có màu xanh (dark blue-green) đặc trưng. Vai trò sinh học chính của phycocyanin là khả năng thu ánh sáng quang hợp và sự hấp thụ tối đa của chúng ở các bước sóng 540 nm (PE), 620 nm (C-PC) và 650 nm (APC). Phycocyanin có ứng dụng giá trị làm đầu dò huỳnh quang được sử dụng rộng rãi trong hóa mô, phân loại tế bào kích hoạt huỳnh quang và xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang,... Ngoài ra còn có các ứng dụng khác như làm chất màu phụ gia thực

phẩm hay như một hoạt chất sinh học bổ sung vào các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe phổ biến ở thị trường Nhật Bản và các nước phát triển.

Các yếu tố chính ảnh hưởng đến sinh trưởng của *Spirulina* là môi trường nuôi và chế độ chiếu sáng. Trong đó ánh sáng là nhân tố quan trọng nhất để thu nhận các sắc tố từ quá trình quang hợp. Ở quy mô công nghiệp, hầu hết việc nuôi sinh khối đều tận dụng nguồn năng lượng ánh sáng mặt trời. Tuy nhiên để sản xuất các hợp chất sinh học có giá trị như phycocyanin, các axit amin thì các nguồn chiếu sáng nhân tạo như đèn LED đã được sử dụng như một nguồn sáng rất hứa hẹn. So với các hệ thống chiếu sáng khác, đèn LED có chi phí đầu tư không cao, thiết kế linh hoạt và có thể hoạt động với điện áp thấp ($< 4\text{ V}$) và dòng điện ($< 700\text{ mA}$). Vì vậy sử dụng đèn LED hiện nay khá phổ biến và được coi là một công nghệ cải thiện hiệu suất bức xạ, chất lượng ánh sáng và quang phổ ánh sáng để tăng năng suất và chất lượng của tảo *Spirulina*.

Các loài thuộc chi *Athrospira* được biết đến hầu hết là những vi sinh vật nước ngọt, nhưng cũng có một số chủng có khả năng tồn tại và sinh trưởng được trong môi trường nước lợ và nước mặn. Việt Nam là nước có khí hậu nhiệt đới với chiều dài bờ biển trên 3.000 km nên có nhiều tiềm năng trong việc nuôi sinh khối các chủng *Spirulina* chịu mặn. Trong nước biển có sẵn các thành phần khoáng đa lượng và vi lượng đáp ứng một phần nhu cầu dinh dưỡng cho tảo sinh trưởng, vì vậy việc phát triển nuôi *Spirulina* bằng nguồn nước biển là hướng ứng dụng giúp giảm chi phí sản xuất, tiết kiệm nguồn tài nguyên nước ngọt đang ngày càng khan hiếm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình tăng sinh hoạt chất phycocyanin trong nuôi trồng sinh khối tảo *S. maxima* bằng nước lợ bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ. Giống tảo *S. maxima* chịu mặn được nuôi trong môi trường nước biển pha loãng tới độ mặn từ 5-10‰ (nước lợ), bổ sung thêm nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin... (pH 9-10) và bổ sung chiếu sáng vào ban đêm bằng đèn LED đỏ. Quy trình bao gồm các bước: (i) nhân giống cấp I, (ii) Nhân giống cấp II trong điều kiện tự nhiên có mái che, (iii) Nuôi sinh khối *S. maxima* bằng nước lợ trong bể hở bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ vào ban đêm nhằm tăng sinh hoạt chất phycocyanin, và (iv) Thu hoạch sinh khối.

Bằng cách mua hoặc tuyển chọn và thuần hóa chủng giống thích ứng với môi trường nước lợ và bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ vào ban đêm giúp tăng sinh hàm lượng hoạt chất sinh học phycocyanin trong sinh khối tảo *S. maxima*, quy trình theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện và tận dụng được nguồn nước biển có sẵn trong tự nhiên trong nuôi trồng tảo, giúp giảm chi phí trong sản xuất thương mại.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án và ví dụ cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Các quy trình, kỹ thuật pha chế môi trường, đo pH, nhân giống và xác định tốc độ tăng trưởng của vi sinh vật ... là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ: phương pháp chuẩn bị môi trường gốc bổ sung vào môi trường nhân nuôi, phương pháp đo mật độ quang (Optical Density – OD) ở bước sóng 560nm trên máy quang phổ để xác định tốc độ sinh trưởng của vi tảo *S. maxima*...

Các nguyên vật liệu, hóa chất, vật tư hoặc thiết bị sử dụng trong quy trình theo sáng chế là hàng hóa thông dụng, có thể đặt mua dễ dàng trên thị trường. Giống tảo *S. maxima* sử dụng trong sáng chế được mua từ các bảo tàng/bộ sưu tập giống trong nước hoặc trên thế giới; hoặc tuyển chọn/thuần hóa chủng tảo có khả năng chịu mặn trong ngưỡng từ 5-10‰.

Theo đó, sáng chế đề cập đến quy trình tăng sinh hoạt chất phycocyanin trong nuôi trồng sinh khối tảo *S. maxima* bằng nước lợ bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ, bao gồm các bước:

(i) Nhân giống cấp I:

Chuẩn bị môi trường nhân giống cấp I bằng cách pha loãng nước biển với nước ngọt đến độ mặn 5-6‰, khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút và bổ sung thêm các nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng (tính trong 1L) gồm NaHCO₃ 8g; NaNO₃ 3g; K₂SO₄ 1g; K₂HPO₄ 0,5g; vi lượng FeSO₄.7H₂O 0,01g; MoO₃ 0,015g; ZnSO₄ 0,1g; vitamin tổng hợp B₁, B₆, B₁₂ 1ml, điều chỉnh độ pH= 9-10.

Đưa môi trường nhân giống cấp I vào chai nhựa PET 1,5 lít.

Tiến hành cấy giống là tảo *S. maxima* với mật độ giống ban đầu đạt $OD_{560} = 0,1-0,15$.

Thực hiện nhân giống ở điều kiện nuôi là nhiệt độ 28-32 °C, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ 3000-5000 lux (tương đương với $55-90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), có sục khí theo cùng chu kỳ chiếu sáng 8 giờ/ngày, trong thời gian 10 ngày, thu được giống cấp I.

Sau 10 ngày nhân giống, giống cấp I có OD_{560} đạt 1,1-1,2.

(ii) Nhân giống cấp II trong điều kiện tự nhiên có mái che:

Chuẩn bị môi trường nhân giống cấp II bằng cách pha loãng nước biển với nước ngọt đến độ mặn 8-10‰, bổ sung các nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng (tính trong 1L) NaHCO_3 8g; NaNO_3 3g; K_2SO_4 1g; K_2HPO_4 0,5g; vi lượng $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g; MoO_3 0,015g; ZnSO_4 0,1g; vitamin tổng hợp B₁, B₆, B₁₂ 1ml, điều chỉnh độ pH = 9-10.

Đưa môi trường nhân giống cấp II vào chai nhựa PET 1,5 lít.

Tiến hành tiếp giống bằng cách đưa giống cấp I thu được từ bước (I) với mật độ giống ban đầu đạt $OD_{560} = 0,2$.

Thực hiện nhân giống ở điều kiện nhiệt độ, ánh sáng tự nhiên, có mái che, có sục khí bằng bơm với lưu lượng tối đa 60 m³/giờ, thời gian sục cùng chu kỳ sáng tự nhiên vào ban ngày (khoảng 10-12 giờ/ngày, tùy mùa), trong 12 ngày thu được giống cấp II.

Sau 12 ngày nhân giống, giống cấp II có OD_{560} đạt 1,1-1,2.

(iii) Nuôi sinh khối *S. maxima* bằng nước lợ trong bể hở bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ vào ban đêm nhằm tăng sinh hoạt chất phycocyanin.

Chuẩn bị bể nuôi bằng cách vệ sinh bể bằng chlorin nồng độ 100-200 ppm trong 30 phút, tháo nước và phơi nắng bể trong 1-2 ngày.

Xử lý nước biển bằng cách bơm lọc qua cát và khử trùng bằng chlorin nồng độ 20-30ppm trong 02 ngày, tiến hành pha loãng với nước ngọt đến độ mặn 8-10‰ và đưa vào bể nuôi ở mức nước 40-60cm, bổ sung (tính trong 1L) nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng gồm NaHCO_3 6g; NaNO_3 2,5g; K_2SO_4 1g; K_2HPO_4 0,5g; $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, điều chỉnh độ pH = 9-10.

Tiến hành tiếp giống bằng cách đưa giống cấp II ra bể nuôi với mật độ giống ban đầu $OD_{560} = 0,2$.

Thực hiện nuôi tảo với điều kiện nuôi trồng như sau:

- Ánh sáng: Ban ngày sử dụng ánh sáng tự nhiên, ban đêm kết hợp đèn LED đỏ với cường độ chiếu sáng đạt $150-160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

- Thời gian chiếu sáng: LED đỏ được chiếu sáng bổ sung vào ban đêm với thời gian 8 giờ/ngày.

- Tiến hành đảo trộn môi trường nuôi tảo trong bể bằng hệ thống guồng với tốc độ khuấy 30-40 vòng/phút với chu kì 40 phút/lần, mỗi lần khuấy trong thời gian 10 phút.

- Theo dõi tốc độ sinh trưởng của tảo hàng ngày bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 560nm.

(iv) Thu hoạch sinh khối:

Sau 10 ngày (vụ hè thu) hoặc 12-14 ngày (vụ đông xuân), khi đó OD_{560} đạt $\geq 1,2$ (tương đương với mật độ sinh khối tảo đạt trên 1 g/l), tiến hành thu sinh khối bằng phương pháp lọc ly tâm, thu được tảo *S. maxima* có hoạt chất phycocyanin được tăng sinh.

Sau khi thu sinh khối tiến hành bổ sung môi trường và/hoặc dinh dưỡng để duy trì nuôi liên tục trong 45-60 ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thực hiện quy trình tăng sinh hoạt chất phycocyanin trong nuôi trồng sinh khối tảo *Spirulina maxima* bằng nước lợ bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ vào tháng 9 đến tháng 11 tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Nhân giống cấp I trong điều kiện phòng thí nghiệm:

- Dụng cụ nuôi: Sử dụng chai nhựa PET 1,5 lít;

- Môi trường nhân giống: sử dụng nước biển pha loãng với nước ngọt đến độ mặn 6‰ được khử trùng ở nhiệt độ $121^{\circ}\text{C}/20$ phút và bổ sung thêm các nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng (tính trong 1L) gồm NaHCO_3 8g; NaNO_3 3g; K_2SO_4 1g;

K_2HPO_4 0,5g; vi lượng $FeSO_4.7H_2O$ 0,01g; MoO_3 0,015g; $ZnSO_4$ 0,1g; vitamin tổng hợp B_1, B_6, B_{12} 1ml (điều chỉnh pH 9,5).

- Mật độ giống: Tiến hành cấy giống với mật độ giống ban đầu đạt $OD_{560} = 0,15$.

- Điều kiện nhân giống: nhiệt độ $30\text{ }^{\circ}C$, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ 4000 lux (tương đương với $72\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), có sục khí theo cùng chu kì chiếu sáng 8 giờ/ngày, trong 10 ngày, thu được giống cấp I có OD_{560} đạt 1,1.

Nhân giống cấp II trong điều kiện tự nhiên có mái che:

- Dụng cụ nuôi: Sử dụng chai nhựa PET 1,5 lít;

- Môi trường nhân giống: sử dụng nước biển pha loãng với nước ngọt đến độ mặn 10‰ được bổ sung thêm các nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng (tính trong 1L) $NaHCO_3$ 8g; $NaNO_3$ 3g; K_2SO_4 1g; K_2HPO_4 0,5g; vi lượng $FeSO_4.7H_2O$ 0,01g; MoO_3 0,015g; $ZnSO_4$ 0,1g; vitamin tổng hợp B_1, B_6, B_{12} 1ml (điều chỉnh pH = 9,5).

- Tiếp giống: Giống tảo *S. maxima* sau khi nhân cấp I trong phòng được đưa ra nhân giống cấp II với mật độ giống ban đầu $OD_{560} = 0,2$.

- Điều kiện nhân giống: nhiệt độ, ánh sáng tự nhiên, có mái che, có sục khí với thời gian cùng chu kì sáng tự nhiên (ban ngày, khoảng 10 giờ), trong thời gian 12 ngày, thu được giống cấp II có OD_{560} đạt 1,2.

Nuôi sinh khối *S. maxima* bằng nước lợ trong bể hở bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ vào ban đêm nhằm tăng sinh hoạt chất phycocyanin.

Chuẩn bị bể nuôi bằng cách vệ sinh bể bằng chlorin nồng độ 150 ppm trong 30 phút, tháo nước và phơi nắng bể trong 2 ngày.

Xử lí nước biển bằng cách bơm lọc qua cát và khử trùng bằng chlorin nồng độ 30ppm trong 02 ngày, tiến hành pha loãng với nước ngọt đến độ mặn 10‰ và đưa vào bể nuôi ở mức nước 40cm, bổ sung (tính trong 1L) nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng gồm $NaHCO_3$ 6g; $NaNO_3$ 2,5g; K_2SO_4 1g; K_2HPO_4 0,5g; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01g, điều chỉnh độ pH = 9,5.

Tiến hành tiếp giống bằng cách đưa giống cấp II ra bể nuôi với mật độ giống ban đầu $OD_{560} = 0,2$.

Thực hiện nuôi tảo với điều kiện nuôi trồng như sau:

- Ánh sáng: Ban ngày sử dụng ánh sáng tự nhiên, ban đêm kết hợp đèn LED đỏ với cường độ chiếu sáng đạt $155 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- Thời gian chiếu sáng: LED đỏ được chiếu sáng bổ sung vào ban đêm với thời gian 8 giờ/ngày.
- Tiến hành đảo trộn môi trường nuôi tảo trong bể bằng hệ thống guồng với tốc độ khuấy 40 vòng/phút với chu kì 40 phút/lần, mỗi lần khuấy trong thời gian 10 phút.
- Theo dõi tốc độ sinh trưởng của tảo hàng ngày bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 560nm. Tốc độ sinh trưởng của tảo *S. maxima* được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Tốc độ sinh trưởng của tảo *S. maxima*

Ngày	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD _{560nm}	0,2	0,29	0,40	0,51	0,62	0,71	0,83	0,95	1,08	1,20	1,31

Thu hoạch sinh khối:

Sau 10 ngày (OD₅₆₀ đạt 1,31), tiến hành thu sinh khối bằng phương pháp lọc ly tâm, thu được tảo *S. maxima* có hoạt chất phycocyanin được tăng sinh.

Sau khi thu sinh khối tiến hành bổ sung môi trường và/hoặc dinh dưỡng để duy trì nuôi liên tục trong 60 ngày.

Xác định hàm lượng phycocyanin: Cân chính xác 1g tảo khô trộn đều với 50 ml đệm photphat 0,05 M, pH7, để qua đêm ở 4°C. Tiến hành ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và thu dịch nổi phía trên. Độ hấp thụ quang học của mẫu có chứa phycocyanin ở các bước sóng 620 nm và 652 nm trên máy so màu.

Hàm lượng phycocyanin trong tảo *S. maxima* thu được là 12,5% (tính theo khối lượng khô), cao hơn so với phương pháp nuôi tự nhiên chỉ đạt 9,8% (tăng 27,55%).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình theo sáng chế đơn giản, hoàn toàn có khả năng áp dụng để sản xuất thương mại sinh khối tảo *Spirulina maxima* có hàm lượng phycocyanin cao bằng nước

lợ trong bể hở. Việc sản xuất sinh khối tảo chất lượng cao bằng việc bổ sung nguồn sáng đèn LED đỏ vào ban đêm có chi phí đầu tư ban đầu hợp lý, dễ dàng thiết kế lắp đặt vào các hệ thống bể nuôi của doanh nghiệp/cơ sở nuôi tảo hiện có, hoạt động với điện áp thấp và điện năng tiêu thụ không nhiều. Chất lượng và dải quang phổ ánh sáng đèn LED đỏ giúp rút ngắn thời gian nuôi và hàm lượng hoạt chất chính phycocyanin trong sinh khối của tảo *Spirulina* tăng hơn 20% (tính theo trọng lượng khô). Ngoài ra, quy trình này sử dụng nguồn nước biển làm môi trường nuôi rất thích hợp cho các địa bàn vùng ven biển ở Việt Nam có thể tận dụng nguồn nước biển rất sẵn có và chứa nhiều hàm lượng khoáng, vi lượng giúp tảo sinh trưởng và phát triển tốt. Ngoài ra, việc sử dụng nước biển trong nuôi tảo cũng giúp hạn chế sử dụng nguồn nước ngọt đang khan hiếm, góp phần vào phát triển nông nghiệp bền vững.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tăng sinh hoạt chất phycocyanin trong nuôi trồng sinh khối tảo *Spirulina maxima* bằng nước lợ bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ, bao gồm các bước:

(i) Nhân giống cấp I:

Chuẩn bị môi trường nhân giống cấp I bằng cách pha loãng nước biển với nước ngọt đến độ mặn 5-6‰, khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút và bổ sung thêm các nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng tính trong 1L gồm NaHCO₃ 8g; NaNO₃ 3g; K₂SO₄ 1g; K₂HPO₄ 0,5g; vi lượng FeSO₄.7H₂O 0,01g; MoO₃ 0,015g; ZnSO₄ 0,1g; vitamin tổng hợp B₁, B₆, B₁₂ 1ml, điều chỉnh độ pH= 9-10;

Đưa môi trường nhân giống cấp I vào chai nhựa PET 1,5 lít;

Tiến hành cấy giống là tảo *S. maxima* với mật độ giống ban đầu đạt OD₅₆₀ = 0,1-0,15;

Thực hiện nhân giống ở điều kiện nuôi là nhiệt độ 28-32 °C, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ 3000-5000 lux (tương đương với 55-90 μmol.m⁻².s⁻¹), có sục khí theo cùng chu kì chiếu sáng 8 giờ/ngày, trong thời gian 10 ngày, thu được giống cấp I;

(ii) Nhân giống cấp II trong điều kiện tự nhiên có mái che:

Chuẩn bị môi trường nhân giống cấp II bằng cách pha loãng nước biển với nước ngọt đến độ mặn 8-10‰, bổ sung các nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng tính trong 1L gồm NaHCO₃ 8g; NaNO₃ 3g; K₂SO₄ 1g; K₂HPO₄ 0,5g; vi lượng FeSO₄.7H₂O 0,01g; MoO₃ 0,015g; ZnSO₄ 0,1g; vitamin tổng hợp B₁, B₆, B₁₂ 1ml, điều chỉnh độ pH = 9-10;

Đưa môi trường nhân giống cấp II vào chai nhựa PET 1,5 lít;

Tiến hành tiếp giống bằng cách đưa giống cấp I thu được từ bước (i) với mật độ giống ban đầu đạt OD₅₆₀ = 0,2;

Thực hiện nhân giống ở điều kiện nhiệt độ, ánh sáng tự nhiên, có mái che, có sục khí bằng bơm với lưu lượng tối đa 60 m³/giờ, thời gian sục cùng chu kì sáng tự nhiên vào ban ngày, khoảng 10-12 giờ/ngày tùy mùa, trong 12 ngày thu được giống cấp II;

(iii) Nuôi sinh khối *S. maxima* bằng nước lợ trong bể hở bổ sung chiếu sáng đèn LED đỏ vào ban đêm nhằm tăng sinh hoạt chất phycocyanin.

Chuẩn bị bể nuôi bằng cách vệ sinh bể bằng chlorin nồng độ 100-200 ppm trong 30 phút, tháo nước và phơi nắng bể trong 1-2 ngày;

Xử lý nước biển bằng cách bơm lọc qua cát và khử trùng bằng chlorin nồng độ 20-30ppm trong 02 ngày, tiến hành pha loãng với nước ngọt đến độ mặn 8-10‰ và đưa vào bể nuôi ở mức nước 40-60cm, bổ sung nguồn cacbon, nitơ, khoáng đa lượng tính trong 1L gồm NaHCO_3 6g; NaNO_3 2,5g; K_2SO_4 1g; K_2HPO_4 0,5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, điều chỉnh độ pH = 9-10;

Tiến hành tiếp giống bằng cách đưa giống cấp II ra bể nuôi với mật độ giống ban đầu $\text{OD}_{560} = 0,2$;

Thực hiện nuôi tảo với điều kiện nuôi trồng như sau:

- Ánh sáng: Ban ngày sử dụng ánh sáng tự nhiên, ban đêm kết hợp đèn LED đỏ với cường độ chiếu sáng đạt $150\text{-}160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;

- Thời gian chiếu sáng: LED đỏ được chiếu sáng bổ sung vào ban đêm với thời gian 8 giờ/ngày;

- Tiến hành đảo trộn môi trường nuôi tảo trong bể bằng hệ thống guồng với tốc độ khuấy 30-40 vòng/phút với chu kì 40 phút/lần, mỗi lần khuấy trong thời gian 10 phút;

- Theo dõi tốc độ sinh trưởng của tảo hàng ngày bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 560nm; và

(iv) Thu hoạch sinh khối:

Khi OD_{560} đạt 1,2, tiến hành thu sinh khối bằng phương pháp lọc ly tâm, thu được tảo *S. maxima* có hoạt chất phycocyanin được tăng sinh;

Sau khi thu sinh khối tiến hành bổ sung môi trường và/hoặc dinh dưỡng để duy trì nuôi liên tục trong 45-60 ngày.