

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM KỸ THUẬT

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP TRƯỜNG

NGHIÊN CỨU CÁC PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH
DẦU SINH HỌC TỪ VI TẢO *CHLORELLA VULGARIS*

Mã số: T2023-06-01

Chủ nhiệm đề tài: TS. Trần Thị Ngọc Thư

Đơn vị: Khoa Công nghệ Hóa học - Môi trường

Chương trình đào tạo: Kỹ thuật Thực phẩm

Đà Nẵng, 3/2025

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM KỸ THUẬT

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP TRƯỜNG

NGHIÊN CỨU CÁC PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH
DẦU SINH HỌC TỪ VI TẢO *CHLORELLA VULGARIS*

Mã số: T2023-06-01

Xác nhận của cơ quan chủ trì đề tài

KT. HIỆU TRƯỞNG
PHÓ HIỆU TRƯỞNG



PGS. TS. Võ Trung Hùng

Chủ nhiệm đề tài

TS. Trần Thị Ngọc Thư

DANH SÁCH THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU

STT	Họ và tên	Đơn vị công tác và lĩnh vực chuyên môn
01	TS. Nguyễn Thị Đông Phương	Khoa Công nghệ Hóa học - Môi trường, chuyên ngành Công nghệ Sinh học
02	ThS. Nguyễn Hoàng Phúc Sơn	Khoa Công nghệ Hóa học - Môi trường, chuyên ngành Công nghệ Môi trường

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG BIỂU.....	v
DANH MỤC HÌNH ẢNH.....	vi
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	viii
THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	ix
INFORMATION ON RESEARCH RESULTS	xii
MỞ ĐẦU	1
1. Tổng quan nghiên cứu trong và ngoài nước	1
2. Tính cấp thiết của đề tài	3
3. Mục tiêu, đối tượng nghiên cứu của đề tài:.....	4
<i>Mục tiêu</i>	4
<i>Đối tượng nghiên cứu</i>	4
<i>Phạm vi nghiên cứu</i>	4
4. Cách tiếp cận và phương pháp nghiên cứu	4
<i>Cách tiếp cận</i>	4
<i>Phương pháp nghiên cứu</i>	5
<i>Nội dung nghiên cứu</i>	6
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	7
1.1. Vi tảo và tiềm năng ứng dụng của vi tảo trong thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm	7
1.1.1. Đặc điểm chung của vi tảo	7
1.1.2. <i>Spirulina</i>	10
1.1.3. <i>Haematococcus pluvialis</i>	12
1.1.4. <i>Chlorella vulgaris</i>	18
1.1.4. <i>Dunaliella salina</i>	25
1.2. Dầu sinh học từ vi tảo.....	26
1.2.1. Thành phần Lipid vi tảo	26
1.2.2. Khai thác dầu sinh học từ vi tảo.....	28
1.3. Chiết tách dầu sinh học từ <i>Chlorella vulgaris</i>	32
1.3.3. Đánh giá thành phần hóa học của dầu sinh học từ <i>Chlorella vulgaris</i>	32

1.3.2. Chiết tách dầu sinh học từ <i>Chlorella vulgaris</i>	34
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	37
2.1. Nguyên liệu.....	37
2.2. Phương pháp nghiên cứu	38
2.2.1 Khảo sát quá trình tăng trưởng vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i>	38
2.2.2. Phương pháp khảo sát thành phần hóa học của vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i>	38
2.2.3. Phương pháp khảo sát dung môi chiết dầu sinh học từ vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i>	38
2.2.4. Phương pháp khảo sát phương pháp chiết dầu sinh học	39
2.2.5. Phương pháp khảo sát phương pháp chiết dầu sinh học bằng siêu âm.....	39
2.2.6.Tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học bằng phương pháp siêu âm theo phương pháp bề mặt đáp ứng	39
2.2.7. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu.....	40
2.2.8. Phương pháp toán học	41
2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu	42
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	44
3.1. Khảo sát quá trình tăng trưởng vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i>	44
3.2. Xác định một số thành phần hóa học và hợp chất có hoạt tính sinh học của sinh khối tảo khô <i>Chlorella vulgaris</i>	45
3.2.1. Xác định một số thành phần hóa học của sinh khối tảo khô <i>Chlorella vulgaris</i>	45
3.2.2. Xác định một số hợp chất của sinh khối tảo khô <i>Chlorella vulgaris</i>	46
3.3. Khảo sát ảnh hưởng dung môi trích ly đến hiệu quả thu nhận dầu sinh học	48
3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng dung môi trích ly đến hàm lượng dầu sinh học thu nhận ..	48
3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng dung môi trích ly đến hiệu quả thu nhận TAG	50
3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng tỉ lệ dung môi hexane/ethanol đến hiệu quả chiết dầu sinh học	52
3.4. Khảo sát ảnh hưởng các phương pháp chiết đến hiệu quả thu nhận dầu sinh học	52
3.5. Khảo sát điều kiện chiết dầu sinh học bằng sóng siêu âm	56
3.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm	56
3.5.2. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm.....	57
3.5.3. Ảnh hưởng mức năng lượng siêu âm.....	58
3.6. Tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học bằng phương pháp siêu âm theo phương pháp bề mặt đáp ứng.....	59

3.6.1. Thiết lập mô hình hồi quy theo Box- Behnken.....	59
3.6.2. Phân tích sự có nghĩa và sự tương quan của mô hình	60
3.6.3. Tối ưu hóa điều kiện chiết	63
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	65
Kết luận.....	65
Kiến nghị	66
TÀI LIỆU THAM KHẢO	67
PHỤ LỤC	74
Phụ lục 1. Hình ảnh các thiết bị sử dụng.....	74
Phụ lục 2. Các phương pháp phân tích các chỉ tiêu.....	75
THUYẾT MINH ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP TRƯỜNG	
HỢP ĐỒNG TRIỂN KHAI THỰC HIỆN ĐỀ TÀI	
MỤC LỤC MINH CHỨNG SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI	

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Phân loại và đặc tính vi tảo.	8
Bảng 1.2. Các phương pháp chuyển gen nhằm gia tăng sản xuất astaxanthin.....	17
Bảng 1.3. Phân tích ưu điểm và hạn chế của các phương pháp phá vỡ tế bào vi tảo....	29
Bảng 1.4. So sánh các phương pháp chiết.....	30
Bảng 1 5. Thành phần axit béo của <i>Chlorella vulgaris</i>	33
Bảng 1 6. Thống kê các phương pháp chiết truyền thống dầu sinh học từ <i>C.vulgaris</i> .	35
Bảng 1.7. Thống kê các phương pháp chiết hỗ trợ siêu âm dầu sinh học từ <i>C.vulgaris</i>	35
Bảng 2.1. Thành phần môi trường BBM.....	37
Bảng 2.2. Bảng mã hóa của các yếu tố nghiên cứu.....	41
Bảng 2.3. Bảng ma trận mã hóa theo thiết kế BBD	42
Bảng 3.1. Thành phần hóa học của vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i>	45
Bảng 3.2. Thành phần các hợp chất màu và polyphenol của vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i>	46
Bảng 3.3. Ký hiệu các mẫu dung môi sử dụng.....	48
Bảng 3.4. Điều kiện chiết của các phương pháp	53
Bảng 3.5. Kết quả thực nghiệm thu nhận dầu sinh học theo ma trận các yếu tố ảnh hưởng theo mô hình Box-Behnken	59
Bảng 3.6. Kết quả phân tích ANOVA của phương trình hồi quy và hệ số của phương trình	60
Bảng 3.7. Hệ số tương quan	61
Bảng 3.8. Hệ số R^2	61
Bảng 3 9. Tóm tắt kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học.	64

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Hình ảnh vi tảo dưới kính hiển vi.....	7
Hình 1.2. Quy trình tóm tắt sản xuất các sản phẩm nội bào và ngoại bào từ vi tảo	9
Hình 1.3. Vòng đời và hình thái tế bào	12
Hình 1.4. Số lượng ấn phẩm nghiên cứu về việc tăng cường sản xuất astaxanthin và kỹ thuật di truyền trên <i>H. pluvialis</i> thu được từ ScienceDirect từ năm 2013 đến năm 2023.....	15
Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp astaxanthin và các carotenoid ở <i>H. pluvialis</i>	16
Hình 1.6. Các loại vi tảo <i>Chlorella</i> sp	20
Hình 1.7. Chiến lược tăng cường năng suất lipid của vi tảo	20
Hình 1.8. Lò phản ứng quang sinh học ánh sáng chìm (SL-PBR) được chiếu sáng bên trong(a) và Mô hình tuần hoàn của đèn không dây(b).....	21
Hình 1.9. Hệ thống nuôi cấy vi tảo hai giai đoạn từ hệ thống PBR đến ORP quy mô pilot	22
Hình 1.10. Tác động của stress về các thành phần điển hình lên quá trình sản xuất lipid và carotenoid trong vi tảo và các chiến lược nuôi cấy hai giai đoạn	24
Hình 1.11. Số lượng ấn phẩm liên quan đến thuật ngữ [<i>Dunaliella</i>] tại cơ sở dữ liệu PubMed (NCBI).....	25
Hình 1.12. Mô hình tinh chế sinh học của vi tảo.....	27
Hình 1.13. Sơ đồ biểu diễn quá trình sinh tổng hợp lipid ở vi tảo	28
Hình 1.14. Các hệ thống trích ly siêu âm trực tiếp.....	31
Hình 1.15. Đánh giá thành phần các acid béo của <i>Chlorella vulgaris</i>	33
Hình 2.1. Tăng sinh <i>C.vulgaris</i> trên BBM dịch (a) và thạch (b), hình ảnh vi tảo <i>C.vulgaris</i> dưới kính hiển vi (c).....	37
Hình 2.2. Sơ đồ chiết lipid bằng dung môi hữu cơ.....	39
Hình 2.3. Hình ảnh phương trình đồ thị đường chuẩn.	76
Hình 3.1. Đồ thị tăng trưởng của chủng vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i> nuôi cấy	44
Hình 3.2. Sấy khô sinh khối tảo ướt	45
Hình 3.3. Thử nghiệm định tính các chất màu trên sắc kí bản mỏng TLC	47
Hình 3.4. Ảnh hưởng của dung môi đến khả năng thu nhận lipid từ sinh khối vi tảo khô	49
Hình 3.5. Thử nghiệm định tính TAG trên sắc kí bản mỏng TLC	51

Hình 3.6. Ảnh hưởng của dung môi đến khả năng thu nhận lipid từ <i>C. vulgaris</i>	52
Hình 3.7. Ảnh hưởng của phương pháp chiết đến hiệu quả thu nhận dầu sinh học từ <i>C. vulgaris</i>	53
Hình 3.8. Hình chụp SEM các tế bào vi tảo trước và sau khi xử lý chiết siêu âm.	55
Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến hiệu quả chiết.....	56
Hình 3.10. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hàm lượng lipid	57
Hình 3.11. Ảnh hưởng của mức năng lượng siêu âm đến hiệu quả chiết	58
Hình 3.12. Biểu đồ Pareto	62
Hình 3.13. Bề mặt đáp ứng của hàm lượng dầu sinh học.....	63
Hình 3 14. Đường cong tối ưu hóa từng yếu tố ảnh hưởng lên quá trình chiết siêu âm	63
Hình 3 15. Hình ảnh dầu sinh học chiết xuất từ <i>C.vulgaris</i>	64

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

SA:	Siêu âm
NLSA:	Năng lượng siêu âm
UAE:	Ultrasound assisted extraction
SFE:	Supercritical fluid extraction
MAE:	Microwave-assisted extraction
TAG:	Triacylglycerol
TLC:	Thin Layer Chromatography
PBR:	Photobioreactors
ORP:	Open raceway ponds
PUFA:	Polyunsaturated Fatty Acids
MUFA:	Monounsaturated Fatty Acids
SFA:	Saturated Fatty Acids
BBM:	Bold's Basal medium
DMAPP:	dimethylallyl pyrophosphate
IPP:	isopentenyl diphosphate
GGPP:	geranylgeranyl pyrophosphate
GGPPs:	geranylgeranyl pyrophosphate synthase
PSY:	phytoene synthase
PDS:	phytoene desaturase
ZDS:	ζ -carotene desaturase
LYCB:	lycopene β -cyclase
CrtR-b:	β -carotene hydroxylase
bkt:	β -carotene ketolase
GRAS:	Generally Recognized As Safe

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: **Nghiên cứu các phương pháp chiết tách dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris***
- Mã số: T2023-06-01
- Chủ nhiệm: TS. Trần Thị Ngọc Thư
- Thành viên tham gia: TS. Nguyễn Thị Đông Phương,
ThS. Nguyễn Hoàng Phúc Sơn
- Cơ quan chủ trì: Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật, ĐH Đà Nẵng
- Thời gian thực hiện: là 12 tháng, từ tháng 03 năm 2024 đến tháng 02 năm 2025

2. Mục tiêu:

Mục tiêu của đề tài là khảo sát lựa chọn phương pháp trích ly dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris* cho hiệu quả trích ly cao.

3. Tính mới và sáng tạo:

Nghiên cứu thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết hỗ trợ siêu âm, sử dụng dung môi thân thiện với môi trường là hệ 2 dung môi hexan/ethanol, cho hiệu suất trích ly hiệu quả.

4. Tóm tắt kết quả nghiên cứu:

Hiện nay, vi tảo được quảng bá như một nguồn nhiên liệu vận chuyển trong tương lai chủ yếu vì tiềm năng dầu sinh học của chúng. Một trong những vi tảo được trồng chủ yếu để sản xuất dầu diesel sinh học là *Chlorella vulgaris*, là chủng có triển vọng nhất trong số 3.000 loài được sàng lọc. Nghiên cứu đã khảo sát điều kiện nuôi cấy, cho thấy sự phát triển của chủng *Chlorella vulgaris* tuân theo đường cong sinh trưởng, trong đó tốc độ gia tăng sinh khối phụ thuộc vào lượng giống ban đầu và điều kiện nuôi cấy. Khi đạt đến pha cân bằng, sinh trưởng chậm lại và dần suy yếu. Các mẫu tảo được nuôi trong hệ thống nuôi cấy đã phát triển bình thường, cho sinh khối

tảo khô đáp ứng tiêu chuẩn về thành phần hóa học đa lượng, chlorophyll và polyphenol. Trong số 7 hệ dung môi được khảo sát—gồm các dung môi đơn (chloroform, ethyl acetate, diethyl ether, hexane) và dung môi hỗn hợp (hexane/ethanol, hexane/methanol, diethyl ether/methanol)—hệ dung môi hexane/ethanol với tỷ lệ 3:1 (v/v) cho hiệu suất chiết xuất lipid cao nhất, đạt $198,6 \pm 5,5$ mg/g, đồng thời thân thiện với môi trường. Bốn phương pháp trích ly được nghiên cứu gồm ngâm, lắc, Soxhlet và siêu âm. Kết quả cho thấy phương pháp siêu âm đạt hiệu quả chiết xuất cao nhất, tiếp theo là phương pháp Soxhlet ($124,3 \pm 7,4$ mg/g), trong khi phương pháp ngâm cho hiệu suất thấp nhất ($58,6 \pm 5,1$ mg/g). Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly siêu âm đã được khảo sát bằng phương pháp đơn biến, bao gồm nhiệt độ chiết ($30\text{--}60^\circ\text{C}$), thời gian siêu âm (10-70 phút) và mức năng lượng siêu âm (50–90%). Quá trình tối ưu hóa điều kiện chiết được thực hiện bằng phương pháp bề mặt đáp ứng theo mô hình Box-Behnken. Kết quả cho thấy tất cả các yếu tố này có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết xuất lipid và phù hợp với mô hình dự đoán. Thông qua mô phỏng tối ưu trên phần mềm Minitab, điều kiện chiết xuất lipid tối ưu được xác định là nhiệt độ siêu âm $45,35^\circ\text{C}$, thời gian siêu âm 33,33 phút. Khi tiến hành thí nghiệm theo các điều kiện tối ưu này, hiệu suất chiết xuất dầu sinh học từ tảo sinh khối *Chlorella vulgaris* đạt $274,05 \pm 10,47$ mg/g, không có sự khác biệt có ý nghĩa so với giá trị dự đoán của mô hình.

5. Tên sản phẩm:

Bài báo đăng trên tạp chí có tên tạp chí thuộc danh mục ESCI/Q1: 01 bài báo

6. Hiệu quả, phương thức chuyển giao kết quả nghiên cứu và khả năng áp dụng:

- Hiệu quả, phương thức chuyển giao kết quả nghiên cứu
 - Đối với lĩnh vực giáo dục và đào tạo: Hướng dẫn sinh viên nghiên cứu khoa học và tốt nghiệp Đại học
 - Đối với lĩnh vực kinh tế-xã hội: Ứng dụng các kết quả nghiên cứu trong chiết dầu sinh học từ vi tảo
 - Phương thức chuyển giao kết quả nghiên cứu: Bàn giao trực tiếp sản phẩm của đề tài cho Khoa Công nghệ Hóa học - Môi trường, trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật, Đại học Đà Nẵng.

- Địa chỉ ứng dụng:
 - Là tài liệu tham khảo giảng dạy cho các học phần Lý thuyết Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Tối ưu hóa quy hoạch thực nghiệm cho các sinh viên khoa Công nghệ Hóa học-Môi trường, trường ĐH Sư phạm Kỹ thuật (100 sinh viên).
 - Ứng dụng cho các trường Đại học và Cao đẳng trong địa bàn thành phố Đà Nẵng

7. Hình ảnh, sơ đồ minh họa chính

Ngày 01 tháng 04 năm 2025

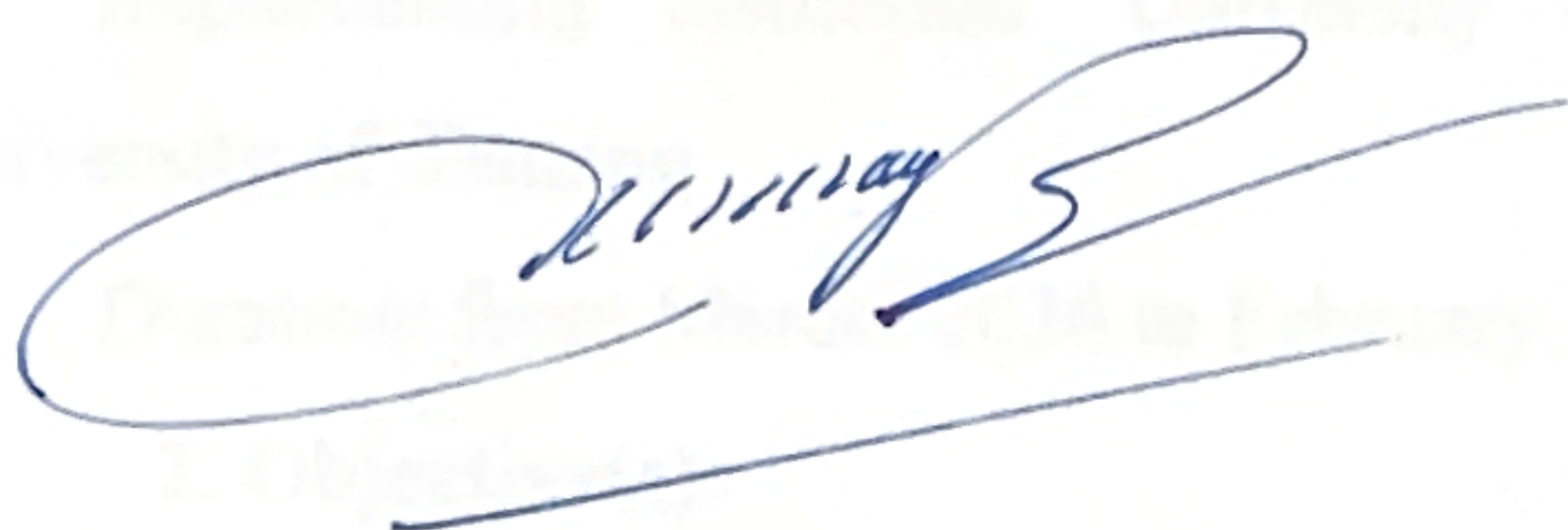
TM. Hội đồng Khoa

Chủ tịch

(ký, họ và tên)

Chủ nhiệm đề tài

(ký, họ và tên)




TS. Huỳnh Thị Diễm Uyên

TS. Trần Thị Ngọc Thu

XÁC NHẬN CỦA TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM KỸ THUẬT

KT. HIỆU TRƯỞNG

PHÓ HIỆU TRƯỞNG



PGS. TS. Võ Trung Hùng

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information:

Project title: **Research on methods for the extraction of bio-oil from *Chlorella vulgaris***

Code number: T2023-06-01

Principal Investigator: Dr. Tran Thi Ngoc Thu

Coordinator: Dr. Nguyen Thi Dong Phuong, Mcs. Nguyen Hoang Phuc Son

Implementing institution: University of Technology and Education, The University of Danang

Duration: from March, 2024 to February, 2025

2. Objective(s):

The aim of the study is to investigate and select an extraction method for bio-oil from *Chlorella vulgaris* microalgae that achieves high extraction efficiency.

3. Creativeness and innovativeness:

The study optimizes the conditions for ultrasound-assisted extraction using an environmentally friendly solvent system consisting of hexane/ethanol, aiming for efficient extraction yield

4. Research results:

Microalgae are increasingly recognized as a promising future source of transportation fuel, primarily due to their bio-oil potential. Among the numerous species screened, *Chlorella vulgaris* has emerged as one of the most promising candidates for biodiesel production. Studies on its cultivation indicate that *Chlorella vulgaris* follows a typical growth curve, where biomass accumulation depends on the initial inoculum size and cultivation conditions. Growth slows upon reaching the equilibrium phase before gradually declining. Cultured algae samples exhibited normal development in the cultivation system, yielding dry biomass that met the required standards for macronutrient composition, chlorophyll, and polyphenols. Among seven solvent systems tested—including single solvents (chloroform, ethyl acetate, diethyl ether, hexane) and mixed solvents (hexane/ethanol, hexane/methanol, diethyl ether/methanol)—the hexane/ethanol system (3:1 v/v) provided the highest lipid extraction efficiency, reaching 198.6 ± 5.5 mg/g, while also being environmentally

friendly. Four extraction methods were evaluated: soaking, shaking, Soxhlet, and ultrasound-assisted extraction (UAE). Results demonstrated that UAE achieved the highest extraction efficiency, followed by Soxhlet (124.3 ± 7.4 mg/g), whereas soaking yielded the lowest efficiency (58.6 ± 5.1 mg/g). Key factors influencing UAE were examined using a univariate approach, considering extraction temperature (30–60°C), ultrasound duration (10–70 minutes), and ultrasound power (50–90%). Optimization of extraction conditions was performed using response surface methodology (RSM) with a Box-Behnken design. The findings confirmed that all these factors significantly influenced lipid extraction efficiency and aligned with the predictive model. Using Minitab software for optimization simulations, the ideal UAE conditions were determined as an ultrasound temperature of 45.35°C and a duration of 33.33 minutes. Experiments conducted under these optimized conditions resulted a bio-oil from *Chlorella vulgaris* extraction efficiency of 274.05 ± 10.47 mg/g, with no statistically significant deviation from the predicted model value.

5. Products:

01 article published in the Journal of Molecular Biotechnology in the ESCI/Q1 category

6. Effects, transfer alternatives of reserach results and applicability:

Guide students in scientific research and university graduation in the field of education and training.

- Collect denitrifying bacteria strains to apply for treatment.
- Method of transferring research results: Directly hand over the project's products to the Department of Chemical and Environmental Technology, University of Technical Education, University of Danang.
- Application address:

Used as a teaching material for Analytical Techniques courses in Biotechnology/Food Technology, Food Microbiology for students of the Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Environmental Technology, University of Technical Education (100 students) and for Universities and Colleges in Da Nang City.

MỞ ĐẦU

1. Tổng quan nghiên cứu trong và ngoài nước

Vi tảo là sinh vật nguyên sinh có thể thực hiện quá trình quang hợp, bao gồm vi khuẩn lam nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn như tảo xanh và phát triển chủ yếu ở nước ngọt và nước biển. Theo thống kê, có hơn 10^5 - 10^6 loài vi tảo trong tự nhiên chứa nhiều chất chuyển hóa vĩ mô và vi mô, bao gồm protein, carbohydrate, lipid, phenol và khoáng chất. Các hợp chất hoạt tính sinh học có trong vi tảo đã được chứng minh là có tiềm năng sử dụng trong y học, thực phẩm, năng lượng sinh học và các lĩnh vực khác. Ngoài hàm lượng cao các hợp chất có hoạt tính sinh học, vi tảo còn có những ưu điểm khác nên được sử dụng rộng rãi: a) vi tảo phát triển trong nước nên tiết kiệm được diện tích đất đang sử dụng để trồng trọt và giảm bớt áp lực về đất đai; b) so với các loại cây trồng khác, vi tảo phát triển và sinh sản cực kỳ nhanh và có thể tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt hơn; c) trong sản xuất nông nghiệp, vi tảo cũng có thể được sử dụng để cải thiện độ phì nhiêu của đất bằng cách thúc đẩy chu trình dinh dưỡng của đất, đóng vai trò tích cực trong sự phát triển của cây trồng[1][2].

Hiện nay, vi tảo được quảng bá như một nguồn nhiên liệu vận chuyển trong tương lai chủ yếu vì tiềm năng đã được công bố của chúng là sản xuất lượng dầu trên mỗi mẫu Anh nhiều hơn tới 10 lần so với cây trồng nhiên liệu sinh học truyền thống[1]. Lipid trong vi tảo bao gồm các lipid phân cực như phospholipid và glycolipids và các lipid trung tính như triacylglycerol. Ngoài ra, vi tảo vẫn là nguồn cung cấp lượng lớn axit béo không bão hòa đa (PUFA) bao gồm docosahexaenoic (DHA) và axit eicosapentaenoic (EPA). Những UFA này cũng đã được chứng minh là có đặc tính chống oxy hóa, ngăn ngừa tăng huyết áp và cho thấy tác dụng điều hòa miễn dịch. Dầu sinh học từ vi tảo có thể được ứng dụng làm nhiên liệu thay thế, dầu ăn nhiều hợp chất hoạt tính sinh học trong dầu được sử dụng mỹ phẩm, dược phẩm như acid béo omega-3. Một số loài vi tảo hiện đang được nghiên cứu sử dụng làm nguồn dầu sinh học[1][2].

Các loài có hàm lượng lipid cao được kể đến như *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp., *Tetraselmis* sp., *Botryococcus* sp., *Desmodesmus* sp., *Nannochloropsi* sp., *Monoraphidium* sp., *Dunaliella* sp, có hàm lượng lipid chiếm trên 30% Một trong những vi tảo được trồng chủ yếu để sản xuất dầu diesel sinh học là *Chlorella vulgaris*, là chủng có triển vọng nhất trong số 3.000 loài được sàng lọc.

Chúng là một loại tảo xanh nước ngọt, phát triển nhanh, có khả năng sản xuất lipid khác nhau (30–40% trọng lượng khô) trong điều kiện tự nhiên. Chúng có chứa axit béo là C18 bão hòa và không bão hòa, một thành phần tương tự như dầu thực vật, có thể được tách bằng phương pháp ép kỹ thuật, Soxhlet, sử dụng CO₂ siêu tới hạn hoặc dung môi hóa học[3][4][5]. Obeid và cộng sự (2018) đã sử dụng SC-CO₂ kết hợp với ethanol làm đồng dung môi để chiết xuất lipid trung tính từ *Nannochloropsis oculata* và *Chlorella vulgaris* đông khô. Trong điều kiện tối ưu, tỷ lệ chiết xuất lipid của *Nannochloropsis oculata* và *Chlorella vulgaris* lần lượt là 83% và 97%. Tương tự, Viguera và cộng sự (2016) cũng đã tối ưu hóa các điều kiện chiết lipid từ SC-CO₂ từ vi tảo (*Chlorella protothecoides*), cho thấy tốc độ chiết lipid cao nhất ở 300 bar và 70°C [6]. Bilel Hadrich và cộng sự đã đạt được điều kiện chiết lỏng tối ưu là 30 phút-60°C, sử dụng dung môi Chloroform/methanol =2/1 (v/v), đạt hàm lượng chiết là 22,60 %, cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu [7].

Các báo cáo của về vi tảo *Chlorella* sp. báo cáo rằng tiền xử lý siêu âm có thể làm tăng năng suất chiết và giảm thời gian chiết lên hơn 15 lần so với chiết xuất hữu cơ thông thường[3][8]. *Chlorella vulgaris* Beijerinck được phân lập từ Vịnh Laguna, Philipin đã được nuôi cấy và khảo sát điều kiện chiết siêu âm với dung môi chiết hloroform:metanol 2:1 (v:v) ở tỷ lệ 1:20 (g:ml) tảo:dung môi thu được 51% lipid thô (theo trọng lượng khô). Do quá trình chiết xuất dầu sinh học theo khả năng khuếch tán là chính, nên việc lựa chọn dung môi trích ly là yếu tố nâng cao hàm lượng lipid thu hồi [9].

Từ 35 mẫu nước từ ao hồ tại một số quận huyện tại TP Hồ Chí Minh, Nguyễn Thị Mỹ Lan và cộng sự đã khảo sát khả năng tăng trưởng và tích lũy lipid nội bào của 8 chủng vi tảo nước ngọt và 13 chủng vi tảo nước mặn thông qua phương pháp Sàng lọc nhanh bằng tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red. hàm lượng lipid của những loài này dao động từ 8,89 % đến 29,12 % sinh khối khô có nhiều tiềm năng trong thu nhận lipid để sản xuất biodiesel., nhất là 2 chủng N12 - *Pediastrum duplex* Meyen (25,34 % - 27,35 %) và M16 – *Tetraselmis* sp. (28,32 % - 29,12 %)[10].

Nhóm nghiên cứu của tác giả Đặng Diễm Hồng (2020) đã có nhiều khảo sát về các loài vi tảo có tiềm năng sản xuất lipid như *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 cho hàm lượng lipid tổng số $20,342 \pm 1,247\%$, trong đó tổng hàm lượng omega-3,6,7,9 chiếm 53,41% so với axit béo tổng số là nguồn nguyên liệu tốt cho sản xuất dầu sinh học giàu axit béo không no omega-3, 6, 7, 9 để ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng [11].

Đặng Thị Ngọc Mai và cộng sự (2013) đã tách chiết lipid từ vi tảo biển *Tetraselmis* sp đạt 6,12-13,5 % trọng lượng khô và chuyển hóa diesel sinh học từ sinh khối tảo ở quy mô phòng thí nghiệm, làm cơ sở cho những cải tiến quy trình công nghệ tiếp theo để có thể sản xuất thương mại diesel sinh học từ vi tảo biển này ở quy mô lớn hơn [12].

Hồ Quốc Phong và cộng sự (2014) đã tiến hành khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và tích lũy chất béo của vi tảo *Chlorella* sp. như cường độ sáng, thời gian, nhiệt độ và độ mặn của nước. Kết quả cho thấy rằng vi tảo *Chlorella* sp. có thể đạt được nồng độ sinh khối 0,306 g/L với chất béo tích lũy lên đến 35,86% khi được nuôi cấy ở điều kiện cường độ chiếu sáng 1342 lux, nhiệt độ 25°C, độ mặn của nước 0‰ và thời gian nuôi cấy là 8 ngày. Thêm vào đó, thành phần acid béo của vi tảo *Chlorella* sp. chủ yếu là C16 - C18, đây là nguyên liệu phù hợp cho tổng hợp biodiesel [13].

Nguyễn Trung Thành và cộng sự (2015) đã nghiên cứu các điều kiện công nghệ của quá trình trích li dầu từ sinh khối vi tảo họ *Botryococcus*. Kết quả cho thấy trong các điều kiện khác nhau, hiệu suất trích li thay đổi và đạt hiệu suất cao nhất là 37,36 % so với khối lượng sinh khối khô khi sử dụng hệ dung môi n- hexan/etanol có tỉ lệ thể tích 2/1, tại nhiệt độ trích li 60 oC và thời gian trích li 10 giờ. Kết quả phân tích GC-MS lipid đã chỉ ra loại dầu này chứa một lượng lớn hydrocacbon – chủ yếu là n-heptadecan, bên cạnh thành phần chính của dầu là các triglycerit và các axit béo tự do [14].

Mặc dù nguồn tài nguyên tảo rất dồi dào nhưng các phương pháp chiết xuất lipid hiện nay chủ yếu dựa trên thực phẩm có nguồn gốc động vật. Vì vậy, lipid từ tảo vẫn cần được nghiên cứu và phát triển.

2. Tính cấp thiết của đề tài

Một số phương pháp chiết xuất hiệu quả cao và chi phí thấp đã được khám phá để thu được và thu hồi lipid có giá trị gia tăng cao trong vi tảo và cải thiện đáng kể tỷ lệ sử dụng, điều này cũng phù hợp với nhu cầu phát triển bền vững. Các phương pháp chiết xuất truyền thống như chiết xuất bằng dung môi, chưng cất và ép có một số nhược điểm nhất định, bao gồm hiệu suất chiết xuất thấp hơn, năng suất giảm và sử dụng một lượng lớn dung môi hoặc tài nguyên. Hơn nữa, một số phương pháp chiết xuất đòi hỏi nhiệt độ cao, có thể ảnh hưởng xấu đến một số thành phần hoạt tính sinh học. Việc sử dụng dung môi hóa học đặt ra các vấn đề về an toàn và sức khỏe. Chiết

xuất siêu tới hạn đòi hỏi chi phí về thiết bị và năng lượng. Nhiều phương pháp chiết tách dầu sinh học từ tảo đã được nghiên cứu nhưng đến nay vẫn loay hoay quanh vấn đề kinh tế khi so sánh hiệu suất thu dầu sinh học với các nguyên liệu khác. Do đó, các nhà nghiên cứu đang khám phá các công nghệ không nhiệt để phát triển các phương pháp chiết xuất hiệu quả và thân thiện với môi trường. Chiết xuất hỗ trợ siêu âm (UAE) được công nhận là công nghệ chiết xuất thân thiện với môi trường và hiệu quả cao. UAE có tiềm năng giảm thiểu hoặc loại bỏ nhu cầu về dung môi hữu cơ, do đó giảm tác động của nó đến môi trường.

Do đó đề tài “**Nghiên cứu các phương pháp chiết tách dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris***” được lựa chọn thực hiện.

3. Mục tiêu, đối tượng nghiên cứu của đề tài:

Mục tiêu

Mục tiêu của đề tài là khảo sát lựa chọn phương pháp trích ly dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris* cho hiệu quả trích ly cao.

Đối tượng nghiên cứu

Vi tảo *Chlorella vulgaris* là đối tượng nghiên cứu, do phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Bộ môn Công nghệ Sinh học-Khoa Công nghệ Hóa học-Môi trường, trường ĐH Sư phạm Kỹ thuật, Đại học Đà Nẵng cung cấp

Phạm vi nghiên cứu

Vi tảo *Chlorella vulgaris* được nuôi trong môi trường dinh dưỡng BBM để sử dụng để nghiên cứu chiết dầu sinh học. Quy trình nuôi cấy *Chlorella vulgaris* trên mô hình có thể tích 1,5 lít

4. Cách tiếp cận và phương pháp nghiên cứu

Cách tiếp cận

Trong nghiên cứu này, vi tảo *Chlorella vulgaris* được nuôi trong môi trường Bold's Basal medium (BBM) bằng dịch giống trong các bình dung tích 1,5L. Điều kiện nuôi cấy ở nhiệt độ phòng 25 ± 2 °C, với mật độ ánh sáng trắng, sục khí liên tục. Tiến hành theo dõi giá trị mật độ quang học của môi trường tại bước sóng 682 nm (OD₆₈₂) đến khi không đổi sẽ được thu hồi sinh khối. Tiến hành thu nhận bằng cách

ly tâm loại bỏ dịch nuôi cấy, bảo quản vi tảo bằng phương pháp sấy khô (40°C) để dùng cho các thí nghiệm trích ly dầu sinh học.

Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp khảo sát lựa chọn dung môi hữu cơ phù hợp để trích ly dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris* : Sử dụng các loại dung môi từ không phân cực đến phân cực yếu và phân cực (hexan, methanol, chloroform, ethyl acetate, ether dầu hỏa, hexan/methanol, chlorform/methanol) để khảo sát. Tiến hành ngâm chiết mẫu tảo với cùng điều kiện (nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu), đánh giá hàm lượng dầu sinh học và thành phần dầu sinh học thu được để lựa chọn dung môi thích hợp.
- Khảo sát lựa chọn các phương pháp chiết (ngâm, lắc, sohxlet, siêu âm) cho hiệu quả trích ly lipid cao từ vi tảo *Chlorella vulgaris*: Với loại dung môi lựa chọn, thực hiện khảo sát chiết dầu sinh học bằng các phương pháp khác nhau để lựa chọn phương pháp phù hợp
- Tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học bằng phương pháp siêu âm: Thực hiện khảo sát đơn biến nhiệt độ chiết, thời gian chiết siêu âm, % năng lượng siêu âm. Tiến hành thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết theo mô hình Box Behnken
- Phương pháp phân tích: Đánh giá chất lượng dầu ở các phương pháp chiết bằng các phương pháp phân tích sau:

- + Hiệu suất thu nhận dầu sinh học thô: Hàm lượng dầu sinh học được định lượng bằng phương pháp sấy khô đến khối lượng không đổi: Từ dịch chiết được, tiến hành sấy khô đuổi dung môi (50°C) đến khối lượng không đổi. Hiệu suất thu nhận dầu sinh học thô:

$$H(\text{mg/g}) = \frac{m_1}{m}$$

Trong đó: m_1 : khối lượng dầu sinh học chiết được(mg);

m : khối lượng tảo sử dụng (g)

Phân tích định tính thành phần các hợp chất trong dầu sinh học:

- + Sử dụng bản mỏng TLC (thin layer chromatography) với hệ pha động Petroleum ether/Diethyl ether/acid acetic. Dựa vào sự phân tách để đánh giá thành phần.

Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu này thực hiện theo các bước sau ở quy mô phòng thí nghiệm:

- Xây dựng đề cương nghiên cứu thu nhận dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris*.
- Nghiên cứu lý thuyết phương pháp thu nhận bằng các phương pháp chiết ngâm, lắc, sohxlet, siêu âm
- Nghiên cứu lựa chọn dung môi hữu cơ phù hợp để trích ly dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris*: Với các loại hexane, methanol, chloroform, ethyl acetate, ether dầu hỏa, acetone và đồng dung môi hexane/methanol, chlorform/methanol có độ phân cực từ không phân cực đến phân cực, tiến hành ngâm chiết (nhiệt độ 25°C, thời gian 7 ngày, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu) để khảo sát. Hiệu suất chiết dầu sinh học từng mẫu được đánh giá thông qua hiệu suất thu nhận và định tính thành phần bằng bản mỏng TLC.
- Nghiên cứu lựa chọn các phương pháp chiết cho hiệu quả cao trong trích ly dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris*: Với loại dung môi lựa chọn, thực hiện khảo sát chiết dầu sinh học bằng các phương pháp khác nhau để lựa chọn phương pháp phù hợp với cùng tỉ lệ dung môi/nguyên liệu. Đánh giá hiệu quả chiết theo hàm lượng dầu sinh học thu được.
- Tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học bằng phương pháp siêu âm: Thực hiện khảo sát đơn biến nhiệt độ chiết (30-70°C), thời gian chiết siêu âm (5-60), % mức năng lượng siêu âm (50,60,70,80%) để đánh giá hiệu quả chiết theo hàm lượng dầu sinh học thu được. Trên cơ sở các khảo sát đơn biến, tiến hành thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết hàm lượng dầu sinh học với 3 yếu tố ảnh hưởng nhiệt độ siêu âm, thời gian siêu âm và mức năng lượng siêu âm theo mô hình Box-Behnken. Đánh giá hiệu quả chiết theo hàm lượng dầu sinh học thu được.

Kết quả của đề tài được tóm lược qua 3 chương như sau:

Mở đầu

Chương 1: Tổng quan tài liệu các nghiên cứu trong và ngoài nước

Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Chương 3: Kết quả và thảo luận

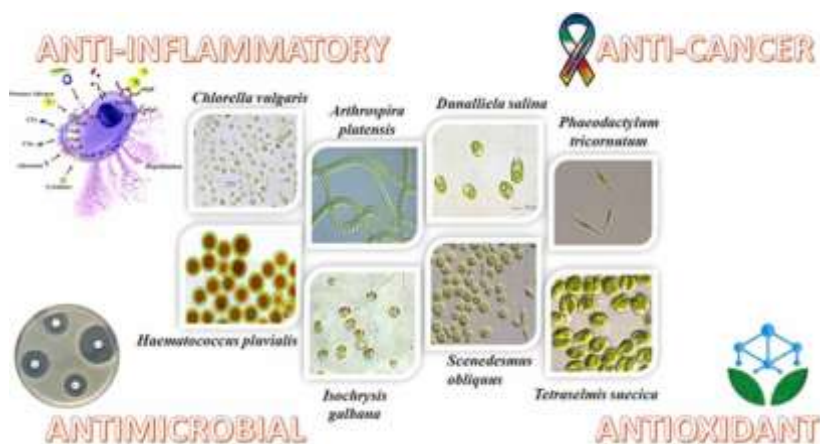
Kết luận và kiến nghị

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Vi tảo và tiềm năng ứng dụng của vi tảo trong thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm

1.1.1. Đặc điểm chung của vi tảo

Vi tảo là vi sinh vật quang hợp đơn bào hoặc đa bào đơn giản, thường có thể được tìm thấy trong môi trường nước như nước ngọt, nước biển hoặc hồ siêu mặn. Các sinh vật này có thể là sinh vật nhân chuẩn hoặc nhân sơ, sinh vật nhân sơ là vi khuẩn lam, thường được gọi là vi tảo. Vi tảo có thể được nuôi cấy quang tự dưỡng trong các hệ thống phản ứng quang sinh khép kín hoặc ao hở, sử dụng ánh sáng mặt trời, CO₂ và các chất dinh dưỡng vô cơ để phát triển, tạo ra sinh khối và O₂. Tuy nhiên, sản xuất quang tự dưỡng quy mô lớn thông thường gặp phải tình trạng mật độ sinh khối thấp do hạn chế ánh sáng cản trở sự phát triển của tế bào, làm tăng đáng kể chi phí sản xuất. Ngoài ra, vi tảo có thể được nuôi cấy trong điều kiện hỗn hợp hoặc dị dưỡng, tương ứng khi có và không có ánh sáng, bổ sung cacbon hữu cơ làm chất dinh dưỡng, đã phổ biến trong sản xuất thương mại, giúp tăng năng suất sinh khối tảo[1][15].



Hình 1.1. Hình ảnh vi tảo dưới kính hiển vi

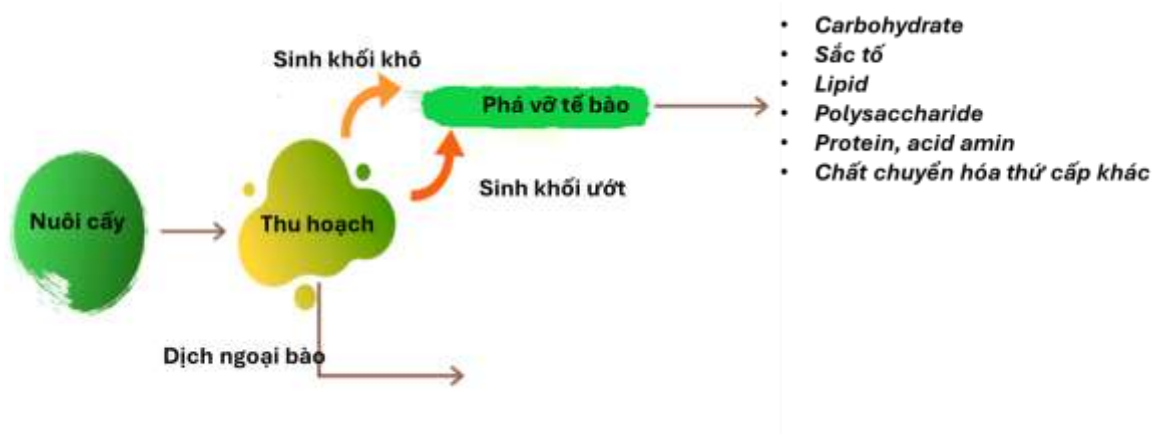
Nhóm tảo rất đa dạng và bao gồm nhiều ngành khác nhau với các đặc điểm hình thái, điều kiện nuôi cấy (hình 1.1) [16], từ vi khuẩn lam đơn bào nhân sơ đến tảo đa bào nhân chuẩn phức tạp hơn, như được tóm tắt trong bảng 1.1 [17].

Bảng 1.1. Phân loại và đặc tính vi tảo

Ngành	Đặc tính	Chi
Cyanobacteria	Tảo lam hay vi khuẩn lam là vi khuẩn gram âm có thể sống sót ở một số môi trường sống khắc nghiệt nhất trên trái đất. Một số trong số chúng được biết là có khả năng cố định nitơ cùng với cố định cacbon, cả hai đều cần thiết cho sự sống trên trái đất.	<i>Prochlorococcus</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Cyanothece</i> , <i>Anabaena</i>
Glaucocystophytes	Glaucocystophytes là loại tảo nhân thực đơn bào tương đối hiếm có chứa lục lạp có cấu trúc tương tự như tảo lam. Tảo lam là một trong những hậu duệ của sản phẩm cộng sinh sớm.	<i>Cyanophora</i> , <i>Glaucocystis</i> , <i>Peliaina</i> , <i>Gloeochaete</i>
Rhodophytes	Rhodophytes hay còn gọi là tảo đỏ chủ yếu bao gồm các sinh vật nhân thực quang hợp đa bào. Chúng được đặc trưng bởi màu đỏ đặc trưng do sự hiện diện của các sắc tố đỏ như phycobilisome trong lục lạp của chúng.	<i>Batrachospermum</i> , <i>Chroodactylon</i> , <i>Bangia</i> , <i>Cyanidium</i> , <i>Compsopogon</i>
Chlorophytes	Chlorophytes hay còn gọi là tảo lục có tế bào nhân thực quang hợp có chứa diệp lục là sắc tố quang hợp chính của chúng.	<i>Haematococcus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Graesiella</i> , <i>Scenedesmus</i>
Charophytes	Charophytes chủ yếu là tảo trên cạn và nước ngọt. Chúng có những đặc điểm đáng chú ý giống với thực vật trên cạn, cho thấy tổ tiên của charophytes đã tạo ra thực vật trên cạn.	<i>Coleochaete</i> , <i>Micrasterias</i> , <i>Chara</i> , <i>Penium</i> , <i>Klebsormidium</i>
Chlorarachinophytes	Chlorarachinophytes là sinh vật nguyên sinh sống ở biển quang hợp có lục lạp thứ cấp có nguồn gốc từ cộng sinh thứ cấp.	<i>Chlorarachnion</i> , <i>Lotharella</i> , <i>Bigelowella</i>
Euglenoids	Euglenoids là sinh vật nhân chuẩn đơn bào có roi, biểu hiện cả đặc điểm giống động vật và thực vật. Hầu hết Euglenoid là loài nước ngọt trong khi một số là loài biển.	<i>Euglena</i> , <i>Discoplastis</i> , <i>Phacus</i> , <i>Colacium</i> , <i>Strombomonas</i>
Apicomplexans	Apicomplexans là một nhóm ký sinh trùng nội bào bắt buộc gây ra nhiều bệnh khác nhau ở động vật và con người.	<i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Cryptosporidium</i>
Dinoflagellates	Dinoflagellates là một lớp sinh vật nguyên sinh đơn bào và được đặc trưng bởi nhân tương đối lớn, lục lạp màu nâu vàng và phương pháp bơi độc đáo của chúng.	<i>Gymnodinium</i> , <i>Karenia</i> , <i>Dinophysis</i> , <i>Alexandrium</i>
Heterokontophytes	Heterokontophytes là sinh vật nhân chuẩn quang hợp có roi. Chúng được đặc trưng bởi	<i>Chrysophyceae</i> , <i>Parmophyceae</i> ,

	hai roi của chúng có chiều dài khác nhau.	<i>Xanthophyceae</i> , <i>Dictyophyceae</i>
Haptophytes	Haptophytes là vi tảo đơn bào quang hợp với lục lạp có nguồn gốc từ quá trình cộng sinh nội bào của tảo đỏ. Nó thường có 2 roi bằng nhau hoặc không bằng nhau cho phép nó di chuyển.	<i>Chrysochromulina</i> , <i>Prymnesium</i> , <i>Pavlova</i> , <i>Diacronema</i>
Cryptophytes	Cryptophytes là sinh vật đơn bào di chuyển và quang hợp, có 2 roi đặc trưng, thường được tìm thấy trong môi trường nước ngọt và nước biển.	<i>Guillardia</i> , <i>Campylomonas</i> , <i>Geminigera</i> , <i>Rhodomonas</i> , <i>Teleaulax</i>

Khi so sánh với thực vật bậc cao, vi tảo có một số ưu điểm như năng suất cao hơn, không theo mùa và trong trường hợp không cạnh tranh với thực phẩm của con người khi dùng để sản xuất nhiên liệu sinh học[15]. Theo ước tính, có khoảng 200.000 đến 800.000 loài vi tảo và hơn 15.000 sinh khối vi tảo mới đã được xác định. Vi tảo được xem như là nhà máy cấp tế bào được điều khiển bằng ánh sáng, tổng hợp các hợp chất hoạt tính sinh học từ các chất chuyển hóa chính (lipid, protein và carbohydrate) và các chất chuyển hóa thứ cấp (sắc tố, carotenoid, vitamin và sterol) ở nhiều giai đoạn tăng trưởng khác nhau (hình 1.2) [15][18].



Hình 1.2. Quy trình tóm tắt sản xuất các sản phẩm nội bào và ngoại bào từ vi tảo

Trong 20 năm qua, ứng dụng công nghệ sinh học tập trung vào bốn loài tảo vi mô chính là *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* và *Haematococcus pluvialis*. Chúng đã được thương mại hóa và sử dụng rộng rãi, chủ yếu là thực phẩm bổ sung dinh dưỡng cho con người và phụ gia thức ăn chăn nuôi cũng như chiết xuất các thành phần có hoạt tính sinh học [16][19].

1.1.2. *Spirulina*

Spirulina từ lâu đã được người Aztec nuôi trồng vào thế kỷ 16 trong vùng nước mặn của Hồ Texcoco. Họ đã sấy khô tảo thu hoạch được và thương mại hóa dưới dạng bánh sấy khô, nhận ra giá trị của nó như một nguồn thực phẩm bổ dưỡng. Kể từ những năm 1960, *Spirulina* đã được sản xuất trong các hệ thống nuôi trồng quy mô công nghiệp và được tiếp thị trên toàn cầu. Năm 2003, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã cấp cho *Spirulina* trạng thái "GRAS- Generally Recognized As Safe" (Được công nhận chung là an toàn). Điều thú vị là một hiện tượng được gọi là "spiruliners" đã xuất hiện ở miền nam nước Pháp. Một số nông dân đã chuyển đổi từ các hoạt động nông nghiệp truyền thống sang sản xuất sinh khối *Spirulina*. Xu hướng này cũng có thể khả thi đối với nhiều quốc gia châu Phi, nơi có khí hậu thuận lợi cho việc trồng tảo *Spirulina*. Hơn nữa, Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp (FAO) khuyến nghị việc trồng tảo *Spirulina* là một trong những giải pháp khả thi trong các cuộc khủng hoảng nhân đạo do việc trồng tảo *Spirulina* đòi hỏi ít không gian hơn đáng kể so với canh tác thông thường, ít hơn khoảng 49 đến 132 lần so với diện tích trồng rau. Tảo xoắn được nuôi trồng ở nhiều quốc gia, bao gồm Israel, Hoa Kỳ, Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, Ý, Đức, Thái Lan, Pháp và Ai Cập [20][21].

Các phương pháp nuôi cấy bao gồm nuôi cấy mở trong ao nhân tạo, lò phản ứng quang sinh học mở tiên tiến sử dụng ánh sáng mặt trời và lò phản ứng quang sinh học kín với ánh sáng nhân tạo và nhiệt độ được kiểm soát. Ưu điểm của các phương pháp nuôi cấy này bao gồm dễ thu hoạch và sấy khô sinh khối, chiết xuất hiệu quả các thành phần tế bào và giá trị sinh học cao. Ngoài ra, tảo xoắn phát triển mạnh trong điều kiện kiềm (pH 8,5–11), khiến cho nuôi cấy của nó có khả năng chống lại sự nhiễm bẩn của vi khuẩn và các loại tảo siêu nhỏ khác. Hai loài quan trọng nhất của tảo xoắn là *Spirulina maxima* và *Spirulina platensis*. Nó tạo thành các trichome (xoắn ốc) dài khoảng 0,5 mm, đủ lớn để tách khỏi môi trường nuôi cấy một cách đơn giản và tiết kiệm chi phí thông qua quá trình lọc [20][21].

Một nhược điểm đáng kể của nuôi cấy *Spirulina* là chi phí cao của môi trường nuôi cấy gốc hóa chất. Hiện nay, nhiều công ty sử dụng môi trường nuôi cấy gốc hóa chất như Zarrouk, Conway và Kosaric để nuôi cấy *Spirulina*. Môi trường Zarrouk từ lâu đã được công nhận là môi trường tiêu chuẩn và tối ưu cho nhiều loài *Spirulina*. Trong sản xuất công nghiệp quy mô lớn, đây vẫn là môi trường thông thường duy nhất được sử dụng để nuôi cấy *Spirulina*. Bao gồm chủ yếu là natri bicarbonate, cùng với

natri nitrat, kali sunfat, magiê sunfat, canxi clorua và dikali hydro photphat, môi trường Zarrouk hỗ trợ tăng trưởng sinh khối hiệu quả bằng cách cung cấp các chất bổ sung dinh dưỡng thiết yếu. Tuy nhiên, môi trường nuôi cấy Zarrouk không bền vững về lâu dài do chi phí cao. Với giá khoảng 0,08 đô la Mỹ một lít, môi trường này chiếm khoảng 35% tổng chi phí sản xuất sinh khối tảo. Do đó, cộng đồng khoa học đã khám phá nhiều nguồn dinh dưỡng thay thế khác nhau, chẳng hạn như nước biển, phân giun và nước thải, để giảm chi phí cho môi trường nuôi cấy gốc hóa chất. Trong số này, nước thải cho thấy triển vọng như một nguồn dinh dưỡng thay thế [20][21].

Tảo xoắn thực sự là nguồn giàu chất dinh dưỡng, chứa một lượng lớn protein (60–70% trọng lượng khô) và các axit amin thiết yếu (47% tổng trọng lượng protein). Tỷ lệ protein của *Spirulina* cao hơn so với các nguồn protein thực vật hoặc động vật thường được sử dụng, chẳng hạn như đậu nành (35%), đậu phộng (25%), ngũ cốc (8–14%), thịt và cá (15–25%), trứng (12%), sữa bột (35%) và sữa nguyên chất (3%). Hàm lượng protein của *Spirulina* có thể thay đổi từ 50–75% tùy thuộc vào thời điểm thu hoạch, với giá trị protein cao nhất thường thu được từ những loại được thu hoạch vào đầu ngày. Ngoài hàm lượng protein cao, *Spirulina* còn giàu carbohydrate (15–25%), chủ yếu là polysaccharides (glucosans và rhamnosans) và monosaccharides hoặc disaccharides (glucose, fructose và sucrose). *Spirulina* cung cấp tất cả các khoáng chất thiết yếu (7–13%), bao gồm kali, canxi, crom, đồng, sắt, magiê, mangan, phot pho, selen, natri và kẽm. Nó cũng giàu vitamin, đặc biệt là một số vitamin nhóm B (B1, B2, B3, B6, B9 và B12), cũng như tiền vitamin A và vitamin C, D và E. Ngoài ra, *Spirulina* chứa các sắc tố quang hợp tự nhiên, đóng vai trò là nguồn chính của phycocyanin (14–20%), cùng với diệp lục (1%) và carotenoid (0,5%). Tảo xoắn chứa ít chất béo (6–8% lipid theo trọng lượng khô) khiến nó ít bị oxy hóa lipid và ôi thiu hơn [20][21].

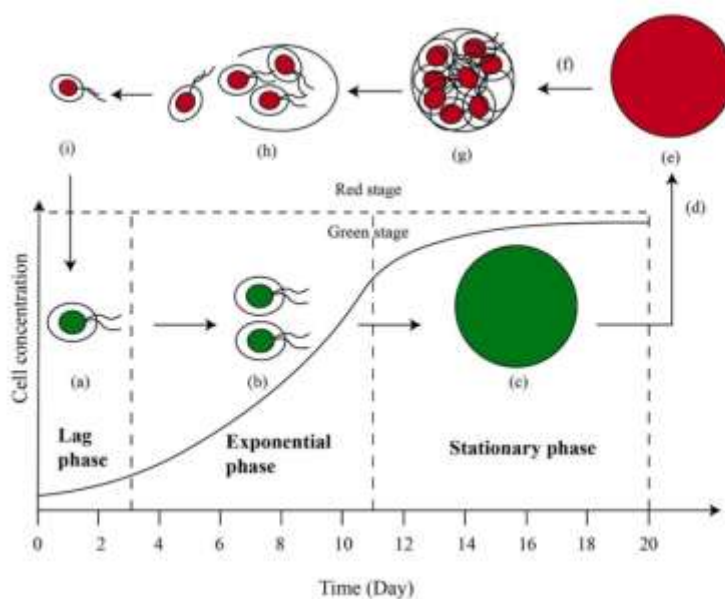
Với các đặc tính dinh dưỡng cân đối và dễ tiêu hóa của protein cũng như các vi chất khác nên việc tiêu thụ trực tiếp *Spirulina* như một chất bổ sung dinh dưỡng trở thành cách hiệu quả nhất về mặt chi phí. *Spirulina* có thể được sản xuất dưới dạng bột, lỏng, dầu, viên nén hoặc viên nang. Sinh khối của chúng được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp sản xuất bánh quy, mì ống được đánh giá cao. Việc bổ sung tảo xoắn vào bánh quy dẫn đến sự gia tăng cả về tỷ lệ protein các axit béo, chẳng hạn như omega-3, omega-6, omega-7 và omega-9, trong đó omega-6 chứa phần trăm axit béo không bão hòa cao nhất, đặc biệt là axit linolenic và axit γ -linolenic. Ngoài ra cũng gia tăng cảm quan về màu sắc xanh tự nhiên của tảo. *Spirulina* được bổ sung trong các sản

phẩm sữa chua giúp tăng số lượng vi khuẩn lactic sống sót. Tuy nhiên, do sinh khối tảo có mùi tanh đặc trưng nên cần nghiên cứu thêm các giải pháp khắc phục để *Spirulina* được ứng dụng nhiều hơn [20][21].

1.1.3. *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis (*H. pluvialis*) được tìm thấy trong nước ngọt được công nhận là *Haematococcus lacustris*, thuộc phân loại phân loại của Lớp Chlorophyceae, bộ Chlamydomonadales và họ Haematococaceae. Thành phần tế bào chính của *H. pluvialis* khác nhau tùy theo loài. Ví dụ, hàm lượng protein, carbohydrate và lipid của *H. pluvialis* Rozhen-12 trong môi trường ½ ChR lần lượt chiếm khoảng 21,23%, 47,2% và 16,17% trọng lượng khô. Những phát hiện này cho thấy *H. pluvialis* có thể được nuôi trồng ở nước lợ. Ngoài ra, *H. pluvialis* còn thể hiện tiềm năng vượt trội để triển khai trong các hệ thống quản lý nước thải sinh hoạt nhằm mục đích loại bỏ NH_4^+ , NO_3^- và PO_4^{3-} . Điều này có thể là do khả năng chống lại các điều kiện bất lợi của vi tảo, cùng với khả năng hình thành nang và tích lũy astaxanthin như một cơ chế bảo vệ chống lại stress oxy hóa kéo dài do các yếu tố như cường độ ánh sáng quá mức, môi trường nước mặn và sự suy giảm chất dinh dưỡng[22][23][24].

H. pluvialis thể hiện vòng đời bao gồm bốn giai đoạn riêng biệt: phát triển tế bào sinh dưỡng, đóng kén, trưởng thành và nảy mầm (Niizawa và cộng sự, 2021). Các giai đoạn này gắn liền với các hình thái riêng biệt, bao gồm tế bào di động, tế bào không di động, bào tử động và bào tử aplanospore thể hiện ở hình 1.3.[25]

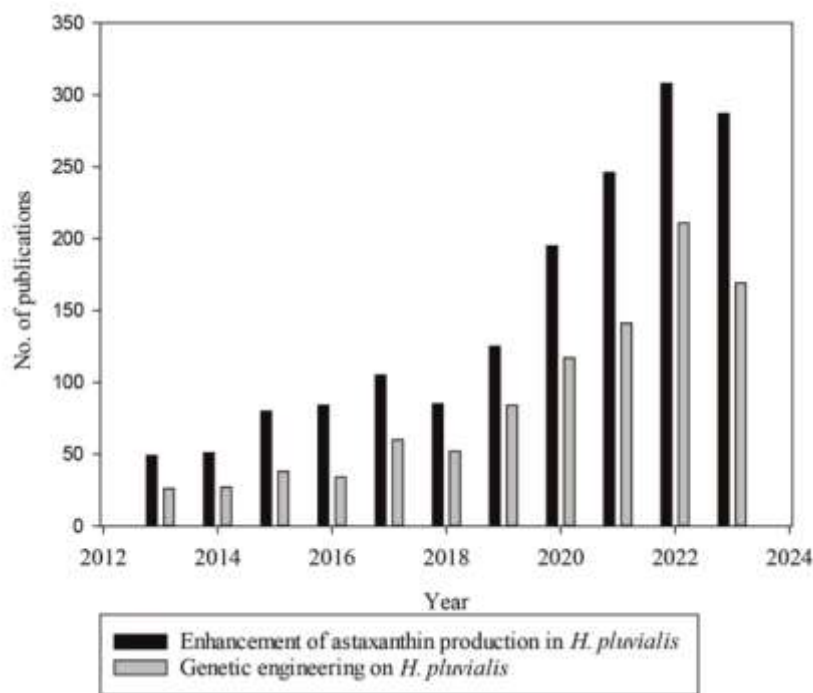


Hình 1.3. Vòng đời và hình thái tế bào

Haematococcus pluvialis (*H. pluvialis*), ở giai đoạn tăng trưởng tế bào sinh dưỡng chúng có màu xanh lá cây, di động và chủ yếu tham gia vào sự tăng trưởng, sinh sản và vận động. Nguyên nhân là do chúng chứa chủ yếu chất diệp lục, carotenoid, lipid, protein và carbohydrate, với hàm lượng astaxanthin thấp hoặc không thể phát hiện được. Trong điều kiện không thuận lợi như cường độ ánh sáng cao, độ mặn cao và cạn kiệt chất dinh dưỡng, các tế bào di động của *H. pluvialis* sẽ mất đi tiên mao và biến đổi thành các tế bào hình cầu hoặc hình bầu dục không di động, lúc đầu vẫn có màu xanh và vẫn có thể thực hiện sinh sản vô tính và hình thành bào tử. Theo thời gian, astaxanthin tích tụ ở trung tâm tế bào và trở thành aplanospore. Ngoài ra, các giọt dầu có hàm lượng lipid cao hình thành bên trong tế bào chất để dự trữ, dẫn đến màu đỏ do tích tụ astaxanthin. Các tế bào chuyển từ quang hợp sang dị dưỡng, sử dụng các nguồn carbon hữu cơ như acetate hoặc glucose. Bào tử bào tử chống lại các môi trường đặc biệt khắc nghiệt do phát triển lớp vỏ ba lớp dày đặc và không linh hoạt. Ở giai đoạn này, *H. pluvialis* chứa chủ yếu là astaxanthin, lipid, protein và carbohydrate. Ở giai đoạn phát triển tế bào này, nồng độ astaxanthin đạt cực đại ở mức 4% trọng lượng khô. Khi môi trường thuận lợi, bào tử bào tử tạo thành bào tử chứa tới 16 bào tử động vật, sau đó chúng sẽ được giải phóng. Các bào tử giàu astaxanthin có thể biến thành các tế bào di động chứa hàm lượng astaxanthin thấp do bị thoái hóa[26]. Các carotenoid thứ cấp như astaxanthin và canthaxanthin đóng một vai trò trong các cơ chế bảo vệ tế bào. Trong suốt nhiều năm, ngày càng có nhiều bằng chứng chứng minh vai trò của astaxanthin trong việc ngăn ngừa các bệnh khác nhau về sức khỏe, bao gồm các bệnh về tim mạch, bảo vệ da và mắt, đồng thời cung cấp khả năng chống bức xạ, lão hóa và ung thư. Nó có giai đoạn bào nang mạnh mẽ, nơi nó tích lũy astaxanthin với số lượng đáng kể, có khả năng dẫn đến năng suất cao hơn. [18][27].

Astaxanthin là một ketocarotenoid tự nhiên được tìm thấy rộng rãi ở động vật thủy sinh và tảo. Nó bao gồm một nhóm hydroxyl (-OH) và nhóm ketone (C=O) ở mỗi đầu của vòng ionone, giúp nó có khả năng trải qua quá trình este hóa và chống lại các gốc tự do. Các đặc tính chống oxy hóa của astaxanthin rất quan trọng để bảo vệ tế bào và loại bỏ gốc tự do. Trong suốt nhiều năm, ngày càng có nhiều bằng chứng chứng minh vai trò của astaxanthin trong việc ngăn ngừa các bệnh khác nhau về sức khỏe, bao gồm các bệnh về tim mạch, bảo vệ da và mắt, đồng thời cung cấp khả năng chống bức xạ, lão hóa và ung thư. Theo Thị trường Astaxanthin (2024), thị trường astaxanthin trên toàn thế giới được dự đoán sẽ đạt mức định giá thị trường là 665,0 triệu USD vào năm 2034, thể hiện tốc độ tăng trưởng kép hàng năm (CAGR) đáng chú

ý là khoảng 9,3% từ năm 2024 đến năm 2034[28][29]. Astaxanthin trình bày ba đặc điểm riêng biệt các đồng phân quang học, bao gồm dạng meso (3R, 3'S) và một cặp đồng phân đối ảnh (3 S,3'R và 3R,3'S), nhờ sự có mặt của hai nguyên tử cacbon bất đối nằm ở vị trí 3,3' chức vụ. Sự khác biệt rõ rệt trong thành phần của các đồng phân quang học giữa astaxanthin có nguồn gốc từ nhiều nguồn khác nhau. Đồng phân 3S, 3'S là cấu hình phổ biến được quan sát thấy ở vi tảo *H. pluvialis*. Hiệu quả của ba chất đồng phân quang học của astaxanthin trong việc ức chế tế bào ung thư ruột kết ở người đã được tìm thấy và cấu hình bất đối không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng thể hiện hoạt động chống ung thư của astaxanthin. Astaxanthin 3S,3'S cho thấy đặc tính chống oxy hóa và chống lão hóa tuyệt vời hơn đáng kể so với 3R,3'R và 3R,3'S astaxanthin. Điều này cho thấy rằng các đồng phân lập thể khác nhau có thể có các mục tiêu duy nhất trong cơ chế chống oxy hóa và chống lão hóa[30]. Sự tổng hợp hóa học của astaxanthin đã được công nhận đáng kể trong thập kỷ trước. Tuy nhiên, astaxanthin được tổng hợp về mặt hóa học chứa nhiều loại đồng phân có cấu trúc đa dạng, khiến nó không hiệu quả cho sự hấp thu sinh học. Vì vậy, việc sản xuất astaxanthin phục vụ y tế và chăm sóc sức khỏe của *H. pluvialis* ngày càng được quan tâm[31][25]. Theo dữ liệu thu được từ ScienceDirect, 7074 bài báo có thuật ngữ 'astaxanthin' và 2727 bài báo có thuật ngữ '*Haematococcus pluvialis*' có sẵn từ năm 2013 đến năm 2023. Tổng cộng có 1615 bài báo đã được xuất bản từ năm 2013 đến năm 2023 với thuật ngữ 'tăng cường sản xuất astaxanthin ở *Haematococcus pluvialis*'. Tổng cộng có 959 bài báo đã được xuất bản với thuật ngữ 'kỹ thuật di truyền trên *Haematococcus pluvialis*' từ năm 2013 đến năm 2023. Xem xét tính liên quan đến bản thảo hiện tại, 107 ấn phẩm đã được xem xét trong bài đánh giá này. Hình 1.3 minh họa số lượng ấn phẩm nghiên cứu về việc tăng cường sản xuất astaxanthin và kỹ thuật di truyền trên *H. pluvialis* thu được từ ScienceDirect từ năm 2013 đến năm 2023. Nghiên cứu về việc tăng cường astaxanthin và kỹ thuật di truyền của *H. pluvialis* đã tăng đáng kể trong 11 năm qua (hình 1.4).



Hình 1.4. Số lượng ấn phẩm nghiên cứu về việc tăng cường sản xuất astaxanthin và kỹ thuật di truyền trên *H. pluvialis* thu được từ ScienceDirect từ năm 2013 đến năm 2023.

Do đó, các nghiên cứu hiện nay *H. pluvialis* đều tập trung khai thác tối đa astaxanthin như tối ưu hóa điều kiện canh tác hoặc kỹ thuật di truyền để tăng cường sinh tổng hợp astaxanthin, phương pháp trích ly tinh chế hiệu quả.

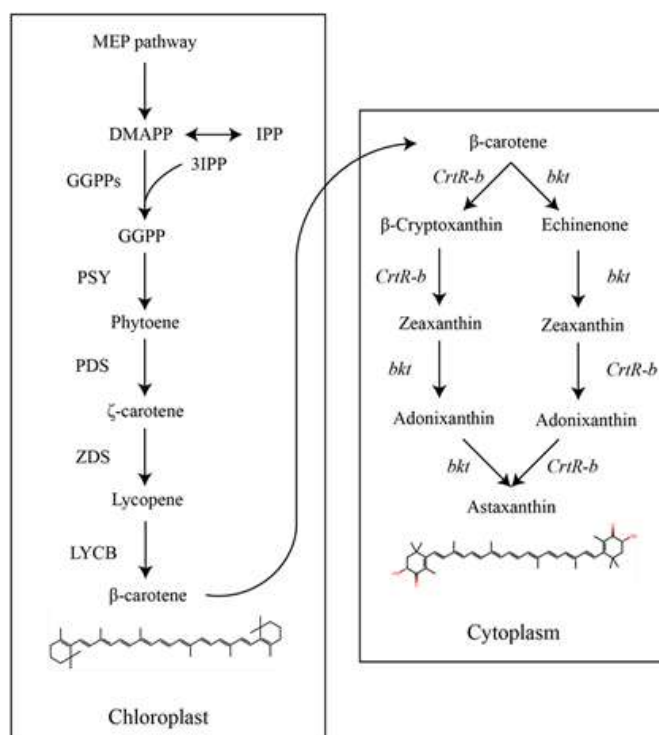
(a) Tối ưu hóa sản xuất astaxanthin từ *H. pluvialis* thông qua điều kiện canh tác

Các yếu tố ảnh hưởng như môi trường nuôi cấy, ánh sáng, nhiệt độ, salinity (độ mặn), và nguồn nitơ đã được nghiên cứu sâu rộng. Môi trường BBM kết hợp chiến lược nuôi hai giai đoạn cho kết quả sinh khối và năng suất astaxanthin cao. Cụ thể, BBM giàu vitamin B1 và B12 giúp tăng trưởng sinh khối, trong khi BG-11 là tối ưu cho cảm ứng astaxanthin. Sự kết hợp BBM (tăng sinh khối) và BG-11 (cảm ứng) cho năng suất astaxanthin 21,5 mg/g. Ngoài ra, urea được xem là nguồn nitơ thay thế hiệu quả, giúp ổn định pH và tăng sinh khối đến 9,9 g/L. Tuy nhiên, hiệu quả khác nhau tùy nguồn nitơ: NH_4NO_3 cho mật độ tế bào cao hơn so với urea. Việc bổ sung CO_2 ở mức dưới 5% thúc đẩy sinh trưởng, nhưng nồng độ >10% gây ức chế quang hợp và làm chết tế bào.

Nhiều nghiên cứu sử dụng mixotrophy (bổ sung nguồn carbon hữu cơ như glucose, natri acetate). Dù sinh khối tăng mạnh, nhưng hàm lượng chlorophyll giảm do ức chế quang hợp. Bổ sung natri acetate ở cuối pha log tăng sinh khối gần gấp đôi. Các yếu tố khác như bổ sung EDTA, ánh sáng mạnh ($400 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$), hoặc photobioreactor nhiều lớp cũng tăng sinh khối đáng kể.

Cảm ứng sinh tổng hợp astaxanthin như các yếu tố cảm ứng truyền thống gồm: thiếu nitơ, ánh sáng mạnh, nhiệt độ cao, và stress mặn. Những điều kiện này kích hoạt biểu hiện gen β -carotene ketolase (bkt) và CrtR-b, làm tăng tổng hợp astaxanthin. Kết hợp stress thường hiệu quả hơn đơn lẻ. Môi trường BG-11 cho hiệu suất cảm ứng astaxanthin cao nhất. Ngoài ra, nhiều chiến lược mới như đột biến UV chọn lọc chủng có hướng quang mạnh hơn, ứng dụng stress vật lý (áp lực cơ học), kích thích điện, hoặc hóa chất như ACC, strigolactone và điều chỉnh pH cũng được thử nghiệm thành công. Những cách này thúc đẩy quang hợp, tăng trưởng và tăng năng suất astaxanthin rõ rệt.

Quá trình sinh tổng hợp astaxanthin thông qua con đường mevalonate bắt đầu với phản ứng chuyển đổi isopentenyl pyrophosphate (IPP) thành geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). Phytoene được tạo ra từ GGPP dưới tác dụng xúc tác của phytoene synthase. Sau đó, lycopene được tạo thành từ phytoene và trải qua quá trình khử bão hòa để tạo ra β -carotene và được vận chuyển vào bào tương. Các enzyme như β -carotene ketolase (bkt) và β -carotene hydroxylase (CrtR-b) đóng vai trò then chốt trong việc chuyển hóa β -carotene thành astaxanthin (hình 1.5) [26][27].



Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp astaxanthin và các carotenoid ở *H. pluvialis*

H. pluvialis là nguồn cung cấp astaxanthin đã bộc lộ nhiều hạn chế như thời gian cảm ứng dài và khó khăn trong việc chiết xuất do thành tế bào dày. Một giải pháp

thay thế là tăng cường sự biểu hiện của các enzyme giới hạn tỷ lệ, chẳng hạn như phytoene desaturase và phytoene synthase, được nghiên cứu để điều chỉnh sinh tổng hợp carotenoid[32]. Bkt và CrtR-b ở *H. pluvialis* cho năng suất astaxanthin cao nhất nên chúng đã tích hợp cả bkt và CrtR-b từ *H. pluvialis* vào vi tảo xanh *Dunaliella viridis*. Kết quả cho thấy hàm lượng astaxanthin tổng số tối đa là $77,5 \pm 7,7$ $\mu\text{g g}^{-1}$ trong trọng lượng khô. *Dunaliella viridis* có lượng β -carotene nhưng chưa có ghi nhận về sản xuất astaxanthin. Tổng thành phần carotenoid thu được từ chủng *Dunaliella viridis* biến nạp tương tự như *H. pluvialis*, nhưng hàm lượng (3S,3'S)-astaxanthin cho thấy thấp hơn nhiều so với *H. pluvialis*, với khoảng 42% tổng lượng astaxanthin. Việc thiếu tối ưu hóa codon của bkt, CrtR-b và thành phần lutein cao là những lý do có thể dẫn đến sản lượng astaxanthin thấp [33]. Một nghiên cứu khác đã nhân bản bkt từ *H. pluvialis* trở lại cùng chủng *H. pluvialis* để biểu hiện quá mức các gen gây caroten kết quả cho thấy hàm lượng astaxanthin tối đa là 7,96 mg g⁻¹ ở chủng biến nạp, cao gấp 2-3 lần so với chủng chưa biến nạp. Các chất trung gian echinenone và canthaxanthin cao hơn 8–10 lần, cho thấy bkt đã được biểu hiện quá mức, trong khi việc thiếu CrtR-b đã hạn chế sản xuất astaxanthin Bảng 1.2 tóm tắt một số nghiên cứu về phương pháp chuyển gen nhằm gia tăng sản xuất astaxanthin ở vi tảo [34].

Bảng 1.2. Các phương pháp chuyển gen nhằm gia tăng sản xuất astaxanthin

Sinh vật nguồn	Gen mục tiêu	Sinh vật đích	Vector	Phương pháp	Kết quả
<i>H. pluvialis</i>	<i>bkt</i> và <i>CrtR-b</i>	<i>Dunaliella viridis</i>	pMD18-T	Biến nạp bằng biolistic	77.5 ± 7.7 $\mu\text{g/g}$ trọng lượng khô
<i>H. pluvialis</i>	<i>bkt</i>	<i>H. pluvialis</i>	pCAMBIA1304	Chuyển gen qua trung gian <i>Agrobacterium</i>	7.96 mg/g
<i>H. pluvialis</i>	<i>pds</i>	<i>H. pluvialis</i>	pHpS1	Biến nạp bằng bằng biolistic	Hàm lượng astaxanthin cao hơn 67% so với chủng hoang dại
<i>Paracoccus</i> sp. và <i>H. pluvialis</i>	<i>CrtW</i> và <i>CrtZ</i> (tương ứng)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	pYLMA-Cre	-	858 mg/L

Ngoài ra, trong giai đoạn cảm ứng sản sinh astaxanthin cần điều kiện nhiệt độ cao, thiếu dưỡng chất nên rất dễ bị các vi sinh khác gây nhiễm, do pds trong những năm gần đây, các hệ thống canh tác khép kín ngoài trời đa dạng đã trải qua các thử nghiệm kỹ lưỡng, với giải pháp phổ biến hiện nay là triển khai lò phản ứng hình ống nhiều giai đoạn, đòi hỏi phải sử dụng các ống thủy tinh có đường kính từ 5 đến 10 cm, được kết nối với nhau để tạo ra chiều dài lớn hơn hàng chục mét. Các ống nối với nhau này sau đó được sắp xếp thành nhiều lớp, thường là ở ngoài trời. Môi trường nuôi cấy *H. pluvialis* được lưu thông hiệu quả qua các ống thủy tinh kèm theo dưới sự kích thích ánh sáng liên tục, tạo điều kiện cho sự tích tụ đáng kể của astaxanthin. Lò phản ứng quang sinh học hình ống đã cho thấy tiềm năng nâng hàm lượng này lên hơn 4%, tùy thuộc vào mùa hiện tại và các yếu tố khí hậu địa phương [35][36].

1.1.4. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris (*C. vulgaris*) là một loại vi tảo nhân chuẩn màu xanh lá cây thuộc chi *Chlorella*. Những loài tảo này được Martinus Willem Beijerinck tìm thấy vào năm 1890, là vi tảo đầu tiên có nhân được xác định rõ. *C. vulgaris* là một tế bào hình cầu có đường kính từ 5 đến 10 μm và có nhiều thành phần tương tự như thực vật (hình 1.6). *C. vulgaris* có thành phần dinh dưỡng đa lượng và vi lượng dồi dào, có giá trị, được ứng dụng nhiều trong thực phẩm, mỹ phẩm, thuốc. Nó phân bố rộng rãi trong môi trường nước ngọt, biển và trên cạn, có khả năng quang hợp cao và khả năng tăng trưởng nhanh trong các điều kiện tự dưỡng, hỗn hợp và dị dưỡng [37][38].

Nhiều đặc tính sinh hóa của *Chlorella* dễ nuôi trồng, có thể phát triển mà không cần hoặc ít chú ý sử dụng nước không phù hợp với con người và dễ thu được chất dinh dưỡng, thành phần lipid cao nên *C. vulgaris*, được coi là một trong những chủng có triển vọng nhất trong số 3.000 loài được sàng lọc [3][9][37][39]. Với hàm lượng protein cao cùng với sự hiện diện của các chất dinh dưỡng thiết yếu, protein của *Chlorella vulgaris* đã từng là nguồn thực phẩm chất lượng tốt, giá thành thấp trong Thế chiến thứ nhất, được tiêu thụ như một chất bổ sung thực phẩm đặc biệt là ở một số quốc gia châu Âu, Nhật Bản.

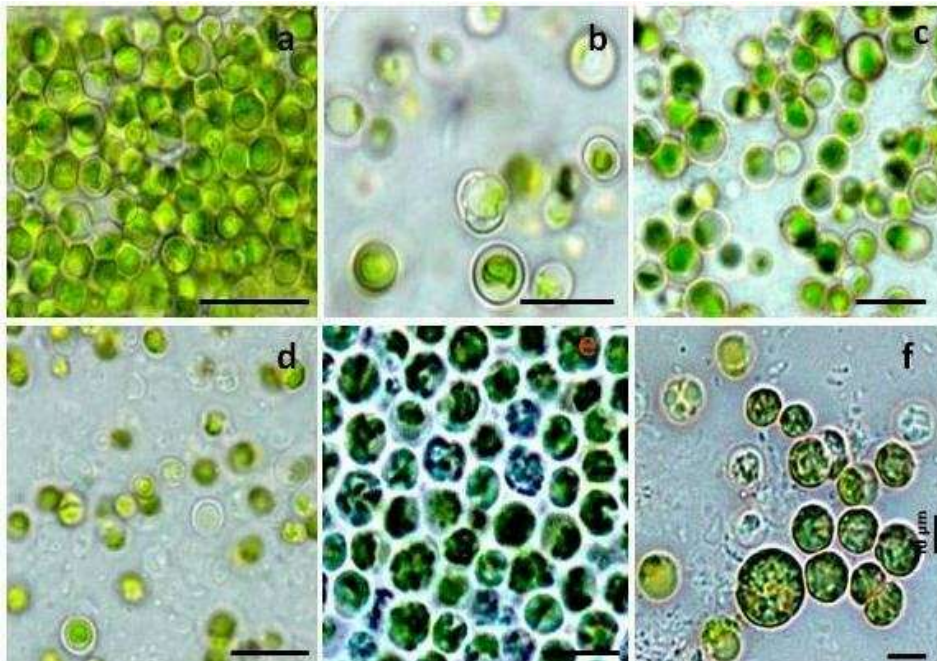
C. vulgaris có tổng hàm lượng protein chiếm 43–58% trọng lượng khô của nó theo các điều kiện tăng trưởng. Hàm lượng protein có các axit amin thiết yếu và không thiết yếu. Về mặt ứng dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm, hàm lượng protein cao của *C. vulgaris* đã cho phép sử dụng nó như một chất nhũ hóa [37].

C. vulgaris sản xuất nhiều lipid hơn (60–68%) khi được trồng trong điều kiện hỗn hợp. Hai axit béo chính có trong vi tảo diesel sinh học là các hợp chất C16 và C18 chứa axit pal-mitic (C16:0), axit stearic (C18:0), axit oleic (C18:1) và axit linolenic (C18:2). Vi tảo chứa độ bão hòa cao và axit béo không bão hòa đơn (14–20 cacbon) thích hợp để sản xuất dầu diesel sinh học. Diesel sinh học vi tảo có thể là ứng cử viên tốt nhất để thay thế dầu diesel hóa thạch khi vi tảo phát triển nhanh chóng, đòi hỏi ít hoặc không có đất canh tác và có khả năng làm giảm hiệu ứng nhà kính [37].

Carbohydrate như tinh bột, glucose, đường và polysaccharit thường được sử dụng làm năng lượng và dự trữ carbon trong cơ thể. Các polysaccharide dồi dào nhất ở *C. vulgaris* là tinh bột, được tạo thành từ amyloza và amy-lopectin, tiếp theo là polysaccharide cellulose trong vách tế bào. Tổng giá trị carbohydrate của *C. vulgaris* có thể đạt tới 12–55% trọng lượng khô khi được trồng trong điều kiện môi trường không thuận lợi, đặc biệt là với nguồn nitơ hạn chế [37].

Sắc tố là những hợp chất đầy màu sắc chịu trách nhiệm trong quá trình quang hợp để hấp thụ và sự phân xạ của các bước sóng nhất định của ánh sáng khả kiến. Vi tảo nổi tiếng với việc sản xuất các chất màu có giá trị cao và các hợp chất hoạt tính sinh học như carotenoid, diệp lục và phycobiliprotein. *C. vulgaris* có khả năng chất diệp lục được sản xuất hàng loạt, đạt tới 1–2% lượng chất diệp lục trọng lượng khô. *C. vulgaris* cũng chứa các carotenoid (astaxanthin, lutein, β -carotene, lycopene và cantaxanthin) ở mức khoảng 0,4% trên chất khô cơ sở trọng lượng [37].

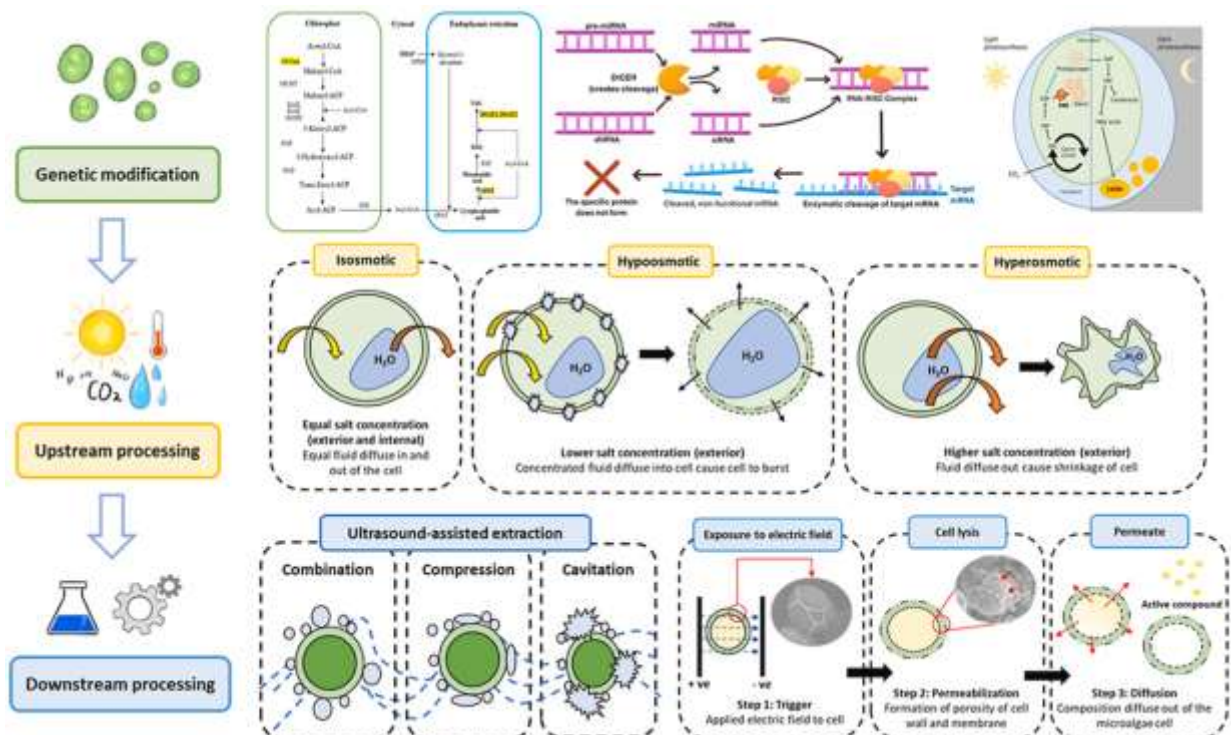
Cơ thể con người không thể tổng hợp vitamin với số lượng đủ nên chúng phải được lấy từ các nguồn bên ngoài thông qua chế độ ăn uống sự tiêu thụ. Khoáng chất là những chất vô cơ cần thiết cơ thể con người hoạt động tốt để có sức khỏe tốt. *C. vulgaris* chứa vitamin A, B, C và E và giàu canxi, kali, magiê và kẽm, là nguồn tuyệt vời của các vi chất dinh dưỡng thiết yếu [37].



Hình 1.6. Các loại vi tảo *Chlorella* sp

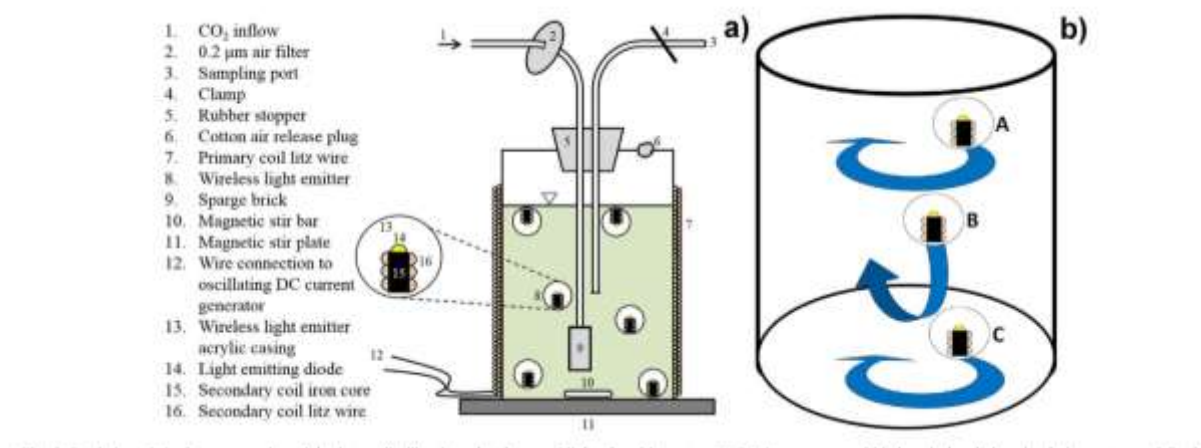
Ghi chú: a. *Chlorella vulgaris*; b. *Chlorella volutis*; c. *Chlorella vulgaris* var. *autotrophica*; d. *Chlorella rotunda*; e. *Chlorella vulgaris* var. *viridis*; f. *Chlorella sorokiana*;

Tương tự như nâng cao năng suất thu hồi astaxanthin từ *Haematococcus pluvialis*, chiến lược tăng cường năng suất lipid của vi tảo nói chung và *Chlorella vulgaris* nói riêng thể hiện ở hình 1.7 [40]. Trong đó, 3 nhân tố tác động được khai thác là phương pháp nuôi cấy, phương pháp trích ly và chuyển hóa gen.



Hình 1.7. Chiến lược tăng cường năng suất lipid của vi tảo

Năng suất sinh khối tảo và lipid tối ưu cho sản xuất biodiesel từ vi tảo có thể đạt được thông qua các hệ thống nuôi cấy vi tảo hiệu quả và thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy. Các hệ thống nuôi ORP yêu cầu về diện tích đất lớn, ảnh hưởng của điều kiện thời tiết thay đổi, mất nước nhiều do bốc hơi, sử dụng ánh sáng không hiệu quả và dễ bị các vi khuẩn khác xâm nhiễm. Hiện nay, các hệ thống phản ứng quang sinh học nuôi cấy khép kín lò phản ứng quang sinh học (photobioreactors-PBR) khắc phục những nhược điểm của ORP bằng cách cho phép kiểm soát các thông số và được thiết kế theo nhu cầu cụ thể của chủng vi tảo quan tâm. Ví dụ, PBR chỉ cần diện tích vận hành tương đối nhỏ, ít có khả năng gây ô nhiễm và có thể tối ưu hóa hoàn toàn khả năng cung cấp ánh sáng do sử dụng các nguồn nhân tạo. Một nghiên cứu do Murray và cộng sự thực hiện (2017) cho thấy một PBR có nguồn sáng không dây, ngập nước, chảy tự do được sử dụng để nuôi cấy *Chlorella vulgaris* và *Haematococcus pluvialis* có hiệu suất sử dụng ánh sáng cao hơn năm lần so với các phương pháp chiếu sáng thông thường (hình 1.8) [41]. Hệ thống chiếu sáng loại này cũng cải thiện tính đồng đều của việc cung cấp ánh sáng và giảm sự xuất hiện của vùng tối cũng như tác động của hiện tượng tự che bóng [42][43].



Hình 1.8. Lò phản ứng quang sinh học ánh sáng chìm (SL-PBR) được chiếu sáng bên trong(a) và Mô hình tuần hoàn của đèn không dây(b)

Tuy nhiên, việc sử dụng PBR để nuôi vi tảo có một số thách thức lớn, chẳng hạn như quá nhiệt, các vấn đề liên quan đến vệ sinh và bảo dưỡng, bám bẩn sinh học, sự phát triển của tảo đáy, sự tích tụ oxy hòa tan có thể cản trở năng suất sinh khối tảo và quan trọng nhất là chi phí cao trong việc thiết kế và vận hành hệ thống. Chi phí sản

xuất đất đỏ như vậy cản trở khả năng khai thác quy mô kinh tế bằng cách tăng kích thước lò phản ứng để sản xuất nhiều nhiên liệu sinh học hơn.

Việc lựa chọn các kỹ thuật nuôi cấy phù hợp và lập kế hoạch thiết kế của chúng phụ thuộc vào nhu cầu cụ thể. Ví dụ, ORP sử dụng nước thải có thể được thiết kế theo dạng tròn hoặc theo cách khai thác dòng chảy hấp dẫn, trong khi các sản phẩm được phẩm và dinh dưỡng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng PBR hình ống[42].

Để giải quyết những hạn chế của cả ORP và PBR, các hệ thống lai tích hợp cả hai phương pháp nuôi cấy có thể tối đa hóa cả sinh khối tảo và năng suất lipid. Trong các hệ thống lai, vi tảo đầu tiên được nuôi cấy trong PBR với nguồn cung cấp chất dinh dưỡng đủ để thúc đẩy sự phát triển của tảo và năng suất sinh khối cao. Sau đó, tảo trưởng thành được chuyển sang ORP và chịu áp lực dinh dưỡng để thúc đẩy sản xuất lipid. Các hệ thống lai trước đây đã được sử dụng ở Mỹ để sản xuất *H. pluvialis*, sản xuất hơn 420 GJ/ha/ năm, ước tính giảm giá thành sản phẩm so với dầu khai thác từ thực vật hoặc nhiên liệu hóa thạch[44]. Narala và cộng sự (2016) đã phát triển một hệ thống nuôi cấy hai giai đoạn hiệu quả tích hợp các hệ thống phản ứng quang sinh học được kiểm soát bằng áp suất không khí dư với ORP thiếu dinh dưỡng cho *Tetraselmis* sp. M8 cho năng suất lipid tảo cao đáng kể so với các hệ thống độc lập thông thường và cũng có khả năng bị ô nhiễm thấp hơn (hình 1.9) [45].



Hình 1.9. Hệ thống nuôi cấy vi tảo hai giai đoạn từ hệ thống PBR đến ORP quy mô pilot

Việc điều chỉnh và tối ưu hóa các thông số quy trình là rất quan trọng để tăng cường năng suất lipid. Việc sử dụng nhiệt độ và độ pH tối ưu, cung cấp đủ CO₂, chất dinh dưỡng, oxy hóa và độ mặn cũng có thể ảnh hưởng đến sinh khối và đạt được sản lượng lipid tối đa, nhưng tác động của từng yếu tố có thể khác nhau tùy theo từng chủng. *C. vulgaris* đạt được sinh khối cao nhất khi cung cấp 8% CO₂ trong môi

trường, trong khi Yusof et al. (2011) nhận thấy *C. vulgaris* đạt tốc độ tăng trưởng cao nhất khi nuôi cấy dưới 10% CO₂ và 24 giờ ánh sáng. Lượng CO₂ được cung cấp ảnh hưởng đến giá trị pH của môi trường nuôi cấy, do đó nó phải được cung cấp ở nồng độ tối ưu để cải thiện quá trình sản xuất lipid và sinh khối của vi tảo mà không ảnh hưởng đến sự phát triển. So với nuôi cấy tự dưỡng, *C. vulgaris* tạo ra lipid cao hơn trong nuôi cấy hỗn hợp với glucose (1% w/v) làm nguồn carbon, cho thấy rằng các nguồn carbon khác nhau dẫn đến sản lượng chất chuyển hóa mong muốn khác nhau [2]. Carbon cũng có thể được cung cấp dưới dạng bicarbonate (HCO₃⁻) để nuôi cấy các loài tảo có khả năng sử dụng dạng carbon này. Hanifzadeh và cộng sự (2018) đã chứng minh rằng khi cung cấp HCO₃⁻ trong ORP nuôi cấy *C. vulgaris*, năng suất tảo cao hơn 50% đã được báo cáo là 23,55 g/m²/ngày so với các phương pháp nuôi cấy thông thường sử dụng CO₂, giảm chi phí nuôi cấy hơn 55% và năng lượng khoảng 80-90% [46][47].

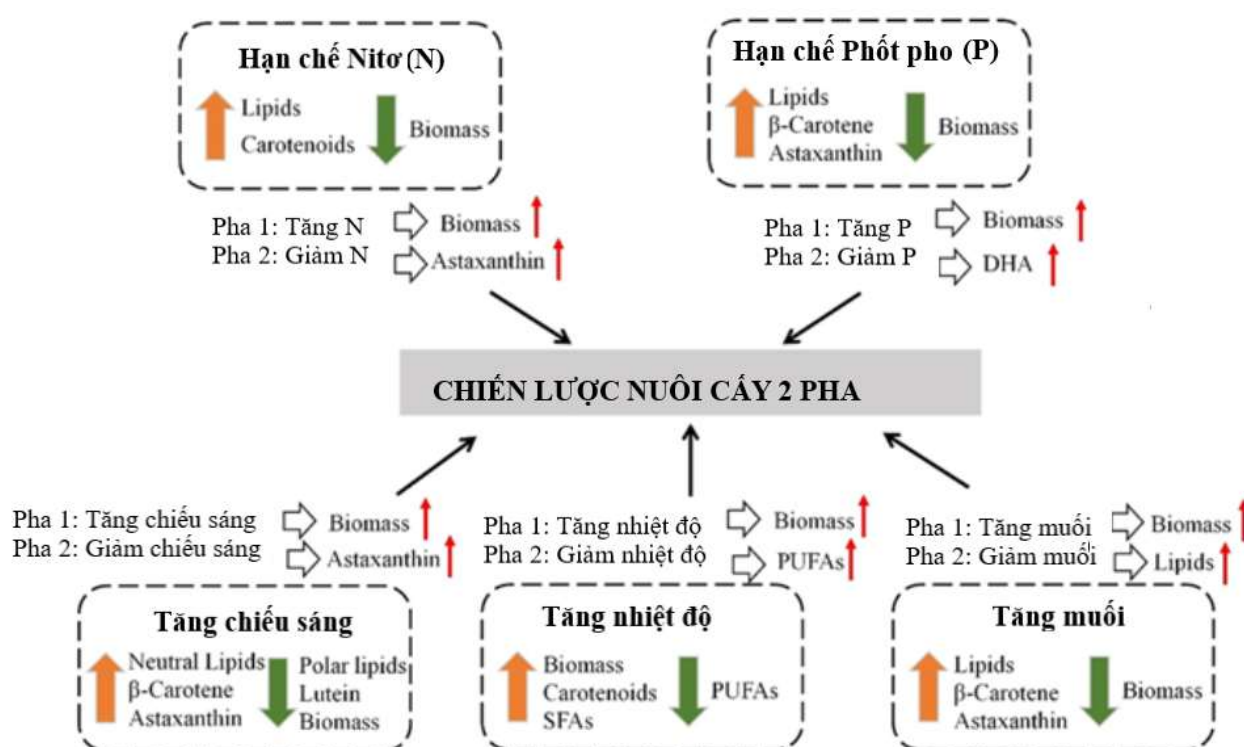
Nitơ đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của tế bào và lipid sản xuất, chiếm 1–10% tổng tổng chất khô trong vi tảo. Nitơ có thể được cung cấp dưới dạng chất dinh dưỡng vi tảo ở các dạng khác nhau như amoni, nitrat, nấm men, urê và pepton và mỗi chất này sẽ có tác động khác nhau đến tăng trưởng. *C. vulgaris* có sở thích khác nhau đối với nguồn nitơ và cạnh tranh hỗn hợp là một phương pháp khả thi để sản xuất lipid. Sản xuất lipid ở *C. vulgaris* tăng khi thiếu nitơ nhưng điều này cũng làm giảm tổng sinh khối của vi tảo làm giảm tổng thể năng suất lipid. Do đó vi tảo được đề xuất nuôi cấy trong điều kiện giàu nitơ ban đầu để tăng cường sinh trưởng và tăng sinh khối trước khi chuyển chúng sang môi trường thiếu nitơ để kích thích sản xuất lipid [37][48]. Pavel Přibýl và cộng sự (2012) đã làm thử nghiệm so sánh khả năng sản sinh lipid giữa 10 chủng *Chlorella* và *Parachlorella*. Kết quả cho thấy chủng có năng suất lipid cao nhất là *Chlorella vulgaris* CCALA 256 và được chọn lựa để khảo sát các yếu tố nitrat và/hoặc phosphate ảnh hưởng mạnh đến sự tăng trưởng và tích tụ lipid. Sau 8 ngày nuôi cấy, năng suất lipid tối đa là 0,33 g/L/ngày, mật độ sinh khối là 5,7 g/l trọng lượng khô và tổng hàm lượng lipid lớn hơn 30% trọng lượng khô. Lipid của *C. vulgaris* bao gồm các axit béo có độ bão hòa tương đối cao so với dầu hạt cải, có thể là một lựa chọn thay thế cho việc sử dụng các loại dầu thực vật cao hơn [49].

Giá trị pH được chọn rất quan trọng trong quá trình nuôi trồng vi tảo vì giá trị pH không thuận lợi sẽ gây căng thẳng cho vi tảo, điều này cuối cùng ảnh hưởng đến hiệu quả hấp thụ chất dinh dưỡng và các chất chuyển hóa được tạo ra. Trong điều kiện cạnh tranh bình thường, độ pH tối ưu cho sự phát triển của *C. vulgaris* nằm trong khoảng

từ 10,0 đến 10,5. Người ta cũng chứng minh rằng việc điều chỉnh pH liên tục đến độ pH tối ưu sẽ giúp tăng cường sự phát triển của vi tảo và ngăn ngừa ô nhiễm [37][48].

Nhiệt độ tăng trưởng ảnh hưởng đến sản lượng sinh khối và tốc độ tăng trưởng của vi tảo. Nhiệt độ tăng trưởng tối ưu cho *C. vulgaris* là 30°C, chứng tỏ sinh khối cao nhất. Tốc độ tăng trưởng của nó giảm khi nhiệt độ trên 30°C và ở 38°C cây trồng chết. Tuy nhiên, một quan sát đáng chú ý là khả năng sản xuất lipid của *C. vulgaris* tăng lên 14,7% khi nhiệt độ tăng trưởng giảm từ 30 xuống 25°C, và hàm lượng axit oleic trong *C. vulgaris* tăng lên tới 34% khi nuôi cấy ở 38°C, làm cho nó có tiềm năng sản xuất được phẩm dinh dưỡng [37][48].

Độ mặn là một trong những yếu tố stress phổ biến được sử dụng để kích thích quá trình sản xuất lipid và sinh khối ở vi tảo. Theo Alyabyev và cộng sự. (2007), mà *C. vulgaris* có thể thích nghi nồng độ muối NaCl tối đa 0,5 M. Sản xuất β -carotene ở *C. vulgaris* tăng khi nồng độ NaCl từ 0,1 M đến 0,3 M nhưng giảm khi áp dụng NaCl 0,4 M. Lipid sẽ được tích tụ trong vi tảo bị stress do độ mặn cao, trở thành một lợi thế trong việc sản xuất lipid từ vi tảo [37][50][48][51]. Tóm tắt cơ chế gây stress và công nghệ nuôi cấy 2 pha nhằm tăng sinh khối và sản lượng lipid và carotenoid theo hình 1.10 [51].



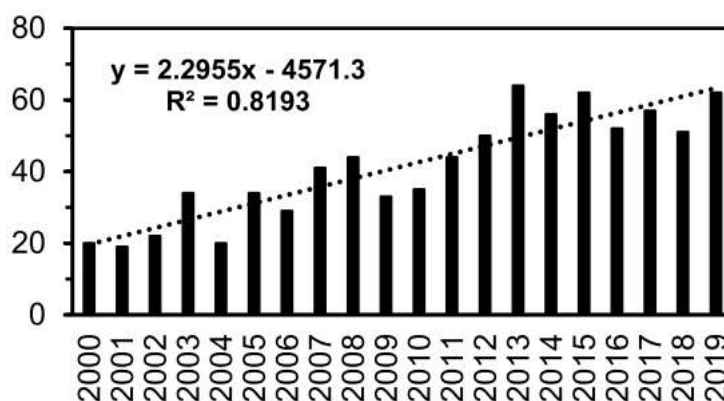
Hình 1.10. Tác động của stress về các thành phần điển hình lên quá trình sản xuất lipid và carotenoid trong vi tảo và các chiến lược nuôi cấy hai giai đoạn

Ngoài ra, sự tiến bộ và tiến bộ liên tục trong nghiên cứu như kỹ thuật di truyền và sinh học tổng hợp bằng cách biến đổi gen gián tiếp/trực tiếp là một phương pháp luận được khuyến nghị để tăng cường sự tăng trưởng và năng suất lipid ở chủng vi tảo quan tâm[48] [40]. Như đã nói ở trên, tảo lục được quan tâm nhiều trong nghiên cứu sản xuất lipid do chứa nhiều diệp lục nên khả năng quang hợp tốt hơn các loài khác cũng như tốc độ tăng trưởng nhanh. Nhiều loài trong đó có các chủng tảo lục như *C.vulgaris*, *C. ellipsoidea*, *C. pyrenoidosa* đã nâng cao hiệu suất sản sinh lipid mà không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng [40].

Việc cải tiến các phương pháp chiết xuất lipid ở *C.vulgaris* được tổng hợp ở tiểu mục 1.3. trong báo cáo này.

1.1.4. *Dunaliella salina*

Dunaliella salina là một loại tảo đơn bào màu xanh, chịu mặn và có nhiều công dụng khác nhau trong ngành dược phẩm, sức khỏe, thực phẩm và năng lượng. Số lượng ấn phẩm liên quan đến thuật ngữ [*Dunaliella*] đã được phân tích trong cơ sở dữ liệu PubMed (Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia, Thư viện Y khoa Quốc gia Hoa Kỳ), từ năm 2000 đến năm 2019 đã tăng lên rõ rệt theo hình 1.11 đã cho thấy sự quan tâm đáng kể của giới khoa học về chúng [52].



Hình 1.11. Số lượng ấn phẩm liên quan đến thuật ngữ [*Dunaliella*] tại cơ sở dữ liệu PubMed (NCBI)

Dunaliella salina (*D. salina*) là nguồn dự trữ các phân tử sinh học có giá trị cao như carotenoid, lipid và FA 18:1 *n* -9 (axit oleic, OA), FA 18:3 *n* -3 (axit α -linolenic, ALA) và FA 18:2 *n* -6 (axit linoleic, LA)[53]. Đặc biệt sản phẩm chiết xuất quan trọng nhất từ *D. salina* là beta-carotene [54].

Về mặt hình thái, tế bào *Dunaliella* có hai roi, có thể hình trứng, hình cầu, hình lê, hình thoi hoặc hình elip, và có thể thay đổi từ 5 đến 25 μm về chiều dài và 3 đến 13

µm về chiều rộng. Khác với các chi trên, *D. salina* không có thành tế bào cứng, được giới hạn bởi một màng mỏng và đàn hồi cho phép thích nghi hình thái hiệu quả hơn do đó dễ dàng phá vỡ tế bào chiết xuất các thành phần bên trong [52]. Dạng sinh khối *Dunaliella* khô giàu carotenoid được ứng dụng thực tế trong ngành công nghiệp thực phẩm và thức ăn chăn nuôi như chất phụ gia để tạo màu hoặc làm chất bổ sung cho cả người và động vật tiêu thụ [19][53]. Trong số các loài *Dunaliella*, chỉ có *D. salina* và *D. bandowii* có thể tích lũy một lượng beta-carotene đáng kể (10–14% trọng lượng khô). Ngoài ra *D. salina* được coi là có tốc độ tăng trưởng cao hơn [54].

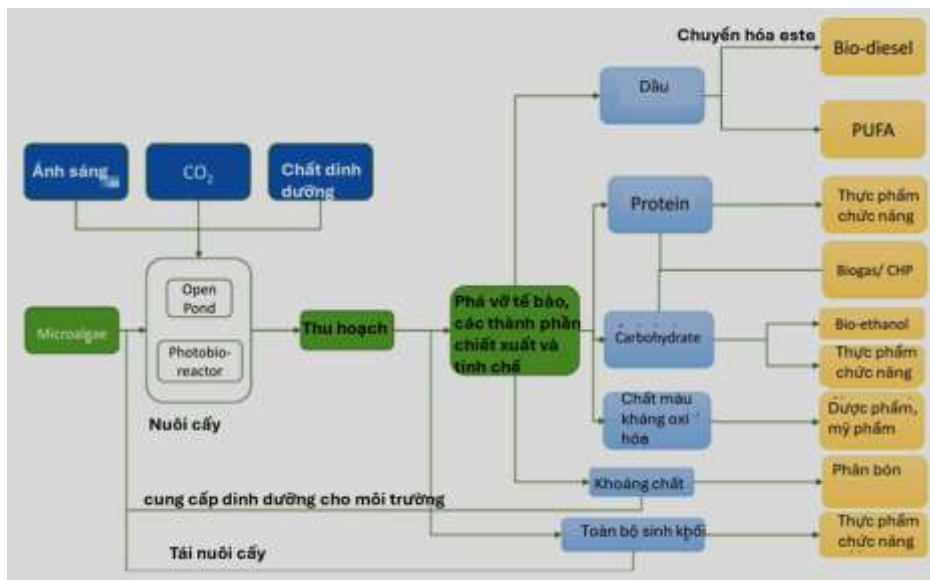
Trong một thời gian dài, cách phổ biến nhất để sản xuất *Dunaliella* cho mục đích thương mại là sử dụng các hồ bơi ngoài trời nóng và khô gần các nguồn nước mặn phù hợp do khả năng chịu mặn nên rất ít bị ô nhiễm bởi các loại tảo khác. Do yêu cầu nghiêm ngặt về β -carotene nên ngày nay các lò phản ứng quang khép kín được sử dụng. Các điều kiện tối ưu để nuôi cấy *D. salina* đạt được tốc độ sản xuất β -carotene cao nhất là độ mặn 2–4 M NaCl, nhiệt độ 25–30 °C, cường độ chiếu sáng 10–15 klux và pH = 7,5. Mật độ tế bào *D. salina* cao nhất là $7,5 \times 10^7$ tế bào/ml và sản lượng betacarotene cao nhất là 180 mg/l. Ngoài ra, bước chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ *D. salina* có tầm quan trọng về mặt kỹ thuật và kinh tế cao nhất. Phương pháp thích hợp nhất để chiết xuất beta-carotene là áp dụng kết hợp các dung môi. Trong số các dung môi kết hợp, hệ dung môi CH₂Cl₂/decane có khả năng chiết xuất 60% và hòa tan tới 310 µg/ml beta-carotene có hiệu suất tốt nhất.

Ngoài carotenoid, *Dunaliella* còn là nguồn cung cấp lipid, đạt tới 25% trọng lượng khô khi điều kiện tăng trưởng không thuận lợi, chẳng hạn như nhiệt độ, cường độ ánh sáng độ mặn hoặc với sự hiện diện của các hợp chất cụ thể trong môi trường như natri tungstat.

1.2. Dầu sinh học từ vi tảo

1.2.1. Thành phần Lipid vi tảo

Trong những năm gần đây, vi tảo đã thu hút được sự chú ý bao gồm vai trò của nguồn nhiên liệu thay thế và là nguồn tiềm năng của nhiều hợp chất hoạt tính sinh học dành cho con người. Hình 1.12 giới thiệu mô hình thu nhận các chất hoạt tính sinh học từ vi tảo theo hướng phát triển bền vững [55].



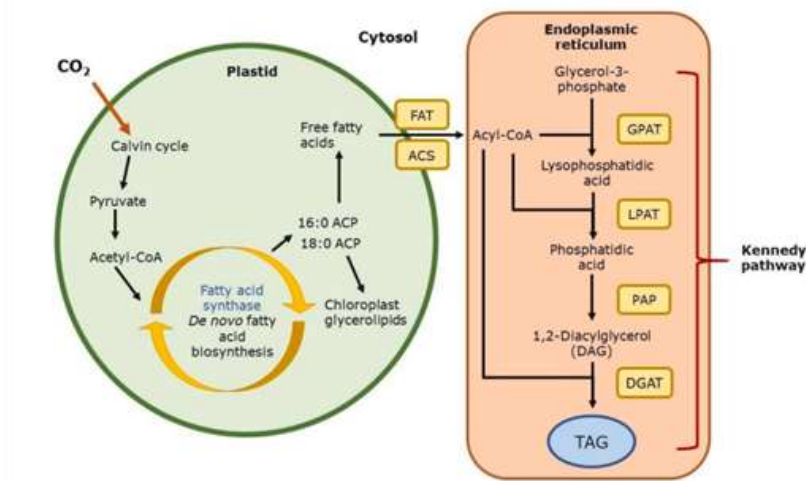
Hình 1.12. Mô hình tinh chế sinh học của vi tảo

Lipid đóng vai trò thiết yếu trong quá trình trao đổi chất và tăng trưởng. Vi tảo bằng cách đóng vai trò là nguồn dự trữ năng lượng và carbon. Thành phần lipid trong vi tảo có thể được chia thành lipid trung tính và lipid phân cực. Lipid phân cực như phospholipid và glycolipids được tạo ra bởi lực lập chiếm ưu thế ở thành tế bào và màng tế bào trong khi lipid trung tính được lưu trữ trong các bào quan của tế bào. Thành phần lipid của vi tảo rất rộng, có phạm vi từ 2 đến 77% tùy thuộc vào loài và môi trường. Lipid của vi tảo tạo ra thường bao gồm lipid trung tính, lipid phân cực, este sáp, sterol và hydrocarbon, cũng như các dẫn xuất prenyl như tocopherol, carotenoid, terpene, quinine và các dẫn xuất pyrrole như diệp lục.

Trong số các lipid không phân cực, TAG là sản phẩm lưu trữ dồi dào, có thể dễ dàng bị phân hủy để cung cấp năng lượng trao đổi chất. Nhìn chung, TAG chủ yếu được tổng hợp trong ánh sáng, được lưu trữ trong các thể lipid tế bào chất và sau đó được tái sử dụng để tổng hợp lipid phân cực trong bóng tối. TAG của vi tảo thường được đặc trưng bởi cả FA bão hòa và FA không bão hòa đơn. Tuy nhiên, một số loài giàu dầu đã chứng minh khả năng tích lũy hàm lượng cao các axit béo không bão hòa đa chuỗi dài (PUFA) dưới dạng TAG [48].

Các con đường sinh tổng hợp axit béo và TAG ở vi tảo tương tự như ở thực vật bậc cao, bao gồm hai giai đoạn tổng hợp axit béo de novo và lắp ráp glyceride tiếp theo hình 1.13 [40]. Quá trình tổng hợp axit béo bắt đầu ở lục lạp ở vi tảo. Vi tảo cố định carbon dioxide thành glycero-3-phosphate (G-3-P) thông qua quá trình quang hợp và chuyển đổi nó thành acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) thông qua quá trình đường phân, là tiền chất trực tiếp của quá trình tổng hợp axit béo. Ngoài ra, axit citric được

tạo ra bởi quá trình chuyển hóa đường thông qua chu trình axit tricarboxylic (TCA) trong ty thể cũng được chuyển đổi thành acetyl-CoA dưới tác động của ATP: citric acid splitting synthase (ACL). Trong tế bào chất, acetyl-CoA được hoạt hóa bởi acetyl-CoA carboxylase (ACC) để tạo ra malonyl coenzyme A (malonyl-CoA), có thể được sử dụng để kéo dài axit béo trong màng ER. Sự chuyển đổi acetyl-CoA thành malonyl-CoA là bước đầu tiên của quá trình tổng hợp axit béo, đòi hỏi ATP. Sau khi tổng hợp malonyl-CoA trong lục lạp, nó được chuyển đến protein vận chuyển acyl (ACP), và sau đó trải qua chu trình bốn bước ngưng tụ, khử, mất nước và khử (mỗi chu trình kéo dài hai nguyên tử cacbon), cuối cùng tạo ra C16-ACP và C18-ACP. Sự kéo dài đơn vị C2 của mỗi chuỗi cacbon đòi hỏi 1 phân tử ATP và 2 phân tử NADPH. Một mặt, acyl-ACP tiếp tục tổng hợp lipid trong lục lạp, được coi là con đường chuyển hóa lipid ở sinh vật nhân sơ. Mặt khác, acyl-ACP được hòa tan thành các axit béo tự do (FFA) dưới tác động của thioesterase acyl-ACP béo (FAT), FFA kết hợp với coenzyme A trong tế bào chất để tái tạo acyl-CoA, đi vào ER với G-3-P thông qua con đường Kennedy để tạo ra axit lyso-phosphatidic (LPA), axit phosphatidic (PA), diacylglycerol (DAG) lần lượt và trở thành TAG ở cuối. Có một mối quan hệ nhất định giữa DAG, TAG và lipid màng (ML), đây là cách chuyển hóa lipid của sinh vật nhân chuẩn [40][50].



Hình 1.13. Sơ đồ biểu diễn quá trình sinh tổng hợp lipid ở vi tảo

1.2.2. Phương pháp chiết tách dầu sinh học từ vi tảo

Việc khai thác dầu sinh học, đặc biệt trong bối cảnh sản xuất nhiên liệu, còn tương đối mới và chưa trưởng thành về mặt ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Dầu diesel sinh học có nguồn gốc từ vi tảo đã được nghiên cứu trong gần hai thập kỷ bằng con đường nhiệt hóa, thủy hóa tốn nhiều thời gian và không khả thi về mặt kinh tế do

khó cạnh tranh giá nhiên liệu hóa thạch. Quy trình sản xuất dầu tảo bao gồm nuôi trồng, thu hoạch, chiết xuất, chuyển hóa và tinh chế với mỗi công đoạn góp phần gia tăng hàm lượng lipid thu nhận. Vi tảo có thành tế bào có thành dày và việc giải phóng các hợp chất hoạt tính sinh học của chúng bị hạn chế bởi độ cứng của thành tế bào vi tảo. Do đó, cần lựa chọn các phương pháp tiền xử lý và chiết xuất thích hợp để thu được lipid từ vi tảo và duy trì hoạt tính sinh học, đảm bảo thu hồi các thành phần còn lại của bã sinh khối cũng là vấn đề cực kỳ quan trọng [3][55][56].

Quá trình phá vỡ tế bào

Các phương pháp phá vỡ tế bào thường có thể được phân loại thành ba loại—Vật lý/cơ học, hóa học và sinh học (chủ yếu là enzyme). Phương pháp vật lý/cơ học sử dụng lực cắt (áp suất cao, nhiệt độ cao hoặc kết hợp), xung điện hóa hoặc bức xạ điện từ để phá vỡ thành tế bào. Phương pháp hóa học thường dùng các acid và kiềm nên phân hủy không đặc hiệu các thành phần thành tế bào. Các phương pháp sinh học sử dụng enzyme đặc hiệu để thủy phân có chọn lọc vào các thành phần cụ thể trong thành tế bào. Xử lý bằng enzyme có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một enzyme đơn lẻ hoặc hỗn hợp enzyme liên kết để tăng hiệu quả cắt phá. Mỗi phương pháp đều có những ưu điểm và hạn chế thể hiện ở bảng 1.3 [57]. Các phương pháp có thể được áp dụng kết hợp với nhau để phá vỡ thành tế bào và chiết xuất các hợp chất nội bào có giá trị.

Bảng 1.3. Phân tích ưu điểm và hạn chế của các phương pháp phá vỡ tế bào vi tảo

Phương pháp	Điểm mạnh	Hạn chế
Vật lý/Cơ học: Nghiền, hấp, vi sóng (MAE), siêu âm UAE, Đồng hóa áp suất cao	1. Quy trình nhanh 2. Hiệu quả gián đoạn cao 3. Quy trình đã được chứng minh ở quy mô lớn	1. Chi phí cơ sở hạ tầng cao 2. Đầu vào năng lượng cao 3. Nhiệt sinh ra có thể làm suy thoái sản phẩm cuối cùng
Hóa học: Axit, Chất hoạt động bề mặt, Chất tẩy rửa	1. Đầu vào năng lượng thấp 2. Chi phí cơ sở hạ tầng thấp 3. Dễ dàng nâng cấp hơn so với các phương pháp cơ học	1. Chi phí hóa chất cao 2. Sử dụng hóa chất ăn mòn 3. Nguy cơ sản phẩm bị suy thoái cao
Phương pháp tiếp cận bằng Enzyme (hoặc Sinh học gián tiếp)	1. Độ đặc hiệu cao, cho phép nhắm mục tiêu độc quyền vào các thành phần của thành tế bào và giảm thiểu rủi ro phân hủy sản phẩm 2. Đầu vào năng lượng thấp 3. Điều kiện vận hành nhẹ nhàng và êm dịu, ngăn ngừa quá trình oxy hóa và biến tính của sản phẩm	1. Enzyme đắt tiền 4. Việc thu hồi enzyme đòi hỏi quá trình tinh chế hạ nguồn phức tạp, làm tăng thêm chi phí vận hành 5. Enzyme có phạm vi tối ưu hẹp và có thể làm chậm phản ứng nếu không được cung cấp

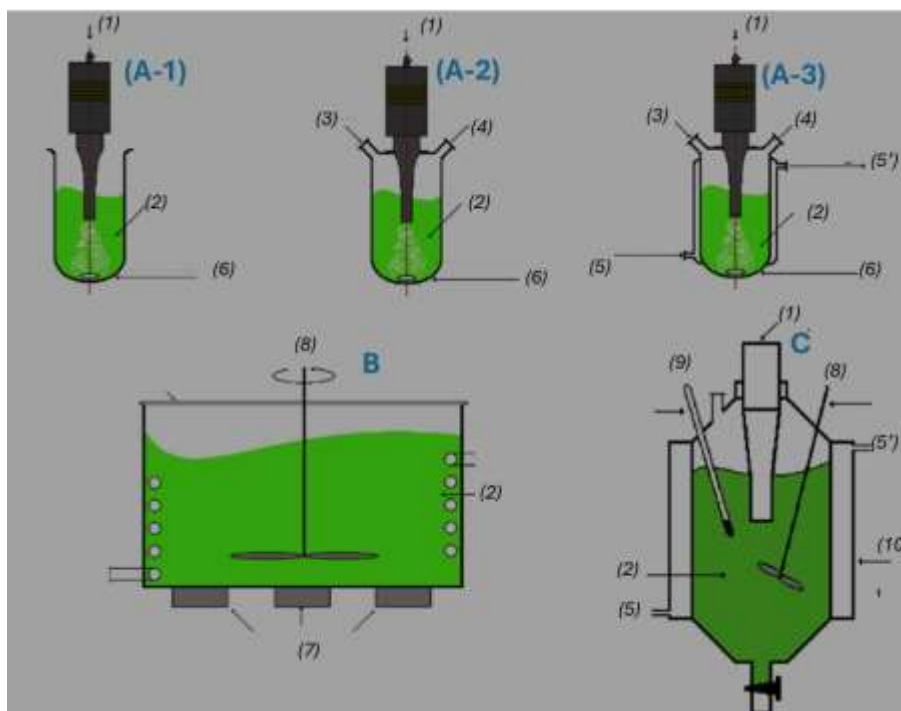
Trích ly

Trong một thời gian dài, một số phương pháp cổ điển, ép cơ học, bao gồm chiết Soxhlet, chiết Folch và Bligh-Dyer đã được sử dụng để chiết xuất lipid, nhưng trong khi các phương pháp này thường dễ vận hành và kinh phí thấp, chúng cũng có những nhược điểm như tiêu thụ nhiều dung môi hữu cơ và ô nhiễm môi trường, ngoài ra thời gian chiết kéo dài (vài giờ). Bảng 1.4. tổng hợp so sánh các phương pháp chiết[58].

Bảng 1.4. So sánh các phương pháp chiết

Phương pháp chiết	Điểm mạnh	Hạn chế
Ép	Dễ sử dụng, không liên quan đến dung môi	Yêu cầu lượng mẫu lớn, quy trình chậm
Trích ly	Dung môi được sử dụng tương đối rẻ và thu hồi tái sử dụng	Hầu hết các dung môi hữu cơ đều dễ cháy và/hoặc độc hại cao; việc thu hồi dung môi tốn kém và tốn nhiều năng lượng; cần khối lượng dung môi lớn
Chiết xuất chất lỏng siêu tới hạn	Là “dung môi xanh” không độc hại (không có cặn dung môi hữu cơ trong chiết xuất), không bắt lửa	Tiêu thụ điện năng cao; đắt tiền/khó mở rộng quy mô tại thời điểm này
Các phương pháp chiết xuất hiện đại có hỗ trợ sóng siêu âm, vi sóng	Giảm thời gian chiết xuất; giảm mức tiêu thụ dung môi; khả năng thâm nhập của dung môi vào vật liệu tế bào lớn hơn; cải thiện việc giải phóng nội dung tế bào vào môi trường khối	Tiêu thụ điện năng cao; khó mở rộng quy mô

Phương pháp Soxhlet liên quan sử dụng dung môi n-hexane, cần 10-12h để chiết kiệt mẫu. Phương pháp chiết Folch và Bligh-Dyer được xem là phương pháp trọng tài với hệ đồng dung môi chloroform/methanol=2/1 thực hiện 2-4h bằng phương pháp chiết khuấy[1][3][6].



Hình 1.14. Các hệ thống trích ly siêu âm trực tiếp

Ghi chú:

A: Bình siêu âm thanh có hỗ trợ khuấy có hỗ trợ khuấy từ (a-1), bổ sung thêm bộ phận thu giữ dung môi (a-2), bổ sung bộ áo lạnh

B: bể siêu âm có cánh khuấy cơ

C: Thiết bị siêu âm thanh quy mô pilot

1- Thanh siêu âm; 2:Hỗn hợp chiết; 3: Phễu nhỏ giọt

4: Ống ngưng tụ; 5 và 5': đầu vào và ra của dung dịch làm mát

6: Cánh khuấy từ; 7: bộ phát siêu âm; 8-cánh khuấy cơ

9- nhiệt kế; 10-vỏ áo lạnh

Trong những năm gần đây, nhiều phương pháp cải tiến đã được khám phá để chiết xuất lipid, chẳng hạn như chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn (SFE), chiết có hỗ trợ siêu âm (UAE), chiết có hỗ trợ vi sóng (MAE) và các phương pháp khác. Những phương pháp cải tiến này khắc phục được những thiếu sót của các phương pháp cổ điển ở một mức độ nhất định, đồng thời, chúng cũng có lợi trong việc cải thiện tốc độ chiết xuất lipid và duy trì hoạt tính sinh học của dịch chiết [1][6][58]. Phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm tương đối dễ áp dụng hơn để mở rộng quy mô. Hiện tại, lò phản ứng chiết siêu âm (hình 1.14) quy mô pilot và công nghiệp [59].

Ngoài ra, việc lựa chọn dung môi “xanh” an toàn với môi trường và khả năng thu hồi tái sử dụng là được ưu tiên hơn cả. Các dung môi hexane, hệ đồng dung môi

khác như hexane/methanol, heptane/methanol,...thay cho hệ chloroform/methanol có tính độc, khó thu hồi đang được ứng dụng [1][3].

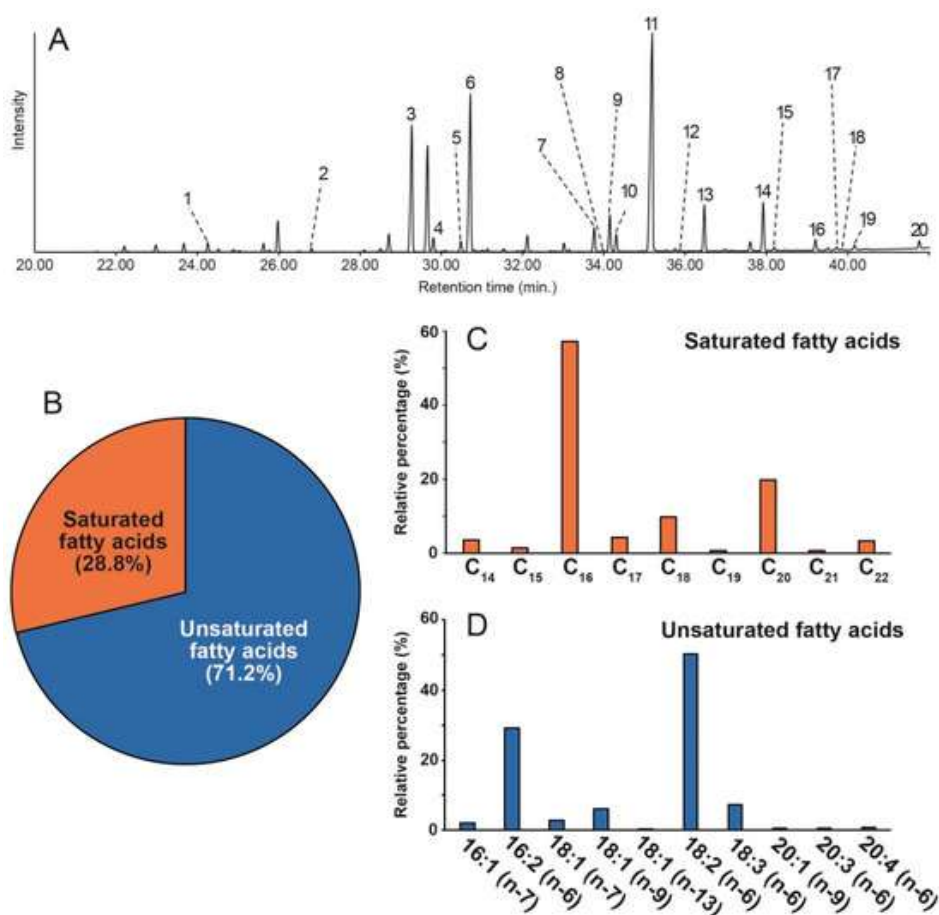
1.3. Chiết tách dầu sinh học từ *Chlorella vulgaris*

1.3.1. Đánh giá thành phần hóa học của dầu sinh học từ *Chlorella vulgaris*

Hiện nay, dầu tảo có giá thị trường tương đối cao (2,4 USD/lít) so với sản phẩm dầu thực vật hàng ngày (\$0,6-0,8 mỗi lít), do sự đầu tư đáng kể chi phí liên quan đến tiêu thụ năng lượng trong các bước quy trình khác nhau. Mặc dù vi tảo đã nhận được sự quan tâm đáng kể về năng lượng sinh khối, tính khả thi về mặt kinh tế trong ngành dầu vi tảo vẫn chưa đạt được mục tiêu. Các nghiên cứu trong tương lai nên tập trung về việc khai thác tối đa sinh khối vi tảo và cải thiện khả năng thu hồi lipid từ vi tảo đồng thời giảm thiểu tiêu thụ năng lượng trong dây chuyền sản xuất [2].

Như đã giới thiệu ở mục 1.1.2.3 về vi tảo *Chlorella vulgaris*, với đặc tính sinh hóa của *Chlorella* dễ nuôi trồng và thành phần lipid cao (30-40%) nên *Chlorella vulgaris*, được coi là một trong những chủng có triển vọng nhất trong số 3.000 loài được sàng lọc dùng để thu nhận lipid. Nhìn chung, *C. vulgaris* thuộc nhóm có hàm lượng lipid cao, dao động từ 5 đến 58% chất khô trọng lượng [37]. Một số báo cáo chỉ ra hàm lượng lipid của *C. vulgaris* nằm trong khoảng 10-20% [4], [60], [61] [62]. Trái lại, hàm lượng lipid của *C. vulgaris* theo Nguyễn Thị Đông Phương và cộng sự (32,00±1,55%) [13][63].

Sử dụng công cụ LC-MS/MS, GC-MS, Pantami và cộng sự (2020) đã có phân tích toàn diện các thành phần hóa học của *C.vulgaris*. Trong đó thành phần axit béo của *C. vulgaris* cho thấy giàu omega-6, -7, -9 và -13 với omega-6 là axit béo chính, chiếm hơn sáu mươi phần trăm (>60%) tổng số axit béo (hình1.15). Đây là dấu hiệu rõ ràng cho thấy loài *Chlorella* này có thể là nguồn dinh dưỡng tốt khi được đưa vào chế độ ăn. Hồ sơ cũng cho thấy thành phần axit béo chủ yếu bao gồm axit béo C₁₆ - C₁₈ (>92%) (hình 1.15. C, D), điều này càng củng cố thêm cho *C. vulgaris* là ứng cử viên tiềm năng cho sản xuất dầu sinh học [64].



Hình 1.15. Đánh giá thành phần các acid béo của *Chlorella vulgaris*

Ghi chú: (A) Sắc ký ion tổng số của metyl este axit béo được chiết xuất trong *C. vulgaris* thu được bằng phân tích GC-MS (các số tương ứng với số đỉnh trong bảng 1.5) (B) Thành phần phần trăm của metyl este axit béo bão hòa và không bão hòa (C) Phân bố phần trăm của từng axit béo bão hòa so với tổng hàm lượng axit béo bão hòa (D) Phân bố phần trăm của từng axit béo không bão hòa so với tổng hàm lượng axit béo không bão hòa.

Bảng 1.5. Thành phần axit béo của *Chlorella vulgaris*.

Thứ tự peak	Tên hệ thống	Tên thông thường	Chỉ định	Thành phần (%)
1	Axit tetradecanoic	Axit myristic	C14	1.0
2	Axit pentadecanoic	-	C15	0,4
3	Axit hexadecanoic	Axit palmitic	C16	16.4
4	9- Axit hexadecenoic	Axit palmitoleic	C _{16:1} [n-7]	1,5

Thứ tự peak	Tên hệ thống	Tên thông thường	Chỉ định	Thành phần (%)
5	Axit heptadecanoic	Axit margaric	C17	1.2
6	Axit 7,10-Hexadecadienoic	-	C _{16:2} [n-6]	20,4
7	Axit octadecanoic	Axit stearic	C18	2.8
8	Axit 5-Octadecenoic	-	C _{18:1} [n-13]	0,3
9	Axit 9-Octadecenoic	Axit oleic	C _{18:1} [n-9]	4.2
10	Axit 11-Octadecenoic	-	C _{18:1} [n-7]	2.0
11	Axit 9,12-Octadecadienoic	Axit linoleic	C _{18:2} [n-6]	35,1
12	Axit nonadecanoic	-	C19	0,2
13	Axit 9,12,15-Octadecatrienoic	- Axit linolenic	C _{18:3} [n-6]	5.2
14	Axit eicosanoic	Axit arachidic	C20	5.7
15	9-Axit eicosenoic	-	C _{20:1} [n-9]	0,4
16	Axit eicosadienoic	-	C _{20:2}	1.3
17	11,14,17-Axit eicosatrienoic	Axit homolinolenic	C _{20:3} [n-6]	0,4
18	Axit heneicosanoic	Axit heneicosylic	C21	0,2
19	5,8,11,14-Axit eicosatetraenoic	Axit arachidonic	C _{20:4} [n-6]	0,6
20	Axit docosanoic	Axit Behenic	C22	0,9

1.3.2. Chiết tách dầu sinh học từ *Chlorella vulgaris*

Giống như hầu hết các vi tảo, thành tế bào của *C.vulgaris* cứng dày nên khả năng chiết xuất lipid cần được giải quyết. Như đã phân tích ở mục 1.2, mỗi phương pháp chiết dầu sinh học từ sinh khối vi tảo đều có những ưu điểm và hạn chế nhất

định. Pradana và cộng sự (2021) đã thống kê các nghiên cứu chiết xuất lipid từ *C.vulgaris* bằng các loại dung môi ở bảng 1.6[3]. Qua báo cáo này cho thấy việc chiết xuất dầu sinh học cần các dung môi vừa có độ phân cực và hòa tan được lipid, nên các hệ dung môi kết hợp không phân cực và ethanol, methanol đều được sử dụng

Bảng 1 6. Thống kê các phương pháp chiết truyền thống dầu sinh học từ C.vulgaris

Chủng vi tảo	Dung môi	Năng suất (mg/g tế bào)	Thời gian (phút)	Điều kiện trích xuất
<i>Chlorella vulgaris</i>	Hexane (dung môi có thể tái sử dụng)	184,5	360	P = 1 atm; T = nhiệt độ phòng; 20 g dung môi/tế bào g; tốc độ khuấy 1.000 vòng/phút; mẻ
<i>Chlorella vulgaris</i>	Hexane–methanol (7:3 v/v) (dung môi có thể được tái sử dụng)	185.,4	41	P = 1 atm; T = nhiệt độ phòng; 20 g dung môi/tế bào g; tốc độ khuấy 1.000 vòng/phút; mẻ
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cloroform– methanol (2:1 v/v) (dung môi có thể được tái sử dụng)	378,0	360	P = 1 atm; T = nhiệt độ phòng; 20 g dung môi/tế bào g; tốc độ khuấy 1.000 vòng/phút; mẻ
<i>Chlorella Vulgaris</i>	Chloroform– methanol (1:2 v/v) dung môi có thể được tái sử dụng)	327,0	1,440	P = 1 atm; T = nhiệt độ phòng; 200 mL dung môi/
<i>Chlorella vulgaris</i>	Dichloromethane– methanol(1:1 v/v) (dung môi có thể tái sử dụng)	8,44	60	tế bào g; tốc độ khuấy 400 vòng/phút; bình nón P = 1 atm; T = 37°C; 0,9 mL dung môi/
<i>Chlorella vulgaris</i>	Methanol–ethyl acetate (2:1 v/v) (dung môi có thể được tái sử dụng)	18,1	120	Tế bào 50 mg; ống ly tâm P = 1 atm; T = na; 20 mL dung môi/20 mg
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cloroform– methanol– nước(2:2:1 v/v/v) (dung môi có thể tái sử dụng)	246	không	P = 1 atm; T = 22–26°C; 25 mL dung môi/ Tế bào 5 g; Phương pháp Bligh và Dyer

Các phương pháp trích ly hiện đại cũng đã được áp dụng để chiết xuất các hợp chất này, trong đó phương pháp siêu âm là được quan tâm nhiều nhất (bảng 1.7)

Bảng 1.7. Thống kê các phương pháp chiết hỗ trợ siêu âm dầu sinh học từ C.vulgaris

Chủng vi tảo	Dung môi	Năng suất (mg/g tế bào)	Thời gian (phút)	Điều kiện trích xuất
--------------	----------	-------------------------------	------------------------	----------------------

<i>Chlorella vulgaris</i>	Chloroform–nước (1:1 v/v) (dung môi có thể được tái sử dụng)	311	41	P = 1 atm; T = 22–26°C; Siêu âm 20 kHz, 500 W; Chiết xuất Bligh và Dyer cho 20 mL dung môi/5 g tế bào
<i>Chlorella</i> sp.	-	215	-	P = 1 atm; T = na; Siêu âm 20 kHz, 700–1.000 W; Chiết xuất Bligh và Dyer cho tế bào 10 g
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cloroform–methanol (1:1 v/v)	80	5	P = 1 atm; T = na; Siêu âm 10 kHz; Phương pháp chiết xuất Bligh và Dyer cho 0,5 g Tế bào
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cloroform–methanol (2:1 v/v)	2.4	30	P = 1 atm; T = 40°C; Siêu âm 10 kHz; Phương pháp trích xuất Bligh và Dyer cho 10 g tế bào

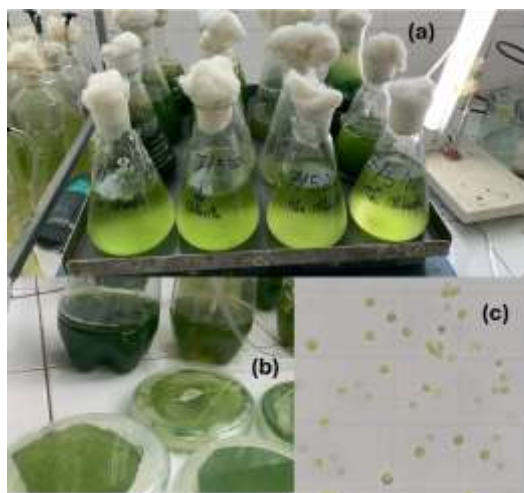
Nhiều báo cáo đã công nhận chiết xuất hỗ trợ siêu âm (UAE) được công nhận là công nghệ chiết xuất thân thiện với môi trường và hiệu quả cao. UAE có tiềm năng giảm thiểu hoặc loại bỏ nhu cầu về dung môi hữu cơ, do đó giảm tác động của nó đến môi trường.

Do đó đề tài “**Nghiên cứu các phương pháp chiết tách dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris***” được phân lập từ sinh vật phù du ở hồ Hàm Nghi (Thanh Khê, Đà Nẵng). được lựa chọn thực hiện.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Vi tảo *Chlorella vulgaris* được phân lập từ sinh vật phù du ở Hồ Hàm Nghi (kí hiệu Chủng *Chlorella* sp. NB8). Vi tảo *Chlorella vulgaris* được nuôi trong môi trường dinh dưỡng BBM để sử dụng để nghiên cứu chiết dầu sinh học.



Hình 2.1. Tăng sinh *C.vulgaris* trên BBM dịch (a) và thạch (b), hình ảnh vi tảo *C. vulgaris* dưới kính hiển vi (c)

Hóa chất nuôi cấy: Sử dụng các hóa chất làm môi trường nuôi cấy môi trường Bold's Basal medium (BBM) với thành phần dinh dưỡng như bảng 2.1[65] pha trong nước cất 2 lần

Hóa chất phân tích, trích ly: hexan, methanol, ethanol, chloroform, ethyl acetate, ether dầu hỏa, acetone theo tiêu chuẩn phân tích, Bản mỏng TLC silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, Đức).

Bảng 2.1. Thành phần môi trường BBM

STT	Thành phần	Hàm lượng (mg/L)
1	NaNO ₃	1152
2	KH ₂ PO ₄	100
3	MgSO ₄	140
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	25
5	NaHCO ₃	840
6	Hutner	0,5mL
7	Nước cất	1000 mL

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát quá trình tăng trưởng vi tảo *Chlorella vulgaris*

C. vulgaris được nuôi trong môi trường Bold's Basal medium (BBM) với nồng độ ban đầu là 0,1 g/L. Tiến hành theo dõi giá trị mật độ quang học của môi trường tại bước sóng 682 nm (OD₆₈₂) đến khi không đổi, sinh khối tế bào thu được là $0,8 \pm 0,25$ g/L trong bình tam giác 250 mL và bình phản ứng 1,5 lít ở nhiệt độ phòng 25 ± 2 °C, với mật độ ánh sáng trắng là 150 mol/μm/s. Thu nhận tảo, bảo quản vi tảo bằng phương pháp sấy khô thông thường (40°C).

2.2.2. Phương pháp khảo sát thành phần hóa học của vi tảo *Chlorella vulgaris*

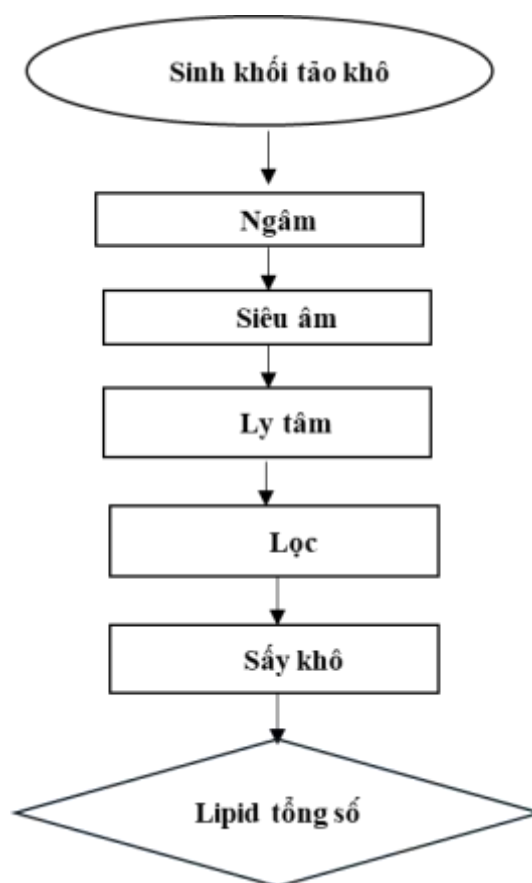
Nghiên cứu đánh giá thành phần hóa học là Protein tổng số, Lipid tổng số, protein hòa tan, đường tổng và đường đơn cũng như một số sắc tố, hàm lượng polyphenol của chủng vi tảo *Chlorella vulgaris* nuôi cấy. Đánh giá này nhằm so sánh với các chủng vi tảo khác cũng như là tài liệu tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo về vi tảo *Chlorella vulgaris*.

Các phương pháp phân tích được thực hiện theo mục 2.2.7

2.2.3. Phương pháp khảo sát dung môi chiết dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris*

Sử dụng các loại đơn dung môi (Chloromethane, Hexane, Diethyl ether, ethyl acetate) và hệ 2 dung môi (các đơn dung môi trên với methanol, ethanol) để tiến hành khảo sát điều kiện chiết lipid so với hệ dung môi Chloromethane/Methanol do Bligh và Dyer (1959) đề xuất, được kí hiệu là M0.

Phương pháp tiến hành được bố trí theo sơ đồ hình 2.2 [56]. Trộn 1g sinh khối vi tảo khô với hệ dung môi khảo sát theo tỉ lệ cao thô: dung môi=1:200 (g/ml) cho vào bình tam giác 250ml, siêu âm trong điều kiện 60%-30 phút-30°C. Sau đó ly tâm (6000 vòng/phút-10 phút), lọc bằng giấy 0,45μm thu dịch đưa đi cô quay chân không và sấy khô, cân khối lượng cao lipid. Các mẫu được đánh giá hàm lượng lipid và hiệu suất thu hồi lipid để lựa chọn dung môi thích hợp.



Hình 2.2. Sơ đồ chiết lipid bằng dung môi hữu cơ

2.2.4. Phương pháp khảo sát phương pháp chiết dầu sinh học

Nghiên cứu lựa chọn các phương pháp chiết cho hiệu quả cao trong trích ly dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris*: Với loại dung môi lựa chọn, thực hiện khảo sát chiết dầu sinh học bằng các phương pháp khác nhau để lựa chọn phương pháp phù hợp với cùng tỉ lệ dung môi/nguyên liệu. Đánh giá hiệu quả chiết theo hàm lượng dầu sinh học thu được.

2.2.5. Phương pháp khảo sát phương pháp chiết dầu sinh học bằng siêu âm

Mục đích của nghiên cứu là khảo sát ảnh hưởng đơn biến các yếu tố gồm: nhiệt độ siêu âm, thời gian siêu âm và mức năng lượng siêu âm đến hàm lượng lipid thu nhận từ sinh khối tảo *Chlorella vulgaris*.

2.2.6. Tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học bằng phương pháp siêu âm theo phương pháp bề mặt đáp ứng

Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học từ sinh khối tảo khô theo phương pháp bề mặt đáp ứng theo thiết kế Box–Behnken design (BBD) 2 mức, 3

yếu tố. Thực hiện nghiên cứu ba yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng dầu sinh học trích ly bằng siêu âm: nhiệt độ siêu âm, thời gian siêu âm và mức năng lượng siêu âm.

2.2.7. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu

Phương pháp xác định hàm lượng dầu sinh học tổng số

Áp dụng phương pháp Bligh và Dyer (1959) và được cải tiến bởi Benemann và Tillett (1987). Mẫu sinh khối khô ta cho dung môi Chloroform/methanol=2/1 vào, sau đó được siêu âm để phá vỡ màng tế bào ở tần số sóng 20 kHz trong 20 phút và ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút để thu lấy dịch phía trên. Chiết lặp lại 2 lần và dồn mẫu chiết, sấy khô dịch đến khối lượng không đổi để thu lipid. Tổng Thể tích tổng dung môi bổ sung vào mẫu sinh khối được lấy theo quy tắc 100ml dung môi trên 1 gam sinh khối[63] [66][67].

Hàm lượng dầu sinh học được định lượng bằng phương pháp sấy khô đến khối lượng không đổi: Từ dịch chiết được, tiến hành sấy khô đuổi dung môi (50°C) đến khối lượng không đổi[66][67].

$$H(\text{mg/g}) = \frac{m_1}{m} \quad (1)$$

Trong đó: m_1 : khối lượng dầu sinh học chiết được(mg);

m : khối lượng tảo sử dụng (g)

Phương pháp định tính TAG bằng sắc kí bản mỏng TLC

Sử dụng bản mỏng TLC (thin layer chromatography) với hệ pha động Petroleum ether/Diethyl ether/acid acetic. Dựa vào sự phân tách để đánh giá thành phần[68]

Phương pháp xác định mật độ quang của sinh khối vi tảo

Mật độ quang của sinh khối vi tảo có phổ hấp thu ánh sáng cực đại ở bước sóng 680nm, biểu thị sinh khối vi tảo. Do đó tiến hành lấy mẫu và đo độ hấp thu ở bước sóng trên[65].

Các phương pháp khác

- Xác định hàm lượng protein thô theo Kjeldahl [69]
- Xác định hàm lượng protein hòa tan theo Bradford [70].
- Xác định đường khử bằng phương pháp DNS theo Miller [71].
- Xác định hàm lượng polyphenol tổng số bằng phương pháp Folin-Ciaccateu
- Xác định hàm lượng đường tổng bằng phương pháp Dubois [72]
- Phương pháp xác định chlorophyll theo phổ hấp thu ánh sáng cực đại của

Chlorophyll ở các bước sóng 652nm và 665nm [73][74].

Công thức tính lượng chlorophyll như sau:

$$m_{\text{Chlorophyll a}} (\mu\text{g/mL}) = -8,0962(A_{652}) + 16,5169(A_{665})$$

$$m_{\text{Chlorophyll b}} (\mu\text{g/mL}) = 27,4405(A_{652}) - 12,1688(A_{665})$$

$$m_{\text{Chlorophyll tổng}} = m_{\text{Chlorophyll a}} + m_{\text{Chlorophyll b}}$$

$$\text{Hàm lượng Chlorophyll trong mẫu (g/100g)} = m_{\text{Chlorophyll}} \cdot F \cdot V/m$$

Trong đó: V là tổng dịch chiết chlorophyll có trong m lượng sinh khối tảo khô đem chiết, F là độ pha loãng của dịch chiết.

Sử dụng methanol để chiết chlorophyll của tảo.

- Phương pháp xác định carotenoid tổng theo phổ hấp thu ánh sáng cực đại của carotenoid tổng số ở bước sóng 480nm, sử dụng acetone làm dung môi chiết[73][74]:

$$M_{\text{carotenoid tổng}} (\mu\text{g/mL}) = 4 \cdot A_{480}$$

$$\text{Hàm lượng carotenoid tổng trong mẫu (g/100g)} = m_{\text{Carotenoid}} \cdot F \cdot V/m$$

Trong đó: V là tổng dịch chiết chlorophyll có trong m lượng sinh khối tảo khô đem chiết, F là độ pha loãng của dịch chiết.

2.2.8. Phương pháp toán học

Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học từ sinh khối tảo khô theo phương pháp bề mặt đáp ứng theo thiết kế Box–Behnken design (BBD) 2 mức, 3 yếu tố. Thực hiện nghiên cứu ba yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng dầu sinh học trích ly bằng siêu âm: nhiệt độ siêu âm, thời gian siêu âm và mức năng lượng siêu âm. Bố trí gồm 15 thí nghiệm, trong đó 2 lần lặp lại và 6 thí nghiệm tại tâm thể hiện ở bảng 2.2 và bảng 2.3 [75] [76].

Bảng 2.2. Bảng mã hóa của các yếu tố nghiên cứu

Biến nghiên cứu	Mã hóa	Các mức thí nghiệm		
		Mức min	Mức giữa	Mức max
Nhiệt độ(°C)	X1	-1	0	1
Thời gian (phút)	X2	-1	0	1
Mức năng lượng siêu âm (%)	X3	-1	0	1

Bảng 2.3. Bảng ma trận mã hóa theo thiết kế BBD

STT	X1	X2	X3	Hàm lượng đầu sinh học (%)
1	- 1	0	1	
2	0	- 1	1	
3	1	0	1	
4	0	1	1	
5	- 1	1	0	
6	- 1	- 1	0	
7	1	- 1	0	
8	1	1	0	
9	- 1	0	- 1	
10	0	- 1	- 1	
11	1	0	- 1	
12	0	1	- 1	
13	0	0	0	
14	0	0	0	
15	0	0	0	

Để xây dựng mối quan hệ giữa các thông số siêu âm trích ly và hàm lượng dầu thu được, nghiên cứu này áp dụng mô hình hồi quy bậc 2 có dạng theo phương trình 1[77]

$$Y = b_0 + \sum_{n=1}^3 b_n . X_n + \sum_{n=1}^3 b_{nn} . X_n^2 + \sum_{n=1}^3 b_{nm} . X_n . X_m \quad (1)$$

Trong đó:

b_0 là giao điểm của Y (hằng số);

b_n là hệ số hồi quy tác động tuyến tính của X_n lên Y;

b_{nn} và b_{nm} là hệ số hồi quy của hiệu ứng bậc hai trên Y ;

X_n, X_m là các giá trị độc lập.

Phương trình tham chiếu được chọn để phù hợp với dữ liệu, dựa trên giá trị R^2 , độ không phù hợp và giá trị p của mô hình ($p < 0,05$) thu được từ hồi quy bội.

2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu

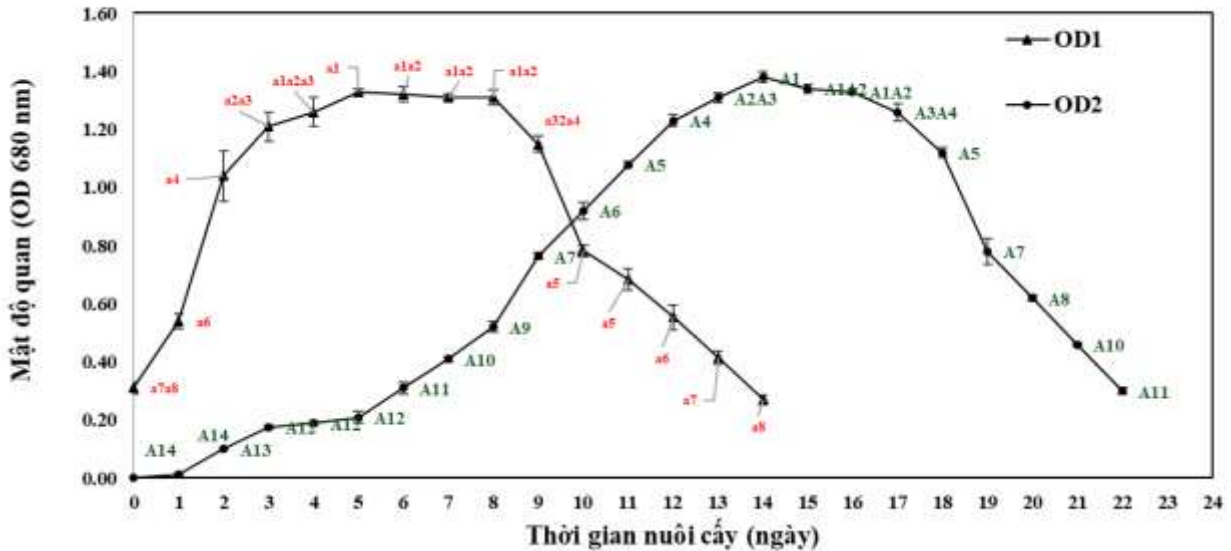
Các thí nghiệm đều được thực hiện ít nhất 3 lần, kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các số liệu đều được xử lý bằng phương pháp

phân tích phương sai ANOVA, so sánh sự khác nhau có nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$ thể hiện bằng các chữ cái a,b,c,d,e trên đầu các cột. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Tính toán phân tích ANOVA thực hiện trên phần mềm Minitab 18.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát quá trình tăng trưởng vi tảo *Chlorella vulgaris*

Thực hiện nuôi cấy và thu nhận sinh khối khô theo mục 2.3.1



Hình 3.1. Đồ thị tăng trưởng của chủng vi tảo *Chlorella vulgaris* nuôi cấy

Sự tăng trưởng của vi tảo *Chlorella vulgaris* theo 2 phương pháp cấy giống đã được khảo sát thể hiện trong Hình 3.1.

Đối với dịch nuôi tăng sinh trong môi trường BBM đã được nhân giống trước đó, ngay ngày đầu tiên có giá trị OD đạt 0,3 thì tốc độ tăng trưởng vi tảo khá nhanh, có thời gian thích nghi ngắn để đến pha logarit. Đến ngày thứ 3 đạt giá trị OD 1,128 và bắt đầu đi vào pha cân bằng cho đến hết ngày thứ 9 (OD=1,14), là thời điểm thích hợp để thu hoạch tế bào. Nồng độ chất khô của vi tảo đạt $1,54 \pm 0,02$ (g/L). Sau đó mật độ quang tế bào của vi tảo giảm dần và đến ngày thứ 13 thì dừng hệ thống.

Trong điều kiện nhân giống ở môi trường BBM có thạch agar, quá trình bắt đầu tăng trưởng từ ngày 3, sau đó tăng dần. Đến ngày thứ 19-27 đạt đến pha cân bằng trong đó ngày 21 là đạt 1,327. Đến ngày 27 đi đến pha cân bằng (OD=1,13) và bước vào pha suy vong.

Như vậy cả 2 điều kiện nuôi cấy đều hoạt động ổn định, sự tăng trưởng của chủng *Chlorella vulgaris* phát triển theo đường cong sinh trưởng, trong đó tùy từng lượng giống và điều kiện của giống mà sẽ phát triển tăng nhanh sinh khối đạt đến pha

cân bằng và sau đó suy yếu dần. Do tảo được nuôi cấy trên thạch thì cần thời gian thích nghi dài hơn So với các báo cáo trước, hệ thống nuôi tảo hoạt động ổn định [62].

Các mẫu tảo sấy khô đạt độ ẩm $1,230 \pm 0,016\%$, giúp bảo quản tốt trong suốt quá trình thực nghiệm (hình 3.2).



Hình 3.2. Sấy khô sinh khối tảo uớt

3.2. Xác định một số thành phần hóa học và hợp chất có hoạt tính sinh học của sinh khối tảo khô *Chlorella vulgaris*

Thành phần hóa học của vi tảo bao gồm chủ yếu protein, lipid, carbohydrate, sắc tố, khoáng chất và vitamin. Các thành phần này có thể được phân loại thành các chất chuyển hóa chính và thứ cấp. Các chất chuyển hóa chính thường cần thiết cho sự tăng trưởng và các quá trình trao đổi chất chính, chẳng hạn như quang hợp và hô hấp, trong khi các chất chuyển hóa thứ cấp là các phân tử có nguồn gốc từ các chất chuyển hóa chính khi sinh vật tiếp xúc với một số kích thích môi trường bất lợi. Thành phần thay đổi tùy theo loài và môi trường nuôi cấy như cường độ ánh sáng, nhiệt độ, độ pH, độ mặn và chất dinh dưỡng trong môi trường [37]. Do đó tiến hành khảo sát thành phần hóa học của chủng vi tảo nuôi cấy là cần thiết, nhằm so sánh với các vi tảo cùng loại.

3.2.1. Xác định một số thành phần hóa học của sinh khối tảo khô *Chlorella vulgaris*

Bảng 3.1. Thành phần hóa học của vi tảo *Chlorella vulgaris*

Thành phần	Hàm lượng (g/100g chất khô)	
	Mẫu OD1	Mẫu OD2
Protein tổng	$38,12 \pm 3,29$	$35,42 \pm 3,09$

Protein hòa tan	5,10±0,16	4,81±0,14
Lipid tổng	35,41±2,56	33,76±1,78
Đường tổng	8,82±0,30	8,92±0,45
Đường khử	1,29±0,08	1,32±0,09

Bảng 3.1 trình bày thành phần hóa học của vi tảo *Chlorella vulgaris* khảo sát. Theo Irene Tiong Kai Ru và cộng sự (2020) *Chlorella vulgaris* có tổng hàm lượng protein thô chiếm 43–58% trọng lượng khô, trong đó khoảng 20% protein liên kết với thành tế bào, 50% nằm trong tế bào và 30% còn lại liên tục di chuyển vào và ra khỏi tế bào. Trong nghiên cứu này, hàm lượng protein thô lần lượt đạt 38,12±3,29 và 35,42±3,09 (g/100g chất khô), hàm lượng protein hòa tan đạt 5,10±0,16 và 4,81±0,14 (g/100g chất khô) đối với 2 mẫu sinh khối và có kết quả gần với các báo cáo trên.

Hàm lượng lipid đạt 35,46±2,46(g/100g) và 33,76±1,78 (g/100g) so với chất khô của chủng nghiên cứu *Chlorella vulgaris*, thuộc nhóm có hàm lượng lipid cao, có tiềm năng trong chiết xuất dầu ăn, dầu diesel sinh học.

Thành phần còn lại là carbohydrate, trong đó hàm lượng đường tổng (8,82±0,30 g/100g chất khô) và đường khử (1,29±0,08g/100g chất khô), thuộc nhóm carbohydrate, cung cấp năng lượng.

3.2.2. Xác định một số hợp chất của sinh khối tảo khô *Chlorella vulgaris*

Với mẫu tảo khô thu nhận được, thực hiện các phân tích theo mục 2.3.5. Kết quả phân tích thành phần ở bảng 3.2.

Hàm lượng chất diệp lục tổng số có trong sinh khối vi tảo *Chlorella vulgaris* là 1,94- 1,96%, trong đó 1,22±0,15% là Chlorophyll a. Chlorophyll a. là một trong những sắc tố có trong vi tảo, cho màu xanh lục tự nhiên đã được ứng dụng trong dược phẩm, thực phẩm được đánh giá cao. Tokuşoglu và cộng sự cũng có kết quả khảo sát tương tự như trên [61].

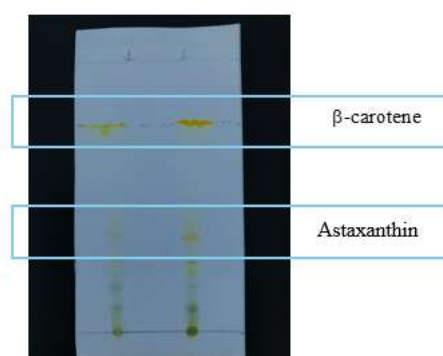
Bảng 3.2. Thành phần các hợp chất màu và polyphenol của vi tảo *Chlorella vulgaris*

Thành phần	Hàm lượng (g/100g chất khô)	
	Mẫu OD1	Mẫu OD2
Chlorophyll a	1,22±0,15	1,23±0,14
Chlorophyll b	0,72±0,06	0,78±0,08

Chlorophyll tổng số	1,94±0,21	1,96±0,19
Carotenoid tổng số	0,257±0,091	0,225±0,038
Polyphenol (g/100GAE)	3,37±0,11	3,12±0,13

Hàm lượng carotenoid tổng số của 2 mẫu sinh khối tảo nằm trong khoảng 0,225-0,257g/100g sinh khối khô. Theo báo cáo của Ahmad và cộng sự(2018), trong các carotenoid thì hàm lượng β -carotene (7-12.000 $\mu\text{g/g}$ chất khô) chiếm tỉ lệ cao nhất, kế đến là astaxanthin (550 $\mu\text{g/g}$ chất khô), Lutein (52–7141 $\mu\text{g/g}$ chất khô), anthaxanthin (362 $\mu\text{g/g}$ chất khô)[78]. Trái lại, Bazarnova và cộng sự (2022) qua phân tích bằng sắc kí HPLC carotenoid của *C.vulgaris* đã cho rằng lutein cao nhất (45%), kế đến fucoxanthin (12%) và β -carotene (4,3%). Nguyên nhân có sự khác biệt này có thể do điều kiện nuôi cấy[79].

Hình 3.3. mô tả định tính một số chất màu chiết từ *C.vulgaris* từ hexane bằng bảng mỏng TLC sử dụng hệ pha động hexane/acetone=70/30, trong đó peak màu β -carotene ở trên cùng rất rõ, kế đến là vết màu cam, là dấu hiệu nhận biết astaxanthin. Phần dưới có màu xanh là các chlorophyll.



Hình 3.3. Thử nghiệm định tính các chất màu trên sắc kí bản mỏng TLC

Hàm lượng polyphenol có trong sinh khối tảo khô được chiết bằng ethanol 80% là 3,37±0,11 (g/100GAE), tương đương với Aida I El makawy và cộng sự. (2016) [80] và thấp hơn so với báo cáo của Ru và cộng sự. (2020) [37]. Các hợp chất phenolic (PC) còn được gọi là polyphenolics là các hợp chất sinh học bao gồm một hoặc nhiều vòng phenolic có thể bị halogen hóa. PC được coi là một trong những loại chất chống oxy hóa tự nhiên quan trọng nhất. Chúng bảo vệ cả tế bào và các hóa chất tự nhiên khác của cơ thể khỏi tác hại do các gốc tự do gây ra. Các hợp chất PC của *Chlorella* sp. được tìm thấy như axit caffeic, axit ferulic và axit p-coumaric [81].

Tóm lại các mẫu tảo đã sinh trưởng và phát triển bình thường trong hệ thống nuôi cấy, có sinh khối tảo khô đảm bảo các thành phần hóa học đa lượng và

chlorophyll, β -carotene, polyphenol, là nguyên liệu sử dụng để chiết xuất lipid cũng như sử dụng trong sản xuất các sản phẩm có giá trị, tiềm năng trong chế biến thực phẩm chức năng.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng dung môi trích ly đến hiệu quả thu nhận dầu sinh học

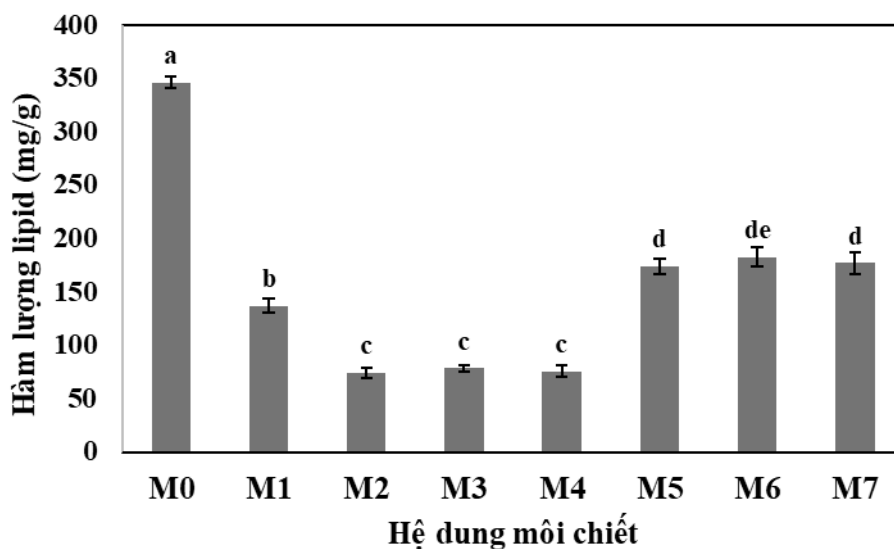
3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng dung môi trích ly đến hàm lượng dầu sinh học thu nhận

Trong các thành phần dinh dưỡng hiện có, vi tảo được coi là nguồn năng lượng bền vững đầy hứa hẹn nhờ khả năng tích lũy một lượng lớn lipid. Tiềm năng của vi tảo như là nguồn cung cấp thực phẩm và axit béo cho hiệu quả dinh dưỡng đã thu hút sự quan tâm của các nhà nghiên cứu trong nhiều thập kỷ qua. Trong đó, *Chlorella vulgaris* được xem là một trong những vi tảo được trồng chủ yếu để sản xuất dầu diesel sinh học là, được coi là một trong những chủng có triển vọng nhất trong số 3.000 loài được sàng lọc. Chúng dễ trồng, có thể phát triển mà không cần hoặc ít chú ý sử dụng nước không phù hợp với con người và dễ thu được chất dinh dưỡng [9].

Việc chiết xuất lipid từ vi tảo chịu ảnh hưởng nhiều yếu tố, trong đó phải kể đến ảnh hưởng của dung môi. Tiến hành khảo sát các hệ dung môi như bảng 3.3 [82][83], kết quả khảo sát thể hiện ở hình 3.4.

Bảng 3.3. Ký hiệu các mẫu dung môi sử dụng

Ký hiệu	Dung môi	Tỉ lệ (v/v)
M0	Chloromethane/Methanol	2/1
M1	Chloromethane	
M2	Hexane	
M3	Ethyl acetate	
M4	Diethyl ether	
M5	Diethyl ether /Methanol	2/1
M6	Hexane/methanol	2/1
M7	Hexane/ethanol	2/1



Hình 3.4. Ảnh hưởng của dung môi đến khả năng thu nhận lipid từ sinh khối vi tảo khô

Như đã nói ở trên, lipid vi tảo bao gồm lipid trung tính và lipid phân cực, este, sáp, sterol và hydrocarbon, cũng như các dẫn xuất prenyl như tocopherol, carotenoid, terpene, quinine và các dẫn xuất pyrrole như diệp lục, carotenoid. Vì vậy hỗn hợp dung môi phân cực và không phân cực đóng vai trò quan trọng trong việc sàng lọc, cải thiện hiệu quả chiết xuất lipid với hiệu suất cao và thành phần theo yêu cầu sản phẩm, cụ thể TAG là sản phẩm lipid trung tính có giá trị, hàm lượng cao, thành phần chính của dầu sinh học.

Đối với hệ đơn dung môi, chloroform cho hàm lượng cao chiết cao nhất. Có thể giải thích là do chloroform thuộc nhóm phân cực yếu, do đó có khả năng hòa tan được lipid phân cực và lipid không phân cực so với hexane và diethyl ether, đạt hiệu suất trích ly $38,73 \pm 1,14\%$.

Đối với các hệ dung môi là hỗn hợp giữa các dung môi trên và các rượu methanol, ethanol lại cho kết quả trích ly cao nhất, xếp theo thứ tự tăng dần $M5 < M6 < M4$ với hàm lượng lipid đạt 18-25%, đạt hiệu suất chiết lên đến 67% (M4) so với M0.

Kết quả khảo sát của nghiên cứu tương đồng với các báo cáo trước. Choi và cộng sự (2014) đã nghiên cứu quá trình chiết xuất lipid dựa trên dung môi từ sinh khối *C. vulgaris* khô bằng cách sử dụng ba hệ dung môi hexan, hexan/methanol (7:3, v/v) và chloroform/methanol (1:1, v/v). Nghiên cứu thu được năng suất chiết xuất lipid cao nhất, 378 mg/g tế bào, với hỗn hợp chloroform/methanol đạt được bằng hexan và hỗn hợp hexan/methanol, trong khi chỉ có giá trị chiết xuất thấp (185 mg/g tế bào) là hiệu

quả chiết xuất lipid thay đổi tùy theo hệ dung môi. Mariana Lara Menegazzo và cộng sự khi khảo sát chiết lipid ở *Chlorella pyrenoidosa* bằng các hệ dung môi chiết hexane, methanol, chloroform và chloroform/methanol (2/1) (v/v) bằng bể siêu âm, ở cùng nhiệt độ 25°C cũng cho kết quả tương tự. Theo nghiên cứu của Ansari và cộng sự (2018), chiết xuất lipid từ *Scenedesmus obliquus* bằng hỗn hợp isopropanol:hexane (2:1) cho hiệu suất cao hơn 7,8% (trọng lượng khô) so với khi chỉ sử dụng hexane (1,35%) [3].

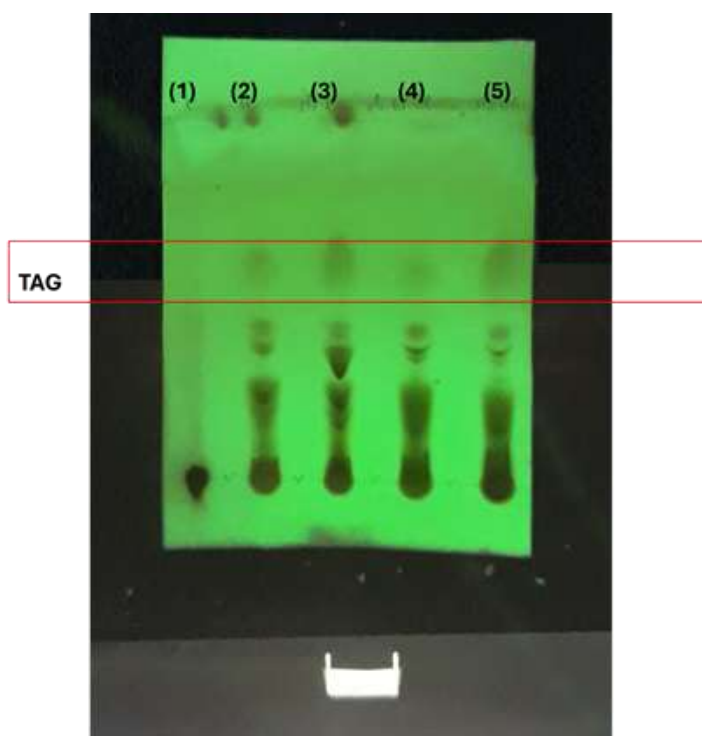
Báo cáo đã cho thấy hệ chiết bằng cloroform:methanol (2:1) theo Blight và Dyer là cao nhất, các dung môi khác chiết xuất bằng methanol, ethanol, cloroform và hexan cho hiệu quả kém hơn. Kết quả nghiên cứu chiết xuất lipid vi tảo họ *Botryococcus* cho thấy trong các điều kiện khác nhau, đạt hiệu suất cao nhất là 37,36 % so với khối lượng sinh khối khô khi sử dụng hệ dung môi n - hexan/ethanol có tỉ lệ thể tích 2/1, tại nhiệt độ trích ly 60°C và thời gian trích ly 10 giờ [14].

Việc bổ sung dung môi phân cực vào môi trường nước giúp vượt qua các rào cản cực của nước, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết xuất. Sự gia tăng độ phân cực của dung môi có thể phá vỡ lớp phospholipid, giải phóng lipid liên kết với protein màng, giúp tăng hiệu suất thu hồi lipid [2][84].

Mặt khác, việc sử dụng hỗn hợp dung môi cũng có một số hạn chế. Việc tăng cường chiết xuất lipid có thể dẫn đến sự hòa tan các lipid phân cực, làm xuất hiện tạp chất trong sản xuất dầu ăn. Ngoài ra, hỗn hợp dung môi có thể kéo theo các thành phần không mong muốn như protein và carbohydrate, gây khó khăn trong quá trình tinh chế. Bên cạnh đó, sự tạo thành azeotrope giữa isopropanol và nước làm phức tạp quá trình thu hồi dung môi. Do đó, việc lựa chọn dung môi phù hợp là yếu tố quan trọng để tối ưu hóa hiệu suất chiết xuất dầu từ vi tảo [2].

3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng dung môi trích ly đến hiệu quả thu nhận TAG

Vi tảo có thể tích lũy lipid triacylglycerol (TAG) và được coi là nguyên liệu đầu vào đầy hứa hẹn cho sản xuất nhiên liệu sinh học bền vững như một giải pháp thay thế an toàn với môi trường cho nhiên liệu hóa thạch và dầu ăn tự nhiên thay thế cho dầu có nguồn gốc thực vật, vì chúng có năng suất lipid và sinh khối cao hơn nhiều so với cây trồng có dầu, có vòng đời ngắn, có thể hấp thụ một lượng lớn CO₂ và không cần đất canh tác [85]. Vì vậy tiến hành thực nghiệm sắc kí bản mỏng TLC để định tính lượng TAG trên các dịch chiết. Kết quả thử nghiệm TLC của các mẫu cao thể hiện ở hình 3.5.



Hình 3.5. Thử nghiệm định tính TAG trên sắc kí bản mỏng TLC

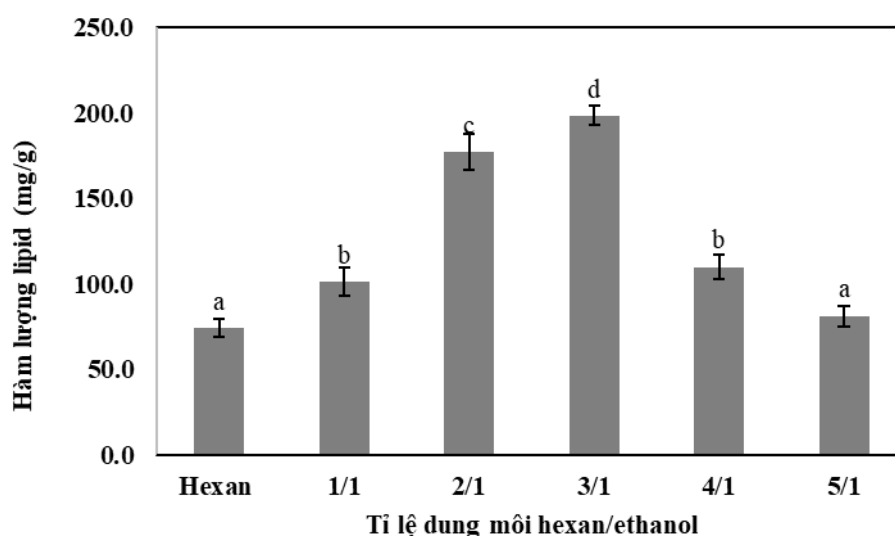
Một số hệ dung môi (Chloroform (1), hexane (2), Diethyl ether (3), Diethyl ether/methanol (4) và hexane/ethanol (5)) đã được phân tích TAG bằng bảng mỏng TLC. Kết quả nghiên cứu cho thấy các TAG thể hiện rõ ở hexane, diethyl ether, hexane/ethanol. Trong khi đó Diethyl ether/methanol có vết mờ, còn chloroform không thấy. Nguyên nhân là các hệ dung môi trên có độ chọn lọc cao với TAG, trong khi Chloroform, mặc dù cao thu được chiếm tỉ lệ cao nhưng kèm theo các thành phần lipid phân cực khác, dẫn đến rất khó khăn trong phân tách TAG. Các tác giả trước cũng quan sát thấy rằng hàm lượng và thành phần của các axit béo giữa các dung môi cũng có sự khác biệt do sự chọn lọc hòa tan của các loại lipid khác nhau [84].

Việc lựa chọn dung môi chiết cần đảm bảo độ an toàn, rẻ tiền, không độc hại. Do đó, giữa các loại dung môi chiết béo, hexane được đánh giá là dung môi thân thiện do tính trơ, có điểm sôi thấp để dễ dàng loại bỏ nó sau khi chiết và chi phí thấp, được dùng nhiều ở quy mô công nghiệp [58]. Ethanol cũng có tính phân cực và thân thiện với môi trường. Trong khi đó, methanol, chloroform có độ độc tính cao, ether có độ sôi 37°C, dễ bay hơi. Mặt khác, hiệu suất chiết giữa mẫu M7 (hexane/ethanol=2/1 (v/v)) và M5 (Diethyl ether /Methanol=2/1(v/v))) không có sự khác nhau có nghĩa về hiệu suất chiết lipid. Do đó, trong nghiên cứu này đã lựa chọn hệ dung môi

hexane/ethanol=2/1 (v/v) để khảo sát tiếp tục. Khảo sát điều kiện chiết lipid bằng phương pháp siêu âm.

3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng tỉ lệ dung môi hexane/ethanol đến hiệu quả chiết dầu sinh học

Nghiên cứu tiếp theo khảo sát tỉ lệ dung môi hexane/ethanol cho hiệu quả trích ly dầu sinh học cao nhất từ sinh khối vi tảo *C.vulgaris*. Tiến hành biến thiên tỉ lệ dung môi hexane/ethanol từ 1/1 đến 5/1 để thay đổi độ phân cực của hệ 2 dung môi trên, kết quả cho ở đồ thị hình 3.6.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của dung môi đến khả năng thu nhận lipid từ *C.vulgaris*

Kết quả khảo sát cho thấy lượng ethanol bổ sung đã tăng độ phân cực của dung môi nên gia tăng lượng lipid chiết được (tỉ lệ 2/1 và 3/1), nâng cao được hàm lượng dầu chiết so với việc chỉ sử dụng hexane. Tuy nhiên nếu bổ sung nhiều ethanol mà chúng là dung môi phân cực sẽ giảm lượng hexane sử dụng, kéo theo các hợp chất phân cực như diệp lục, carotenoid...giảm lượng lipid trung tính thu nhận, dẫn đến hiệu suất giảm. Theo kết quả khảo sát, đã lựa chọn được hệ dung môi hexane/ethanol=3/1 để chiết xuất dầu sinh học từ *C.vulgaris*.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng các phương pháp chiết đến hiệu quả thu nhận dầu sinh học

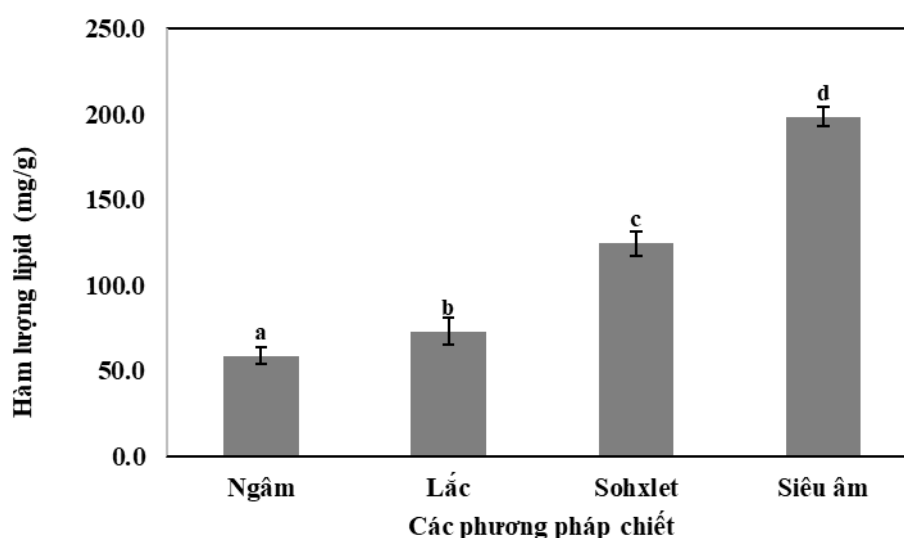
Các phương pháp chiết dầu lipid thông thường (ngâm, lắc, sohxlet) được tiến hành thực hiện để so sánh với điều kiện chiết siêu âm theo bảng 3.4.

Bảng 3.4. Điều kiện chiết của các phương pháp

STT	Phương pháp	Điều kiện chiết
1	Ngâm	7 ngày, nhiệt độ phòng[9]
2	Lắc	Lắc 150 vòng/phút, 24h- 30°C. [3]
3	Sohxlet	10 h [15]
4	Siêu âm	20 phút-30°C ở 70% NLSA[7]

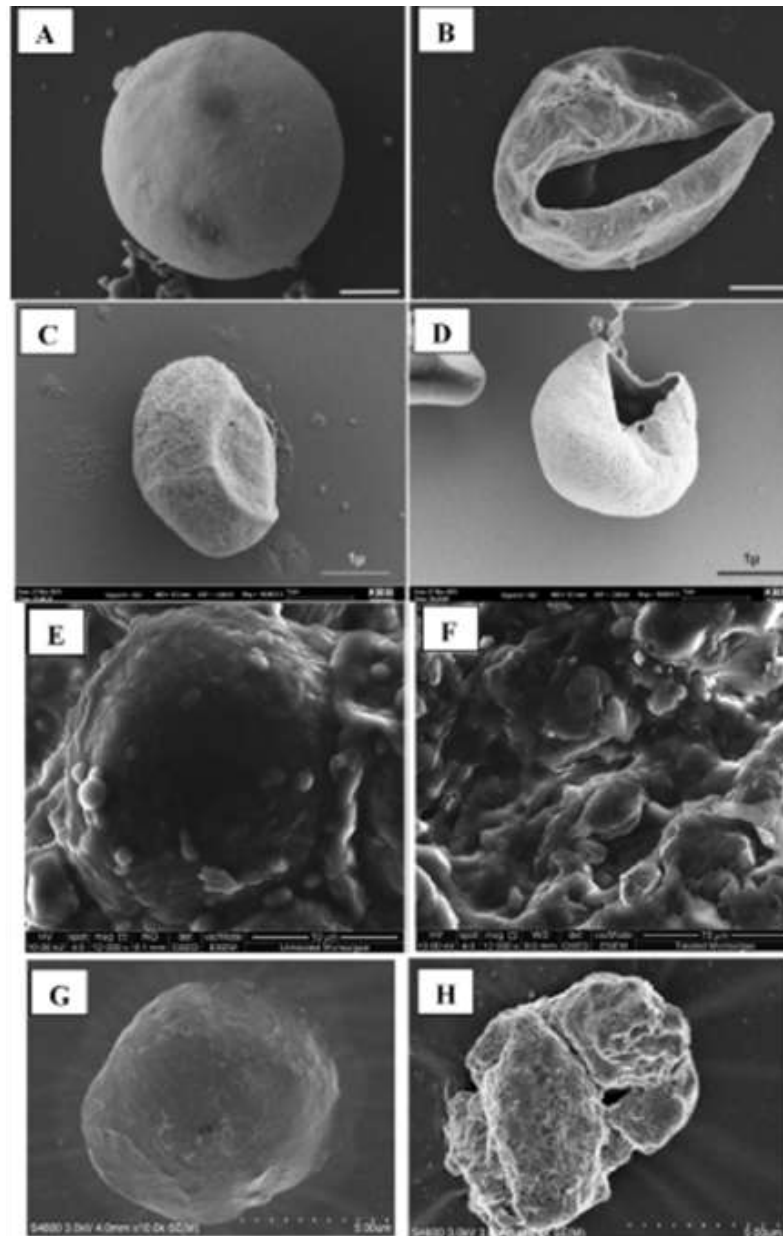
Kết quả khảo sát thu được ở hình 3.7 cho thấy rõ ràng phương pháp siêu âm cho hàm lượng dầu thu nhận cao nhất ($198,6 \pm 5,5$ mg/g), kế đến là phương pháp chiết sohxlet và ngâm và lắc. Ngoài ra, thời gian ngắn (20 phút) trong khi các phương pháp trên ít tốn năng lượng hơn nhưng kéo dài thời gian, gây tổn thất dung môi. Báo cáo tổng hợp của Pradana và cộng sự (2021) đã ghi nhận các trường hợp xử lý siêu âm trước có thể tăng sản lượng chiết xuất và giảm thời gian chiết xuất tới hơn 15 lần so với phương pháp chiết xuất hữu cơ thông thường cho *C.vulgaris*.

Vi tảo có thành cứng như *Chlorella* sp. thích hợp để xử lý bằng UAE [3]. Duangkamol Ruen-ngam và cộng sự cũng có kết quả tương tự khi chiết astaxanthin từ *Haematococcus pluvialis* đều cho thấy hiệu quả chiết cao hơn và nhanh hơn khi sử dụng các phương pháp siêu âm, vi sóng. Phương pháp sohxlet có hiệu quả chiết tương tự nhưng có thời gian dài (10-12h) [24].



Hình 3.7. Ảnh hưởng của phương pháp chiết đến hiệu quả thu nhận dầu sinh học từ *C.vulgaris*

Có thể giải thích điều này là do ở các phương pháp chiết thông thường, lipid thu nhận nhờ khuếch tán qua thành tế bào dày của vi tảo [9]. Trong khi đó, sóng âm gây ra bọt khí trong môi trường lỏng trong quá trình xử lý siêu âm. Các bong bóng tiếp tục tạo ra và xẹp xuống khi có sự thay đổi về áp suất, Vật thể phát nổ và truyền động năng đáng kể cho các tế bào xung quanh. Điều này lan truyền sóng xung kích có biên độ cao và tạo thành lực cắt cao gây ra sự vỡ tế bào vi tảo[51] [9]. Theo báo cáo tổng quan của Ying Liu và cộng sự (2022), *C. vulgaris* là một loài vi tảo có thành tế bào rất cứng nên sự phá vỡ thường đòi hỏi nhiều năng lượng để phá vỡ. Sự hình thành các gốc tự do và sự nổ tung của các bong bóng nhỏ bên trong và bên ngoài tế bào tảo có thể góp phần làm vỡ thành tế bào của *C. vulgaris* và việc sử dụng các dung môi như cloroform và dichloromethane cũng có thể làm suy yếu thành tế bào. Diện tích bề mặt riêng của tế bào tảo siêu nhỏ tăng từ 3,831 lên 11,923 m²/g sau khi chiết xuất bằng siêu âm, cho thấy sự phá hủy và phân mảnh thành tế bào. Hình dạng tròn của *C. vulgaris* chuyển thành không đều khi tiếp xúc với năng lượng siêu âm và giải phóng các thành phần tế bào như protein, lipid, axit nucleic và diệp lục làm tăng khả năng hấp thụ tia UV trong pha lỏng. Ngoài ra, các gốc tự do được tạo ra trong quá trình siêu âm có thể gây ra sự phân hủy và oxy hóa các axit béo không bão hòa đa và các hợp chất chống oxy hóa khác nếu công suất siêu âm cao hơn là 50 W và kéo dài thời gian chiết [86].



Hình 3.8. Hình chụp SEM các tế bào vi tảo trước và sau khi xử lý chiết siêu âm.

Hình 3.8. mô tả tác động của xử lý siêu âm lên hình thái thành tế bào tảo. (A) *Chlorella* sp. không xử lý, (B) *Chlorella* sp. bị vỡ sau khi xử lý siêu âm (C) *Chlamydomonas mexicana* không xử lý, (D) *Chlamydomonas mexicana* bị vỡ sau khi xử lý siêu âm (E) *H. pluvialis* không xử lý, (F) *H. pluvialis* biến dạng với cấu trúc không đều chứa đầy các lỗ rỗng trên thành tế bào sau khi xử lý siêu âm (G) *C. vulgaris* không xử lý, (H) *C. vulgaris* co lại sau khi xử lý siêu âm [86].

Kỹ thuật chiết bằng phương pháp siêu âm là một trong những kỹ thuật chiết hiện đại, thân thiện với môi trường do an toàn, kinh tế, rút ngắn thời gian trích ly. Quá trình siêu âm được thực hiện trong điều kiện áp suất khí quyển và ở nhiệt độ môi trường đã được ứng dụng nhiều trong công nghệ chiết tách nói chung và chiết lipid từ

vi tảo [58][84][86]. Do đó, với hiệu quả chiết xuất cao, thời gian chiết xuất ngắn so với các phương pháp chiết thông thường, phương pháp siêu âm được lựa chọn để khảo sát tối ưu hóa điều kiện chiết.

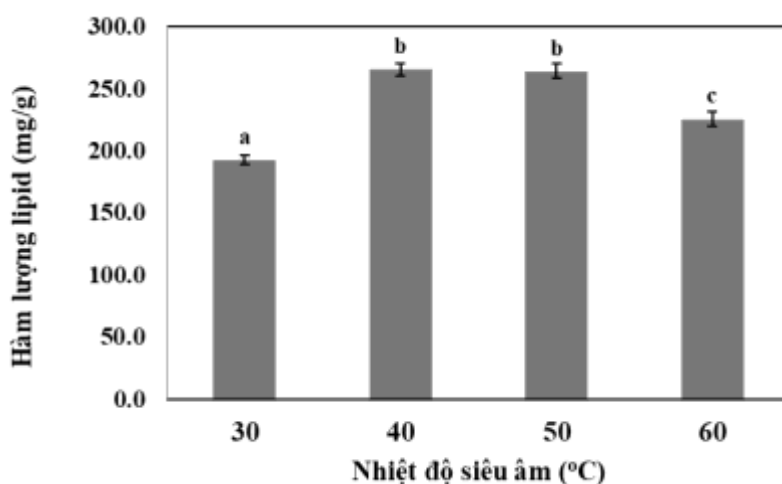
3.5. Khảo sát điều kiện chiết dầu sinh học bằng sóng siêu âm

Sử dụng thiết bị bể siêu âm dạng có ưu điểm như thiết bị đơn giản, dễ sử dụng và không bị thôi kim loại từ thanh siêu âm vào mẫu. Chiết xuất siêu âm chịu ảnh hưởng bởi tần số siêu âm, mức năng lượng siêu âm, thời gian siêu âm, nhiệt độ siêu âm. Các yếu tố này càng tăng sẽ tạo hiệu ứng cavitation càng nhiều và càng mãnh liệt, tạo ra các tác động đến thành tế bào như quá trình phân mảnh, bào mòn thành tế bào, phá vỡ tế bào tùy theo đặc tính nguyên liệu giúp cho dung môi thâm nhập sâu vào nguyên liệu để giải phóng các các vật chất bên trong một cách dễ dàng và rút ngắn thời gian chiết so với các phương pháp chiết truyền thống đồng thời làm phá hủy hay giảm các hoạt tính sinh học của chúng [7].

Do đó, trong nghiên cứu này đã thực hiện khảo sát các yếu tố nhiệt độ, thời gian và mức năng lượng siêu âm đến hiệu quả chiết lipid từ sinh khối tảo khô *Chlorella vulgaris*.

3.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm

Nhiệt độ là nhân tố quan trọng trong khâu tách chiết các hợp chất hữu cơ. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm (30°C, 40°C, 50°C, 60°C) [38] với mức NLSA là 70%, trong 20 phút. Hình 3.9 thể hiện kết quả sự ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến hiệu quả chiết dầu sinh học.

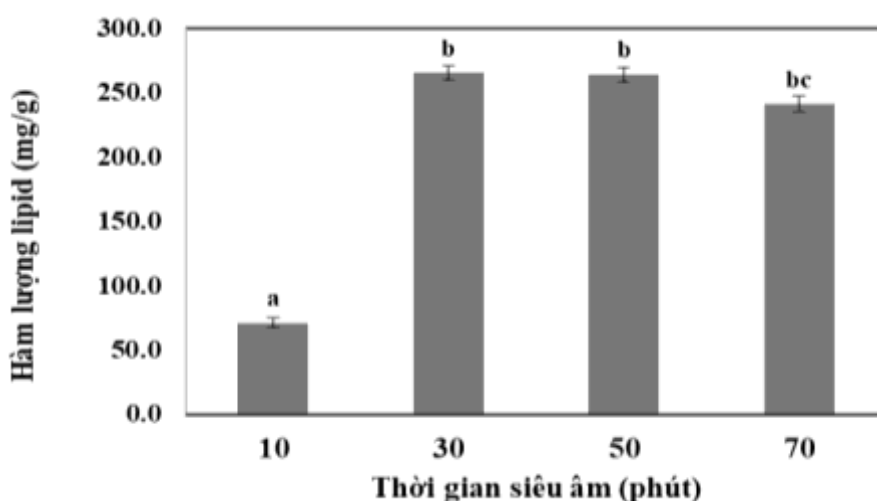


Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến hiệu quả chiết

Kết quả cho thấy khi tăng nhiệt độ siêu âm, khả năng chiết càng lớn, cho hàm lượng chiết tăng dần và đạt cao nhất là $265,7 \pm 5,4$ mg/g dầu sinh học ở 40°C , và 50°C và sau đó giảm. Theo báo cáo của Mariana Lara Menegazzo và cộng sự. (2018) sử dụng bể siêu âm, nhiệt độ siêu âm là 25°C [84]. Trong khi đó, Bilel Hadrich và cộng sự. (2018) khi thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết lipid trên *Chlorella* sp. sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng đã đạt được điều kiện chiết tối ưu là 30 phút- 60°C , sử dụng dung môi Chloroform/methanol = 2/1 (v/v), đạt hàm lượng chiết là 22,60%, cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu [7]. Các thống kê về điều kiện chiết lipid từ *Chlorella vulgaris* của Pradana và cộng sự (2021) ở mức 40°C hoặc $22-26^\circ\text{C}$ tùy tần số của thiết bị siêu âm [3]. Nhìn chung, do hiện tượng tăng nhiệt cục bộ khi siêu âm nên khi tăng nhiệt độ môi trường chiết thì quá trình tạo bọt bong bóng càng xảy ra mãnh liệt, dẫn đến hiện tượng dung môi hexane bay hơi mạnh đồng thời tăng nhiệt độ cũng làm phân hủy các hợp chất lipid cho nên hiệu quả chiết giảm [24][86][87].

3.5.2. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm

Hình 3.10 thể hiện kết quả sự ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hàm lượng lipid, ta thực hiện khảo sát ở các mốc thời gian 10 phút, 30 phút, 50 phút, 70 phút.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hàm lượng lipid

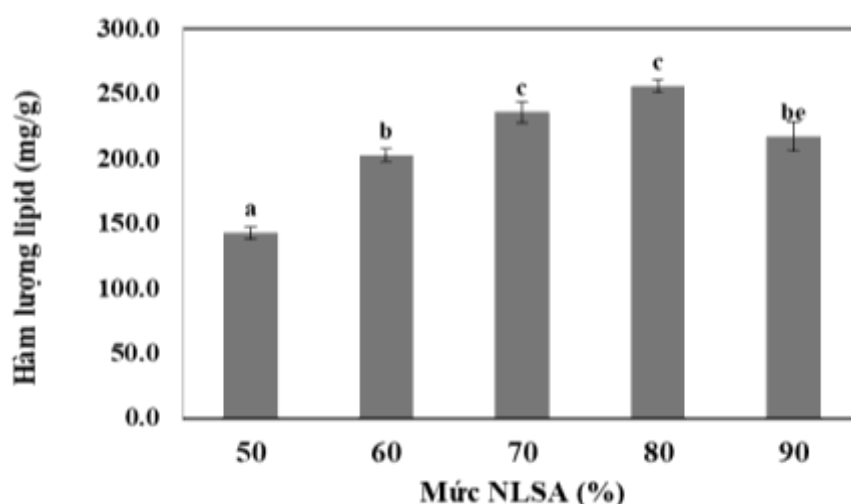
Thời siêu âm ảnh hưởng đến quá trình chiết, thời gian càng tăng càng nâng cao hàm lượng chiết, đạt cao nhất ở 30 phút và có bắt đầu giảm dần.

Duangkamol Ruen-ngam và cộng sự (2021) cũng có kết quả tương tự khi chiết astaxanthin từ *H. pluvialis* đều cho thấy hiệu quả chiết cao hơn. Đối với phương pháp UAE, tất cả nhiệt độ chiết xuất đều cho thấy sự thu hồi astaxanthin nhanh chóng (lên đến $41 \pm 2\%$) trong vòng 5 phút đầu tiên và sau đó, trong khoảng từ 5 đến 30 phút, chỉ

tăng dần. Cần lưu ý rằng, mặc dù có hiệu ứng tạo bọt của UAE, nhưng sự thu hồi astaxanthin không tăng đáng kể, so với quá trình ngâm, trong 30 phút đầu tiên. Điều này có thể là do thực tế là tạo bọt siêu âm tạo ra các điểm nóng cục bộ phá hủy các phân tử astaxanthin. Tuy nhiên, sau 30 phút, sự thu hồi chiết xuất lại tăng lên cho đến phút thứ 60 lên khoảng $70 \pm 2\%$. Sau mức tối đa này, mức astaxanthin cuối cùng đã giảm xuống khi thời gian chiết xuất tiến gần đến 90 phút. Sự thu hồi astaxanthin tối đa đối với UAE được tìm thấy ở nhiệt độ chiết xuất là 45°C trong 60 phút [24]. Cùng 1 mức năng lượng siêu âm, khi thời gian siêu âm càng dài thì càng tạo điều kiện cho dung môi thâm nhập thực hiện quá trình chuyển khối và sau đó hàm lượng chiết sẽ không tăng hoặc giảm dần khi đạt cân bằng [87]. Do đó trong nghiên cứu này, thời gian lựa chọn là 30 phút để thực hiện chiết ở bước kế tiếp.

3.5.3. Ảnh hưởng mức năng lượng siêu âm

Hình 3.11 thể hiện kết quả sự ảnh hưởng của mức năng lượng siêu âm đến hàm lượng lipid thu được, ta thực hiện khảo sát ở các mức năng lượng 50%, 60%, 70%, 80% và 90%.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của mức năng lượng siêu âm đến hiệu quả chiết

Cùng điều kiện nhiệt độ và thời gian 30°C -40 phút, mức NLSA 80% cho hiệu quả chiết cao nhất là $255,7 \pm 5,1$ mg/g dầu sinh học. Giữa mẫu 70% và 80% mức năng lượng siêu âm không có sự khác nhau có nghĩa. Có thể nhận thấy nếu tăng mức NLSA giúp hình thành nhiều bọt bong bóng với năng lượng lớn làm tăng quá trình xâm thực, phá vỡ tế bào dẫn đến gia tăng hàm lượng dầu sinh học chiết. Tuy nhiên sau đó nhanh

chóng không tăng hoặc giảm hàm lượng chiết do chính các bong bóng sẽ phá hủy các hợp chất chiết được. Do đó nghiên cứu chọn mức siêu âm 70% là phù hợp [87].

Tóm lại, sử dụng phương pháp chiết siêu âm đã cho hiệu suất trích ly gấp 1,5 lần so với chưa khảo sát điều kiện chiết siêu âm, đạt hiệu suất thu hồi gần 70%. Kết quả nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện chiết 30 phút-40°C-mức năng lượng siêu âm 70% để chiết lipid từ sinh khối tảo khô *C. vulgaris*.

3.6. Tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học bằng phương pháp siêu âm theo phương pháp bề mặt đáp ứng

3.6.1. Thiết lập mô hình hồi quy theo Box- Behnken

Nghiên cứu này nhằm xác định ảnh hưởng của các yếu tố trích ly bao gồm nhiệt độ siêu âm (°C) (X1), thời gian siêu âm (phút) (X2), mức NLSA đến hàm lượng dầu sinh học thu được từ sinh khối *C.vulgaris*, đồng thời tìm ra điều kiện tối ưu để đạt hiệu suất chiết xuất cao nhất. Tổng cộng 30 thí nghiệm với số lần lặp lại là 2, bao gồm 6 điểm trung tâm, đã được tiến hành theo thiết kế Box-Behnken trong Bảng 3.5. Kết quả thực nghiệm thu nhận dầu sinh học theo ma trận các yếu tố ảnh hưởng theo mô hình Box-Behnken như ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả thực nghiệm thu nhận dầu sinh học theo ma trận các yếu tố ảnh hưởng theo mô hình Box-Behnken

STT	X1	X2	X3	Nhiệt độ siêu âm (°C)	Thời gian siêu âm (phút)	Mức năng lượng siêu âm (%)	Hàm lượng dầu sinh học (mg/g)
1	- 1	0	1	30	30	80	212,1
2	0	- 1	1	40	20	80	236,6
3	1	0	1	50	40	80	249,2
4	0	1	1	40	40	80	277,6
5	- 1	1	0	30	40	70	231,5
6	- 1	- 1	0	30	20	70	182,0
7	1	- 1	0	50	20	70	267,2
8	1	1	0	50	40	70	271,1
9	- 1	0	- 1	30	30	60	165,9
10	0	- 1	- 1	40	20	60	181,2
11	1	0	- 1	50	30	60	241,9
12	0	1	- 1	40	40	60	231,8

13	0	0	0	40	30	70	258,2
14	0	0	0	40	30	70	275,7
15	0	0	0	40	30	70	251,2
16	-1	0	1	30	30	80	227,9
17	0	-1	1	40	20	80	258,7
18	1	0	1	50	40	80	271,3
19	0	1	1	40	40	80	255,2
20	-1	1	0	30	40	70	213,1
21	-1	-1	0	30	20	70	192,2
22	1	-1	0	50	20	70	257,4
23	1	1	0	50	40	70	260,7
24	-1	0	-1	30	30	60	176,2
25	0	-1	-1	40	20	60	197,7
26	1	0	-1	50	30	60	231,1
27	0	1	-1	40	40	60	231,2
28	0	0	0	40	30	70	277,9
29	0	0	0	40	30	70	256,3
30	0	0	0	40	30	70	271,6

Từ các phân tích hồi quy tuyến tính của 30 thí nghiệm đã xây dựng được phương trình hồi quy bậc hai của quá trình trích ly hàm lượng dầu sinh học ở phương trình (2)

$$Y = -1923 + 26.61 X_1 + 14.17 X_2 + 37.04 X_3 - 0.2127 X_1 \cdot X_1 - 0.0947 X_2 \cdot X_2 - 0.2193 X_3 \cdot X_3 - 0.0790 X_1 \cdot X_2 - 0.0630 X_1 \cdot X_3 - 0.0583 X_2 \cdot X_3 \quad (2)$$

3.6.2. Phân tích sự có nghĩa và sự tương quan của mô hình

Bảng 3.6. Kết quả phân tích ANOVA của phương trình hồi quy và hệ số của phương trình

Source	Bậc tự do DF	Tổng bình phương SS	Trung bình bình phương MS	Giá trị F	Giá trị p
Mô hình (Model)	9	29745,8	3305,1	28,25	0
Tuyến tính	3	21952,5	7317,5	62,55	0
X1	1	12600,1	12600,1	107,7	0
X2	1	2480	2480	21,2	0
X3	1	6872,4	6872,4	58,74	0
Phi tuyến	3	6705	2235	19,1	0
X1*X1	1	3342,5	3342,5	28,57	0

X2*X2	1	663	663	5,67	0,027
X3*X3	1	3549,8	3549,8	30,34	0
Tương tác	3	1088,2	362,7	3,1	0,05
X1*X2	1	499,3	499,3	4,27	0,052
X1*X3	1	317,5	317,5	2,71	0,115
X2*X3	1	271,4	271,4	2,32	0,143
Sai số (Error)	20	2339,8	117		
Độ không phù hợp (Lack-of-Fit)	3	267,9	89,3	0,73	0,547
Sai số thuần (Pure Error)	17	2071,9	121,9		
Tổng	29	32085,6			

Bảng 3.7. Hệ số tương quan

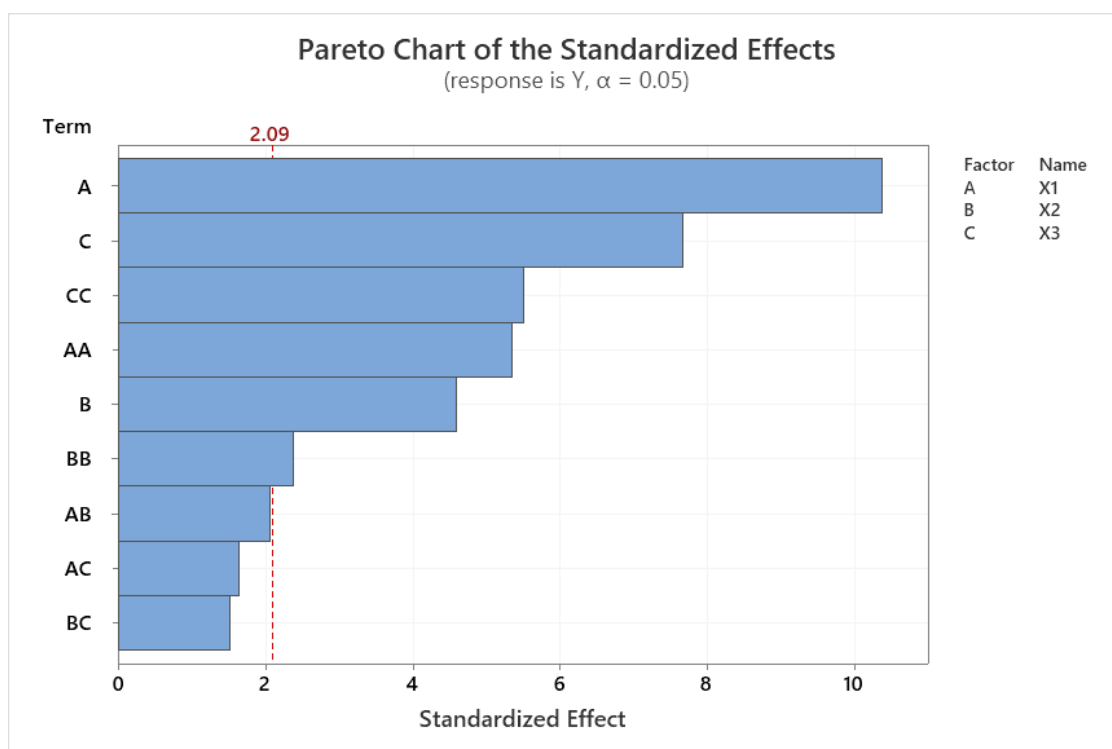
Hệ số	Giá trị hệ số	Sai số	Giá trị T	Giá trị P	VIF
Hằng số	265,15	4,42	60,05	0	
X1	28,06	2,7	10,38	0	1
X2	12,45	2,7	4,6	0	1
X3	20,72	2,7	7,66	0	1
X1*X1	-21,28	3,98	-5,35	0	1,01
X2*X2	-9,47	3,98	-2,38	0,027	1,01
X3*X3	-21,93	3,98	-5,51	0	1,01
X1*X2	-7,9	3,82	-2,07	0,052	1
X1*X3	-6,3	3,82	-1,65	0,115	1
X2*X3	-5,83	3,82	-1,52	0,143	1

Bảng 3.8. Hệ số R^2

S	R^2	R^2 hiệu chỉnh (R^2 adj)
10.8162	92.71%	89.43%

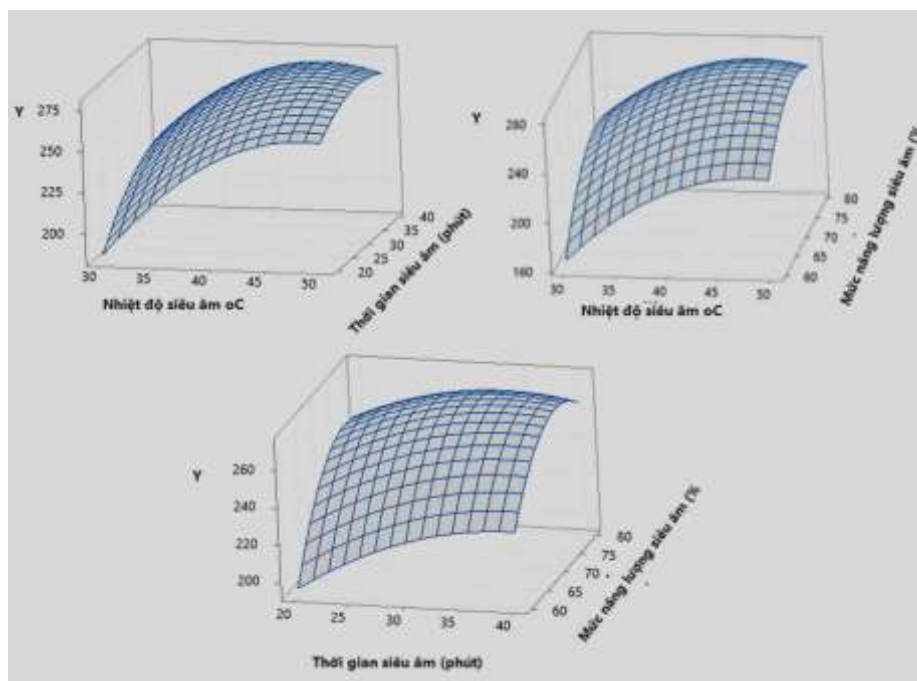
Kết quả phân tích ANOVA của mô hình bậc hai của hàm mục tiêu Y đã được đánh giá bằng các giá trị F, p và R^2 tương ứng (Bảng 3.6 và 3.7). Giá trị $F = 30,01$ và $p = 0,00 < 0,05$; cho thấy mô hình hoàn toàn có ý nghĩa thống kê $R^2 = 93,11\%$ ($p < 0,0001$). Như vậy mô hình thiết lập có độ tương quan cao với mô hình thực nghiệm (bảng 3.9).

Biểu đồ pareto (hình 3.12) thể hiện độ ảnh hưởng của các nhân tố đến hiệu quả trích ly dầu sinh học từ sinh khối *C.vulgaris*, cụ thể các yếu tố ảnh hưởng mạnh là Mức năng lượng siêu âm, nhiệt độ siêu âm (bậc 1 và bậc 2). Kế đến là sự ảnh hưởng của thời gian siêu âm (bậc 1 và bậc 2).



Hình 3.12. Biểu đồ Pareto

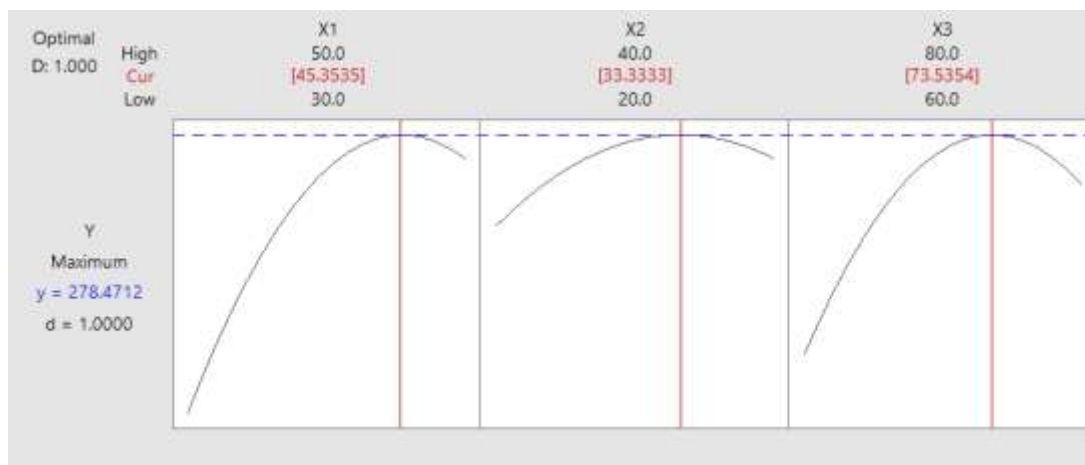
Kết quả từ Hình 3.13 cho thấy, mặt đáp ứng biểu diễn tác động tương hỗ giữa các yếu tố đến quá trình chiết (thể hiện mặt cong). Trong đó, nhiệt độ và mức NLSA đóng vai trò quan trọng do các phản ứng này đạt đến giá trị tối đa. Dưới một giới hạn nhất định, nhiệt độ cao hơn sẽ cải thiện hiệu quả chiết xuất do hệ số hòa tan và khuếch tán của lipid tăng lên; độ nhớt của dung môi giảm; tăng cường truyền khối và thâm nhập của dung môi vào ma trận vật liệu.



Hình 3.13. Bề mặt đáp ứng của hàm lượng dầu sinh học

3.6.3. Tối ưu hóa điều kiện chiết

Đường cong tối ưu hóa quy trình, cho phép xác định các điều kiện tối ưu của các biến độc lập để thu được giá trị mong muốn của phản ứng, được trình bày trong Hình 3.14.



Hình 3. 14. Đường cong tối ưu hóa từng yếu tố ảnh hưởng lên quá trình chiết siêu âm

Như có thể thấy ở hình 3.13, kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết mô phỏng trên phần mềm Minitab ver 18 với nhiệt độ siêu âm là 45,35°C, thời gian siêu âm là 33,33 phút ở mức năng lượng là 73,53% và dự đoán giá trị tối ưu là 278,47±4,03(mg/g) và nằm trong miền thực nghiệm. Bilel Hadrich và cộng sự đã đạt

được điều kiện chiết lọc tối ưu là 30 phút-60°C, sử dụng dung môi Chloroform/methanol =2/1 (v/v), đạt hàm lượng chiết là 22,60% với thiết bị siêu âm dạng bể có tần số siêu âm 40kHz, năng suất siêu âm là 60W [7]. Trong khi đó, nghiên cứu đề tài sử dụng thiết bị siêu âm có cùng tần số nhưng năng suất cao hơn (528W), do đó năng lượng siêu âm cao nên không tăng nhiệt độ.

Để kiểm soát sự chính xác của mô hình, các giá trị thực nghiệm kiểm chứng được tiến hành theo các điều kiện chiết tối ưu như mô hình dự đoán và đạt hiệu quả chiết dầu sinh học là $276,05 \pm 5,12$ (mg/g), đạt $79,21 \pm 3,02\%$ khi so sánh với phương pháp chiết bằng dung môi chloroform/methanol=2/1 (bảng 3.9).

Bảng 3 9. Tóm tắt kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết dầu sinh học.

Đại lượng	Giá trị
Nhiệt độ (°C)	45,35
Thời gian (phút)	33.33
Mức NLSA (%)	73,53
Hàm lượng dầu sinh học dự đoán (mg/g)	$278,47 \pm 4,03$
Hàm lượng dầu sinh học thực nghiệm theo điều kiện tối ưu (mg/g)	$274,05 \pm 10,47$

Như vậy có thể thấy rõ có sự tương quan giữa hai giá trị tính toán mô phỏng và thực nghiệm, khẳng định tính chính xác của mô hình.



Hình 3 15. Hình ảnh dầu sinh học chiết xuất từ C.vulgaris

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Qua quá trình thực hiện đề tài “**Nghiên cứu các phương pháp chiết tách dầu sinh học từ vi tảo *Chlorella vulgaris***” đã đưa ra các kết luận như sau:

- 1) Sự tăng trưởng của chủng *Chlorella vulgaris* phát triển theo đường cong sinh trưởng, trong đó tùy từng lượng giống và điều kiện của giống mà sẽ phát triển tăng nhanh sinh khối đạt đến pha cân bằng và sau đó suy yếu dần.
- 2) Các mẫu tảo đã sinh trưởng và phát triển bình thường trong hệ thống nuôi cấy, có sinh khối tảo khô đảm bảo các thành phần hóa học đa lượng và vi lượng, là nguyên liệu sử dụng để chiết xuất lipid cũng như sử dụng trong sản xuất các sản phẩm có giá trị, tiềm năng trong chế biến thực phẩm chức năng.
- 3) Trong 7 hệ đơn dung môi (chloroform, ethyl acetate, diethyl ether và hexane(và nhị dung môi (hexane/ethanol, hexane/methanol, diethyl ether/methanol) đã lựa chọn dung môi hexane/ethanol =3/1 (v/v) cho hiệu quả chiết xuất lipid cao, đạt hàm lượng dầu sinh học chiết được là $198,6 \pm 5,5$ (mg/g) và thân thiện với môi trường.
- 4) Đã nghiên cứu sử dụng 4 phương pháp trích ly: ngâm, lắc, sohxlet và siêu âm cho thấy quá trình chiết siêu âm cho hiệu quả cao nhất, kế đến là phương pháp sohxlet ($124,3 \pm 7,4$ mg/g) và thấp nhất là phương pháp ngâm ($58,6 \pm 5,1$ mg/g). Lựa chọn được phương pháp siêu âm để khảo sát tiếp theo
- 5) Tiến hành khảo sát đơn biến các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly siêu âm gồm nhiệt độ chiết (30-70), thời gian chiết siêu âm (5-60), % mức năng lượng siêu âm (50,60,70,80%) và thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết siêu âm bằng phương pháp bề mặt đáp ứng theo mô hình Box Behnken. Kết quả cho thấy các yếu tố đều thể hiện sự ảnh hưởng, đáp ứng mô hình.
- 6) Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết mô phỏng trên phần mềm Minitab với nhiệt độ siêu âm là $45,35^{\circ}\text{C}$, thời gian siêu âm là 33,33 phút và mức NLSA 73,53%. Tiến hành theo các điều kiện chiết tối ưu như mô hình dự đoán và đạt hiệu quả chiết dầu sinh học là $274,05 \pm 10,47$ (mg/g), không có sự khác biệt có nghĩa so với giá trị mô hình dự đoán.

Kiến nghị

Khảo sát hực hiện tinh chế các phân đoạn TAG và các chất màu chlorophyll, carotenoid từ dầu sinh học thu nhận được bằng sắc kí cột nhồi, sử dụng silica gel ứng dụng trong thực phẩm

Khảo sát điều kiện nuôi cấy và chiết xuất các hợp chất carotenoid (astaxanthin, β -carotene, ...) từ các loại vi tảo *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Cooney, G. Young, and N. Nagle, “Extraction of bio-oils from microalgae,” *Sep. Purif. Rev.*, vol. 38, no. 4, pp. 291–325, 2009, doi: 10.1080/15422110903327919.
- [2] Z. Xue, F. Wan, W. Yu, J. Liu, Z. Zhang, and X. Kou, “Edible oil production from microalgae: A review,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, pp. 1–52, 2018.
- [3] Y. S. Pradana, B. R. Sadewo, S. A. Haryanto, and H. Sudibyo, “Selection of oil extraction process from *Chlorella* species of microalgae by using multi-criteria decision analysis technique for biodiesel production,” *Open Chem.*, vol. 19, no. 1, pp. 1029–1042, 2021, doi: 10.1515/chem-2021-0092.
- [4] S. F. Ahmed *et al.*, “Bio-oil from microalgae: Materials, production, technique, and future,” *Energy Reports*, vol. 10, pp. 3297–3314, 2023, doi: 10.1016/j.egy.2023.09.068.
- [5] M. Soleimani khorramdashti, M. Samipoor Giri, and N. Majidian, “Extraction lipids from *chlorella vulgaris* by supercritical CO₂ for biodiesel production,” *South African J. Chem. Eng.*, vol. 38, pp. 121–131, 2021, doi: 10.1016/j.sajce.2021.03.008.
- [6] J. Zhou *et al.*, “Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches,” *Food Chem.*, vol. 384, no. January, p. 132236, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132236.
- [7] B. Hadrich, I. Akremi, M. Dammak, M. Barkallah, I. Fendri, and S. Abdelkafi, “Optimization of lipids’ ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface methodology,” *Lipids Health Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1186/s12944-018-0702-z.
- [8] B. Naveena, P. Armshaw, and J. Tony Pembroke, “Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1186/s13068-015-0321-0.
- [9] R. J. A. Saracanolao, J. O. Nacorda, and H. P. Hernandez, “Influence of different extraction methods on fatty acid composition of lipid extracts of *Chlorella vulgaris* Beijerinck from laguna de bay, Philippines,” *Philipp. J. Sci.*, vol. 148, no. 1, pp. 95–104, 2019.
- [10] Nguyễn Thị Mỹ Lan, Đoàn Thị Mộng Thắm, Huỳnh Hiệp HùngL, Lê Thị Thanh Loan, Phạm Thành Hồ, and Lê Thị Mỹ Phước, “Khảo sát khả năng tăng trưởng và tích lũy lipid của các chủng vi tảo phân lập tại Việt Nam,” *Tạp chí Phát triển KH&CN*, vol. 17, no. T2, pp. 15–26, 2014.
- [11] H. T. Y. Trần Thị Thu Quỳnh, Trần Thu Hà, Đỗ Thị Tuyên, Nguyễn Thị Thu Huyề, Lại Thị Ngọc Hà, Đinh Thị Thu Hằng, Đặng Diễm Hồng, “Nghiên cứu điều kiện thích hợp cho tách chiết hỗn hợp axit béo không no (omega-3,6,7,9) từ sinh khối khô vi khuẩn tía quang hợp,” in *HỘI NGHỊ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC*, 2020, pp. 261–267.
- [12] Đ. T. N. Mai, L. T. Thơm, N. C. Hà, B. Đ. Lãm, H. L. Anh, and Đ. D. Hồng, “NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG XỬ LÝ TÁI DIESEL SINH HỌC CHẾ TẠO LỢI NG,” vol. 51, no. 2, pp. 185–192, 2013.
- [13] Hồ Quốc Phong, Trần Đông Ân, T. S. Ngọc, Huỳnh Thị Ngọc Hiền, Huỳnh Liên Hương, and Nguyễn Trọng Tuấn, “Sản xuất chất béo từ vi tảo *Chlorella* sp. sử

- dụng tổng hợp diesel sinh học,” *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol. 35, pp. 1–8, 2014.
- [14] Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Đăng Toàn, and Đinh Thị Ngọc, “Nghiên cứu chiết tách dầu từ sinh khối vi tảo họ làm nguyên liệu cho quá trình tổng hợp biodiesel,” *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, vol. 53, no. 5, pp. 646–653, 2015.
 - [15] P. S. Corrêa, W. G. Morais Júnior, A. A. Martins, N. S. Caetano, and T. M. Mata, “Microalgae biomolecules: Extraction, separation and purification methods,” *Processes*, vol. 9, no. 1, pp. 1–40, 2021, doi: 10.3390/pr9010010.
 - [16] J. F. Wong, H. J. Hong, S. C. Foo, M. K. K. Yap, and J. W. Tan, “A review on current and future advancements for commercialized microalgae species,” *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 11, no. 5, pp. 1156–1170, 2022, doi: 10.1016/j.fshw.2022.04.007.
 - [17] J. Sen Tan *et al.*, “A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids,” *Bioengineered*, vol. 11, no. 1, pp. 116–129, 2020, doi: 10.1080/21655979.2020.1711626.
 - [18] B. R. Kiran and S. V. Mohan, “Microalgal Cell Biofactory—Therapeutic, Nutraceutical and Functional Food Applications,” *Plants*, vol. 10, p. 836, 2021.
 - [19] S. Mobin and F. Alam, “Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review,” *Energy Procedia*, vol. 110, pp. 510–517, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.egypro.2017.03.177.
 - [20] B. Marjanović *et al.*, “Bioactive Compounds from *Spirulina* spp.—Nutritional Value, Extraction, and Application in Food Industry,” *Separations*, vol. 11, no. 9, p. 257, 2024, doi: 10.3390/separations11090257.
 - [21] N. K. Z. AlFadhly, N. Alhelfi, A. B. Altemimi, D. K. Verma, F. Cacciola, and A. Narayanankutty, “Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of *Spirulina* and Their Health Benefits: A Review,” *Molecules*, vol. 27, no. 17, pp. 1–40, 2022, doi: 10.3390/molecules27175584.
 - [22] P. Boonnoun and Y. Kurita, “Wet Extraction of Lipids and Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by Liquefied Dimethyl Ether,” *J. Nutr. Food Sci.*, vol. 4, no. 5, 2016, doi: 10.4172/2155-9600.1000305.
 - [23] S. N. H. Oslan *et al.*, “A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 2, p. 256, Feb. 2021, doi: 10.3390/biom11020256.
 - [24] D. Ruen-ngam, A. Shotipruk, and P. Pavasant, “Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*,” *Sep. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 1, pp. 64–70, 2011, doi: 10.1080/01496395.2010.493546.
 - [25] K. Miyakawa, “Commercial Production of Astaxanthin from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*,” 2021, pp. 3–10. doi: 10.1007/978-981-15-7360-6_1.
 - [26] V. J. Grujić, B. Todorović, R. Kranvogel, T. Ciringier, and J. Ambrožič-Dolinšek, “Diversity and Content of Carotenoids and Other Pigments in the Transition from the Green to the Red Stage of *Haematococcus pluvialis* Microalgae Identified by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS,” *Plants*, vol. 11, no. 8, p. 1026, Apr. 2022, doi: 10.3390/plants11081026.
 - [27] M. Gong and A. Bassi, “Carotenoids from microalgae: A review of recent developments,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 8, pp. 1396–1412, 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005.

- [28] S. Kumar, R. Kumar, A. Kumari, and A. Panwar, "Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential," *J. Basic Microbiol.*, vol. 62, no. 9, pp. 1064–1082, Sep. 2022, doi: 10.1002/jobm.202100391.
- [29] J. Kowshik *et al.*, "Astaxanthin inhibits hallmarks of cancer by targeting the PI3K/NF- κ B/STAT3 signalling axis in oral squamous cell carcinoma models," *IUBMB Life*, vol. 71, no. 10, pp. 1595–1610, Oct. 2019, doi: 10.1002/iub.2104.
- [30] X. Liu *et al.*, "Antioxidation and anti-ageing activities of different stereoisomeric astaxanthin in vitro and in vivo," *J. Funct. Foods*, vol. 25, pp. 50–61, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jff.2016.05.009.
- [31] M. M. R. Shah, Y. Liang, J. J. Cheng, and M. Daroch, "Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, Apr. 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00531.
- [32] Y. Lemoine and B. Schoefs, "Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress," *Photosynth. Res.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 155–177, Nov. 2010, doi: 10.1007/s11120-010-9583-3.
- [33] B. Lin *et al.*, "Construction of astaxanthin metabolic pathway in the green microalga *Dunaliella viridis*," *Algal Res.*, vol. 44, p. 101697, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.algal.2019.101697.
- [34] S. Kathiresan, A. Chandrashekar, G. A. Ravishankar, and R. Sarada, "Regulation of astaxanthin and its intermediates through cloning and genetic transformation of β -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*," *J. Biotechnol.*, vol. 196–197, pp. 33–41, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.006.
- [35] B. Y. Zhang, Y. H. Geng, Z. K. Li, H. J. Hu, and Y. G. Li, "Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process," *Aquaculture*, vol. 295, no. 3–4, pp. 275–281, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.043.
- [36] Z. Fei *et al.*, "Improving astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* on the outdoor large scale cultivation by optimizing the disinfection strategy of photobioreactor," *Algal Res.*, vol. 64, p. 102708, May 2022, doi: 10.1016/j.algal.2022.102708.
- [37] I. T. K. Ru, Y. Y. Sung, M. Jusoh, M. E. A. Wahid, and T. Nagappan, "*Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts," *Appl. Phycol.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–11, 2020, doi: 10.1080/26388081.2020.1715256.
- [38] D. Couto *et al.*, "Food grade extraction of *Chlorella vulgaris* polar lipids: A comparative lipidomic study," *Food Chem.*, vol. 375, no. July 2021, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131685.
- [39] D. A. Silva *et al.*, "Strategy for the cultivation of *Chlorella vulgaris* with high biomass production and biofuel potential in wastewater from the oil industry," *Environ. Technol. Innov.*, vol. 25, p. 102204, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.eti.2021.102204.
- [40] K. S. Khoo, I. Ahmad, K. W. Chew, K. Iwamoto, A. Bhatnagar, and P. L. Show, "Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review," *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 96, no. September 2022, p. 101071, 2023, doi:

- 10.1016/j.pecs.2023.101071.
- [41] A. M. Murray, I. A. Fotidis, A. Isenschmid, K. R. A. Haxthausen, and I. Angelidaki, “Wirelessly powered submerged-light illuminated photobioreactors for efficient microalgae cultivation,” *Algal Res.*, vol. 25, no. November 2016, pp. 244–251, 2017, doi: 10.1016/j.algal.2017.05.015.
 - [42] N. Rafa, S. F. Ahmed, I. A. Badruddin, M. Mofijur, and S. Kamangar, “Strategies to Produce Cost-Effective Third-Generation Biofuel From Microalgae,” *Front. Energy Res.*, vol. 9, no. September 2021, pp. 1–11, 2021, doi: 10.3389/fenrg.2021.749968.
 - [43] A. Hallmann, “Algae Biotechnology – Green Cell-Factories on the Rise,” *Curr. Biotechnol.*, vol. 4, no. 4, pp. 389–415, 2015, doi: 10.2174/2211550105666151107001338.
 - [44] M. E. Huntley and D. G. Redalje, *CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal*, vol. 12, no. 4. 2007. doi: 10.1007/s11027-006-7304-1.
 - [45] R. R. Narala *et al.*, “Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system,” *Front. Energy Res.*, vol. 4, no. AUG, pp. 1–10, 2016, doi: 10.3389/fenrg.2016.00029.
 - [46] M. Hanifzadeh, M. H. Sarrafzadeh, Z. Nabati, O. Tavakoli, and H. Feyzizarnagh, “The technical, economic and energy assessment of an alternative strategy for mass production of biomass and lipid from microalgae,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 1, pp. 866–873, 2018, doi: 10.1016/j.jece.2018.01.008.
 - [47] M. Al-Hammadi and M. Güngörmüşler, “New insights into *Chlorella vulgaris* applications,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 121, no. 5, pp. 1486–1502, May 2024, doi: 10.1002/bit.28666.
 - [48] Kalpesh K. Sharma, H. Schuhmann, and P. M. Schenk, “High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production,” *Energies*, vol. 5, no. 1532–1553, 2012, doi: doi:10.3390/en5051532.
 - [49] P. Přibyl, V. Cepák, and V. Zachleder, “Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 94, no. 2, pp. 549–561, 2012, doi: 10.1007/s00253-012-3915-5.
 - [50] Z. Xue, Y. Yu, W. Yu, X. Gao, Y. Zhang, and X. Kou, “Development Prospect and Preparation Technology of Edible Oil From Microalgae,” *Front. Mar. Sci.*, vol. 7, no. June, 2020, doi: 10.3389/fmars.2020.00402.
 - [51] X. M. Sun, L. J. Ren, Q. Y. Zhao, X. J. Ji, and H. Huang, “Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1275-9.
 - [52] M. Barbosa, L. G. Inácio, C. Afonso, P. Maranhão, and M. Barbosa, “The microalga *Dunaliella* and its applications : a review The microalga *Dunaliella* and its applications : a review,” *Appl. Phycol.*, vol. 4, no. 1, pp. 99–120, 2023, doi: 10.1080/26388081.2023.2222318.
 - [53] R. Pais *et al.*, “Bioactive Lipids in *Dunaliella salina*: Implications for Functional Foods and Health,” *Foods*, vol. 13, no. 20, pp. 1–18, 2024, doi: 10.3390/foods13203321.
 - [54] S. Pourkarimi, A. Hallajisani, A. Alizadehdakhel, A. Nouralishahi, and A.

- Golzary, “Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 29, 2020.
- [55] A. K. Koyande, P. L. Show, R. Guo, B. Tang, C. Ogino, and J. S. Chang, “Bio-processing of algal bio-refinery: a review on current advances and future perspectives,” *Bioengineered*, vol. 10, no. 1, pp. 574–592, 2019, doi: 10.1080/21655979.2019.1679697.
- [56] M. J. Cooney, G. Young, and R. Pate, “Bio-oil from photosynthetic microalgae: Case study,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 166–177, 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.134.
- [57] S. Shivakumar, N. Serlini, S. M. Esteves, S. Miros, and R. Halim, “Cell Walls of Lipid-Rich Microalgae: A Comprehensive Review on Characterisation, Ultrastructure, and Enzymatic Disruption,” *Fermentation*, vol. 10, no. 12, 2024, doi: 10.3390/fermentation10120608.
- [58] P. Mercer and R. E. Armenta, “Developments in oil extraction from microalgae,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 113, no. 5, pp. 539–547, 2011, doi: 10.1002/ejlt.201000455.
- [59] M. Vinatoru, T. J. Mason, and I. Calinescu, “Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 97. Elsevier B.V., pp. 159–178, Dec. 01, 2017. doi: 10.1016/j.trac.2017.09.002.
- [60] K. Ramluckan, K. G. Moodley, and F. Bux, “An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method,” *Fuel*, vol. 116, pp. 103–108, 2014, doi: 10.1016/j.fuel.2013.07.118.
- [61] M. S. G. Kafyra, S. Papadaki, M. Chronis, and M. Krokida, “Microalgae based innovative animal fat and proteins replacers for application in functional baked products,” *Open Agric.*, vol. 3, no. 1, pp. 427–436, 2018, doi: 10.1515/opag-2018-0047.
- [62] Nguyễn Minh Tuấn *et al.*, “Nghiên cứu nuôi trồng vi tảo *Chlorella vulgaris* làm nguyên liệu sản xuất Biodiesel,” *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, vol. 10, pp. 29–32, 2012.
- [63] T. D. P. Nguyen *et al.*, “Investigation of the relationship between bacteria growth and lipid production cultivating of microalgae *chlorella vulgaris* in seafood wastewater,” *Energies*, vol. 12, no. 12, 2019, doi: 10.3390/en12122282.
- [64] H. A. Pantami *et al.*, “Comprehensive GCMS and LC-MS/MS metabolite profiling of *chlorella vulgaris*,” *Mar. Drugs*, vol. 18, no. 7, 2020, doi: 10.3390/MD18070367.
- [65] Trần Thị Ngọc Thư, Nguyễn Thị Đông Phương, and Nguyễn Phan Trúc Xuyên, “Nghiên cứu sự tạo khối biofloc của vi khuẩn *Escherichia coli* và *Chlorella vulgaris*,” *Khoa học Công nghệ- Đại học Đà Nẵng*, vol. 20, no. 5, pp. 1–5, 2022.
- [66] J. Grandgirard, D. Poinso, L. Krespi, J. P. Nénon, and A. M. Cortesero, “Costs of secondary parasitism in the facultative hyperparasitoid *Pachycrepoideus dubius*: Does host size matter?,” *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 103, no. 3, pp. 239–248, 2002, doi: 10.1023/A.
- [67] A. L. Ido, M. D. G. de Luna, S. C. Capareda, A. L. Maglinao, and H. Nam, “Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasound-assisted solvent extraction,”

- Energy*, vol. 157, pp. 949–956, 2018, doi: 10.1016/j.energy.2018.04.171.
- [68] E. Devadasu and R. Subramanyam, “Enhanced Lipid Production in *Chlamydomonas reinhardtii* Caused by Severe Iron Deficiency,” *Front. Plant Sci.*, vol. 12, no. April, pp. 1–12, 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.615577.
- [69] TCVN, “TCVN 8125: 2015 ngũ cốc và đậu đỗ-Xác định hàm lượng ni tơ và tính hàm lượng protein-Phương pháp Kjeldahl.” 2015.
- [70] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [71] G. L. Miller, “Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar,” *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959, doi: 10.1021/ac60147a030.
- [72] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances,” *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [73] R. J. Ritchie, “Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents,” *Photosynth. Res.*, vol. 89, no. 1, pp. 27–41, Jul. 2006, doi: 10.1007/s11120-006-9065-9.
- [74] V. Hynstova, D. Sterbova, B. Klejdus, J. Hedbavny, D. Huska, and V. Adam, “Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography,” *J. of Pharmaceutical Biomed. Anal.*, 2017.
- [75] F. A. Reyes, J. A. Mendiola, E. Ibañez, and J. M. Del Valle, “Astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO₂-expanded ethanol,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 92, no. December 2019, pp. 75–83, 2014, doi: 10.1016/j.supflu.2014.05.013.
- [76] S. H. Hadiyanto, “Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*,” *Emirates J. Food Agric.*, vol. 28, no. 4, pp. 227–234, 2016, doi: 10.9755/ejfa.2015-05-193.
- [77] I. O. F. Graphite, “KHẢO SÁT KẾT QUẢ GIA CÔNG EDM TRÊN ĐIỆN CỰC ĐỒNG ĐỎ VÀ THAN CHÌ ĐỐI VỚI THÉP P20,” vol. 60, no. 1, pp. 47–51, 2024.
- [78] M. T. Ahmad, M. Shariff, F. Md. Yusoff, Y. M. Goh, and S. Banerjee, “Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture,” *Rev. Aquac.*, vol. 12, no. 1, pp. 328–346, 2020, doi: 10.1111/raq.12320.
- [79] J. Bazarnova, Y. Smyatskaya, A. Shlykova, A. Balabaev, and S. Đurović, “Obtaining Fat-Soluble Pigments—Carotenoids from the Biomass of *Chlorella* Microalgae,” *Appl. Sci.*, vol. 12, no. 7, 2022, doi: 10.3390/app12073246.
- [80] A. I. El Makawy, S. H. Abdel-Aziem, F. M. Ibrahim, H. A. Sharaf, O. M. Abd-Elmoneim, and A. M. Darwish, “Potential modulator role of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* on monosodium glutamate oxidative stress, genotoxicity, apoptotic gene expression and histopathological alterations,” *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 9, no. 11, pp. 161–177, 2016.
- [81] L. M. Andrade, C. J. Andrade, M. Dias, C. A. Nascimento, and M. A. M. Chemical, “*Chlorella* and *spirulina* microalgae as sources of functional foods,

- nutraceuticals, and food supplements; an overview,” *MOJ Food Process Technol.* 2018;6(1)45–58., vol. 6, no. 1, pp. 45–58, 2018.
- [82] S. Yuan *et al.*, “Enrichment of lipids from agar production wastes of *Gracilaria lemaneiformis* by ultrasonication: a green sustainable process,” *Biomass Convers. Biorefinery*, vol. 11, no. 6, pp. 2899–2908, 2021, doi: 10.1007/s13399-020-00674-5.
- [83] J. Wu, M. A. Alam, Y. Pan, D. Huang, Z. Wang, and T. Wang, “Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 71, pp. 323–329, 2017, doi: 10.1016/j.jtice.2016.12.039.
- [84] M. L. Menegazzo, H. B. Ulusoy-Erol, C. N. Hestekin, J. A. Hestekin, and G. G. Fonseca, “Evaluation of the yield, productivity, and composition of fatty acids methyl esters (FAME) obtained from the lipidic fractions extracted from *Chlorella sorokiniana* by using ultrasound and agitation combined with solvents,” *Biofuels*, vol. 13, no. 4, pp. 519–526, 2022, doi: 10.1080/17597269.2020.1779977.
- [85] Wipa Chungjatupornchai and S. Fa-aroonsawat, “Enhanced triacylglycerol production in oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by co-overexpression of lipogenic genes: Plastidial LPAAT1 and ER-located DGAT2,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 131, no. 2, pp. 124–130, 2021.
- [86] Y. Liu, X. Liu, Y. Cui, and W. Yuan, “Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 87, no. February, p. 106054, 2022, doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106054.
- [87] F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier, and M. Abert-Vian, “Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review,” *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 34. Elsevier B.V., pp. 540–560, Jan. 01, 2017. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Hình ảnh các thiết bị sử dụng



**Hình 1. Bể siêu âm
(WUC-D22H, Daihan-
Hàn Quốc, 40kHz, 528W)**



**Hình 2. Máy lắc có gia
nhiệt (cole-Parmer SI600,
Anh)**



**Hình 3. Máy sấy (UN110,
Mettler, Đức)**



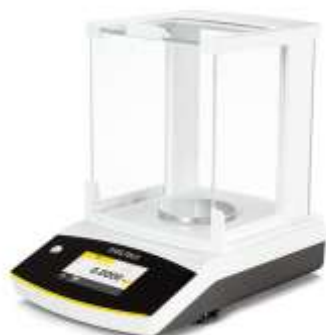
**Hình 4. Máy lắc (SHR-
1D, Witeg-Đức)**



**Hình 5. Máy đo quang
phổ UV-Vis (UVD-2950,
Labomed-Mỹ)**



**Hình 6. Máy ly tâm
(Z206A, Hermle-Đức)**



**Hình 7. Cân phân tích
(Sartorius TE214S, Đức)**



**Hình 8. Máy cất nước 2
lần (Model WSC/4D,
Hamilton- Anh)**



**Hình 9. Nồi hấp autoclave
(SA-300VL Sturdy, Đài
Loan)**

Phụ lục 2. Các phương pháp phân tích các chỉ tiêu

Phương pháp xác định hàm lượng đường khử

- Cho 0.5g mẫu cần chiết vào 10ml ethanol 80. Đem đi siêu âm 15 phút, để trong bể siêu âm 30 phút, tiếp tục siêu âm 15 phút và để trong bể tiếp 30 phút. Lấy ra để nguội, ly tâm, lấy dịch trong định mức lên 10ml.

- Pha loãng mẫu lần 1, hút 1ml dung dịch mẫu đã pha loãng và 4ml nước cất.

- Pha loãng mẫu lần 2, hút 1ml dung dịch mẫu đã pha lần 1 và 2ml nước cất và cho vào 1ml DNS, dùng bông bịt kín ống nghiệm, đặt ống nghiệm vào cốc thủy tinh có nước, đun đến khi nhiệt độ nước trong cốc thủy tinh đạt 90°C, để trong 5 phút sau đó lấy ra để nguội. Đo ở OD 540, dung dịch màu vàng đậm, mẫu blank là 3ml nước cất + 1 ml DNS.

Phương pháp xác định hàm lượng đường tổng

- Cho 1ml mẫu trắng + 0,5ml phenol 5% + 2,5ml H₂SO₄ vào ống nghiệm thủy tinh lắc đều sau đó để 30 phút cho mẫu nguội tiến hành đổ mẫu vào cuvet thủy tinh để đo độ hấp thụ của mẫu trắng.

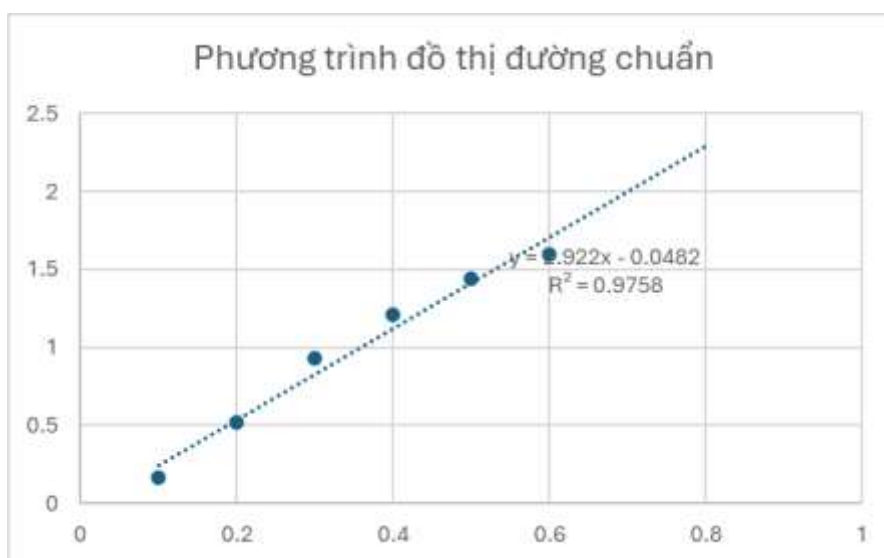
- Cho 0,5g mẫu cần chiết vào 10ml ethanol 80%. Đem đi siêu âm 15 phút, để trong bể siêu âm 30 phút, tiếp tục siêu âm 15 phút và để trong bể tiếp 30 phút. Lấy ra để nguội, ly tâm, lấy dịch trong định mức lên 10ml.

- Hút 0,1 ml dung dịch mẫu, đem sấy khô.

- Pha loãng lần 1, hút 1ml nước cất cho vào ống mẫu đã sấy khô. Pha loãng lần 2, hút 0,5 ml đã pha loãng lần 1 + 0,5 ml nước cất + 0,5ml phenol 5% + 2,5ml H₂SO₄ vào ống nghiệm thủy tinh lắc đều sau đó để 30 phút cho mẫu nguội tiến hành đổ mẫu vào cuvet thủy tinh để đo độ hấp thụ của mẫu dung dịch.

- Điều chỉnh quang phổ về bước sóng 485. Đo mẫu và đọc độ hấp thụ của mẫu.

- *Phương trình đồ thị đường chuẩn:*



Hình 2.3. Hình ảnh phương trình đồ thị đường chuẩn.

Phương pháp xác định polyphenol

Cho 0,5ml mẫu trắng + 2,5ml dung dịch Prolin 10% + 2 ml Na_2CO_3 7,5% vào ống nghiệm thủy tinh lắc đều sau đó để mẫu trong bóng tối 2 giờ tiến hành đổ mẫu vào cuvet thủy tinh đo độ hấp thụ của mẫu trắng.

Tương tự ở mẫu dung dịch cho 0,5ml dung dịch + 2,5ml dung dịch Prolin 10% + 2ml Na_2CO_3 7,5% vào ống nghiệm thủy tinh lắc đều sau đó để mẫu trong bóng tối 2 giờ tiến hành đổ mẫu vào cuvet thủy tinh đo độ hấp thụ của dung dịch.

Điều chỉnh quang phổ về bước sóng 765

Đo mẫu và đọc độ hấp thụ của mẫu

Tiến hành lặp lại với các mẫu khác

Phương pháp xác định hàm lượng protein hòa tan bằng phương pháp Bradford

❖ Nguyên tắc:

Phương pháp này dựa trên sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại của thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue khi tạo phức với protein. Trong dung dịch mang tính acid, khi chưa kết hợp với protein thì thuốc nhuộm có bước sóng hấp thụ cực đại 465nm; khi kết hợp với protein thì thuốc nhuộm hấp thụ cực đại ở bước sóng 595nm. Độ hấp thụ ở bước sóng 595nm có liên hệ một cách trực tiếp tới nồng độ protein.

Để xác định protein trong mẫu, đầu tiên ta xây dựng một đường chuẩn với dung dịch protein chuẩn đã biết trước nồng độ. Dung dịch protein chuẩn là bovine serum albumin (BSA). Sau khi cho dung dịch protein vào dung dịch thuốc nhuộm, màu sẽ xuất hiện sau 2 phút và bền tới 1 giờ. Tiến hành đo dung dịch bằng máy quang phổ kế ta được ODx, độ hấp thụ sẽ tỷ lệ với dung lượng trong mẫu. Thực hiện một đối chứng với dung dịch đệm (ODo). Thực hiện chiết protein hòa tan từ sinh khối tảo khô, để

nguội rồi đem đi ly tâm, lấy dịch trong. Pha loãng mẫu dịch, sau đó cho thuốc thử và dịch đệm theo tỉ lệ 1ml đã pha loãng + 2.2ml dung dịch đệm Buffer lắc đều + 0.8ml dung dịch thuốc thử lắc đều . Đổ vào cuvet thủy tinh và tiến hành đo. Đo mẫu ở OD 595nm .

THUYẾT MINH ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP TRƯỜNG

HỢP ĐỒNG TRIỂN KHAI THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

MỤC LỤC MINH CHỨNG SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI

Họ và tên chủ nhiệm đề tài: **Trần Thị Ngọc Thu**

Mã số đề tài: **T2023-06-01**

STT	Tên minh chứng
SẢN PHẨM KHOA HỌC	
*	Bài báo đăng trên tạp chí có tên trong danh mục ESCI
	Genetic engineering of <i>Haematococcus pluvialis</i> microalgae for the enhancement of astaxanthin production: A review. <i>Biocatalysis and Agricultural Biotechnology</i> , 2024.
☒	Toàn văn bài báo
☒	Danh mục chứng minh tạp chí được xếp hạng: ☐ Web of Science: ☐ SCIE ☒ ESCI ☐ Scopus thứ hạng: ☒ Q1 ☐ Q2 ☐ Q3 ☐ Q4
SẢN PHẨM ỨNG DỤNG	
*	Mô hình nuôi vi tảo <i>Chlorella vulgaris</i> trong các bình phản ứng dung tích 1,5 lít
	☐ Trang đầu ☒ Hình ảnh giao diện của sản phẩm - Hình 1 : Ảnh mặt trước của mô hình - Hình 2 : Ảnh mặt sau của mô hình - Hình 3 : Ảnh mặt bên trái của mô hình - Hình 4 : Ảnh mặt bên phải của mô hình - Hình 5 : Ảnh mặt trên của mô hình - Hình 6 : Ảnh chụp các chi tiết bên trong mô hình
	☒ Video cách hoạt động, vận hành : hình cắt từ video - Hình 7 : Pha môi trường BBM - Hình 8 : Cây tảo giống vào bình nuôi cấy - Hình 9 : Bình tảo mới nuôi Hình 10 : Hệ thống nuôi tảo đã hoạt động 10 ngày

1. Minh chứng tạp chí BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY thuộc danh mục ESCI

The screenshot shows the search results page on the mjl.clarivate.com website. The browser address bar displays 'mjl.clarivate.com/search-results'. On the left, a sidebar lists various citation indices: Science Citation Index Expanded (SCIE), Social Sciences Citation Index (SSCI), Arts & Humanities Citation Index (AHCI), and Emerging Sources Citation Index (ESCI). The 'Active Filters' section at the top right shows four selected filters: SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED (SCIE), SOCIAL SCIENCES CITATION INDEX (SSCI), ARTS & HUMANITIES CITATION INDEX (AHCI), and EMERGING SOURCES CITATION INDEX (ESCI). The 'Search Results' section indicates 'Found 1,022 results (Page 1)' and includes a 'Share These Results' link. Below this, the 'Exact Match Found' section highlights the journal 'BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY'. The journal details listed are: Publisher: ELSEVIER, RADARWEG 29, AMSTERDAM, Netherlands, 1043 NX; ISSN / eISSN: 1878-8181; Web of Science Core Collection: Emerging Sources Citation Index; and Additional Web of Science Indexes: Biological Abstracts | BIOSIS Previews. At the bottom right of the journal details, there are links to 'Share This Journal' and 'View profile page'.

nd a Match

Clear All

Science Citation Index Expanded (SCIE)

Social Sciences Citation Index (SSCI)

Arts & Humanities Citation Index (AHCI)

Emerging Sources Citation Index

Active Filters

SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED (SCIE) ×

SOCIAL SCIENCES CITATION INDEX (SSCI) ×

ARTS & HUMANITIES CITATION INDEX (AHCI) ×

EMERGING SOURCES CITATION INDEX (ESCI) ×

Search Results

Found 1,022 results (Page 1) [Share These Results](#)

Exact Match Found

BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

Publisher: ELSEVIER, RADARWEG 29, AMSTERDAM, Netherlands, 1043 NX

ISSN / eISSN: 1878-8181

Web of Science Core Collection: Emerging Sources Citation Index

Additional Web of Science Indexes: Biological Abstracts | BIOSIS Previews

[Share This Journal](#) [View profile page](#)

https://mjl.clarivate.com://search-results?issn=1878-8181&hide_exact_match_fl=true&utm_source=mjl&utm_medium=share-by-link&utm_campaign=search-results-share-this-journal

2. Minh chứng tạp chí BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY thuộc Q1



<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100197945&tip=sid&clean=0>

**MÔ HÌNH NUÔI VI TẢO *CHLORELLA VULGARIS* TRONG
CÁC BÌNH PHẢN ỨNG DUNG TÍCH 1,5 LÍT**

I. Hình ảnh giao diện của mô hình nuôi vi tảo *Chlorella vulgaris* trong các bình phản ứng dung tích 1,5 lít



Hình 1. Ảnh mặt trước của mô hình



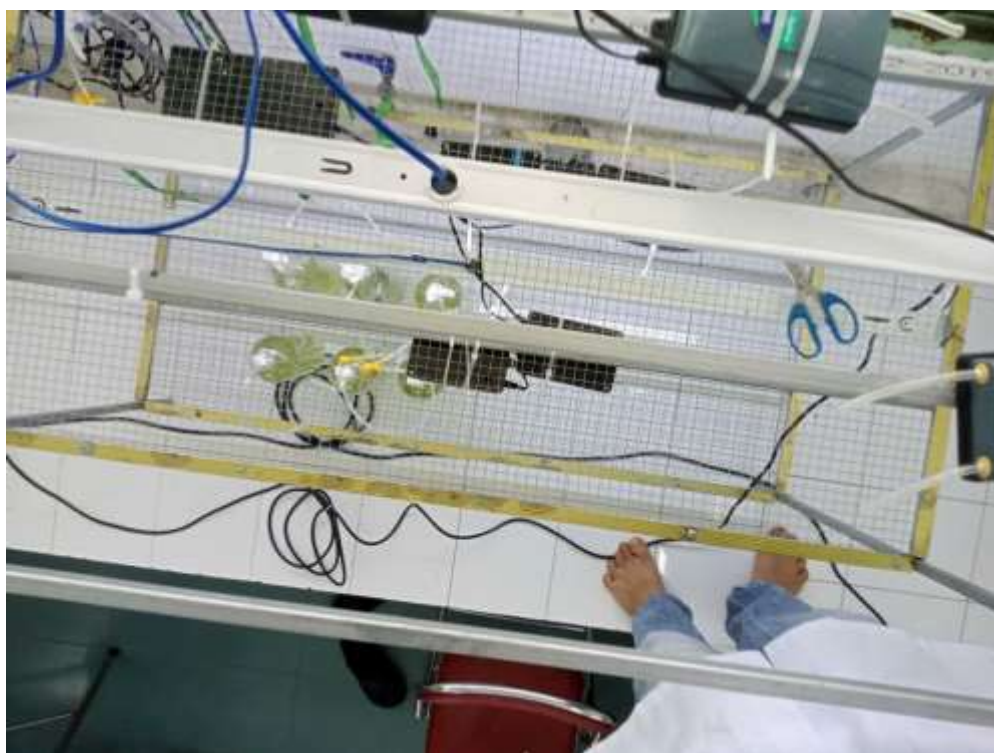
Hình 2. Ảnh mặt sau của mô hình



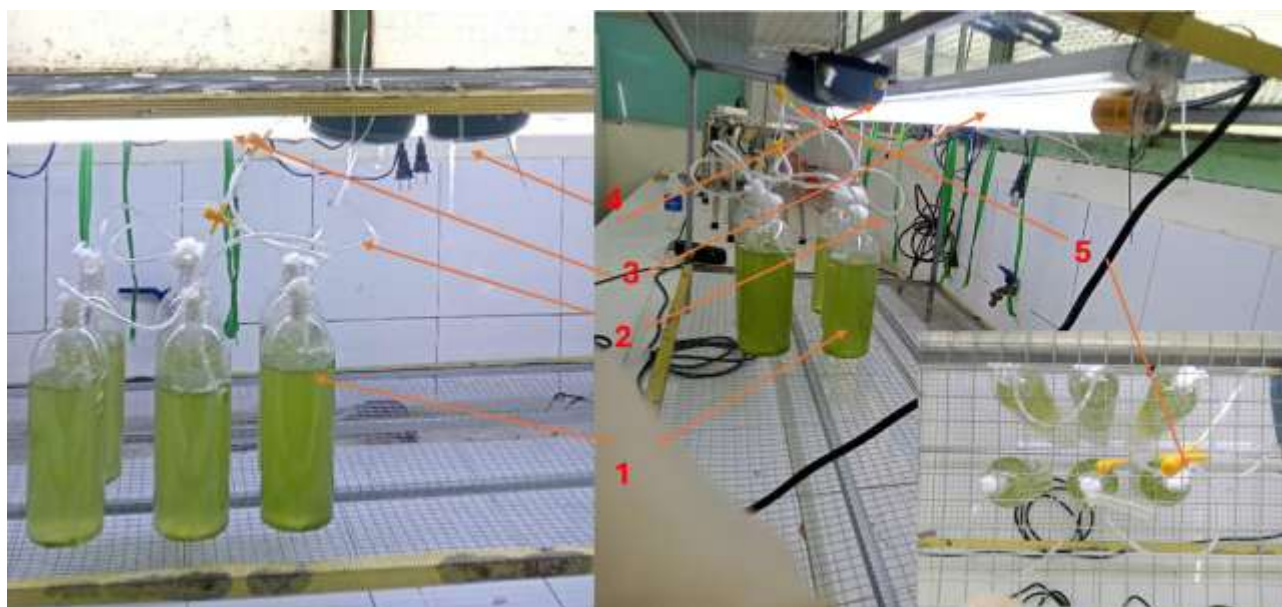
Hình 3. Ảnh mặt bên trái của mô hình



Hình 4. Ảnh mặt phải của mô hình



Hình 5. Ảnh mặt trên của mô hình



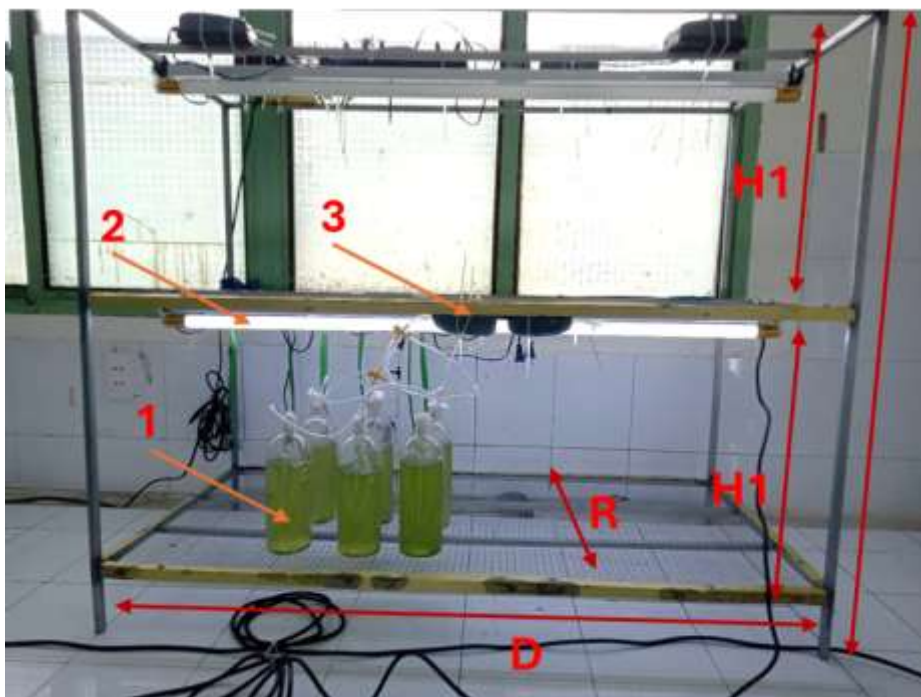
Hình 6. Ảnh chụp các chi tiết bên trong mô hình

Ghi chú: (1): bình nuôi cấy, (2): Đèn huỳnh quang, (3) Máy sục khí, (4) Dây sục, (5) Van điều chỉnh khí

II. Video cách hoạt động, vận hành

Mô tả cấu tạo của mô hình theo hình 6:

- + Dàn nuôi cấy làm bằng thép hộp vuông 14 dày 1.2 mm, Lưới cũng bằng thép, kích thước lỗ khoảng vuông 20x20, mạ kẽm.
- + Bình nuôi cấy (1) tảo 1,5 lít đặt trên các tầng
- + Mô hình nuôi cấy có 2 tầng, mỗi tầng có lắp đèn chiếu sáng (2) và máy sục khí (3)
- + Kích thước gồm: D: 120cm, H: 100 cm, H1: 45 cm, R: 60 cm



Hình 6. Mô hình nuôi cấy tảo

Hoạt động

Sau khi chuẩn bị môi trường là dung dịch nuôi cấy BBM (đã được hấp tiệt trùng), cho chủng *Chlorella vulgaris* vào các bình nuôi cấy, sau đó gắn dây sục khí, đậy bằng nút bông không thấm nước. Bật máy sục khí và đèn để đảm bảo ánh sáng và sự khuấy đảo trong suốt thời gian nuôi cấy.

Một số hình ảnh cắt từ video



Hình 7 : Pha môi trường BBM



Hình 8 : Cấy tảo giống vào bình nuôi cấy



Hình 9 : Bình tảo mới nuôi



Hình 10 : Hệ thống nuôi tảo đã hoạt động 10 ngày

