

ẢNH HƯỞNG CỦA CHITOSAN ĐẾN HIỆU SUẤT THU HỒI SINH KHỐI VÀ KHẢ NĂNG BẢO VỆ CHẤT MÀU VI TẢO *NANNOCHLOROPSIS* SP. TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN

EFFECTS OF CHITOSAN ON BIOMASS RECOVERY EFFICIENCY AND COLOR PIGMENT PROTECTION ABILITY OF *NANNOCHLOROPSIS* SP. DURING STORAGE

Phạm Thị Đan Phượng¹, Hà Kiều Oanh¹, Trần Vĩ Hích²

1. Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

2. Viện Nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Phạm Thị Đan Phượng, Email: danphuong@ntu.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/04/2025; Ngày phản biện thông qua: 14/05/2025; Ngày duyệt đăng: 20/05/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả của phương pháp keo tụ sinh học sử dụng chitosan trong việc thu hồi sinh khối *Nannochloropsis* sp. và hiệu quả bảo quản sắc tố trong sinh khối vi tảo sau thu hoạch. Quá trình thu hồi sinh khối được thực hiện bằng chitosan (khối lượng phân tử ~520 kDa, nồng độ 60 ppm) và lọc qua vải lọc. Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi sinh khối đạt khoảng 88%, với hiệu suất thu hồi chlorophyll-a và carotenoid lần lượt là khoảng 95% và 89%. Sinh khối vi tảo đậm đặc sau đó được bổ sung 0,1% vitamin C và bảo quản ở 4±2°C. Sau 10 tuần bảo quản, tỷ lệ tổn thất carotenoid và chlorophyll-a lần lượt là khoảng 7% và 5%. Các kết quả này cho thấy tiềm năng của phương pháp thu hoạch và bảo quản được đề xuất trong việc duy trì chất lượng sinh khối *Nannochloropsis* sp. giàu sắc tố.

Từ khóa: Chitosan, *Nannochloropsis* sp., hiệu suất thu hồi sinh khối, chlorophyll-a, carotenoid.

ABSTRACT

This study evaluates the effectiveness of chitosan-based bioflocculation for harvesting *Nannochloropsis* sp. biomass and the efficiency of pigment preservation in the microalgal biomass during storage. The microalgal biomass harvesting process was carried out using chitosan (molecular weight ~520 kDa, concentration 60 ppm) followed by cloth filtration. The results showed a biomass recovery efficiency of approximately 88%, while the recovery efficiencies of chlorophyll-a and carotenoids were approximately 95% and 89%, respectively. The concentrated microalgal biomass was supplemented with 0.1% vitamin C and stored at 4±2°C. After 10 weeks of storage, the loss rates of carotenoids and chlorophyll-a were approximately 7% and 5%, respectively. These results indicate the potential of the proposed harvesting and preservation method for maintaining the quality of pigment-rich *Nannochloropsis* sp. biomass.

Keywords: Chitosan, *Nannochloropsis* sp., biomass recovery efficiency, chlorophyll-a, carotenoid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sinh khối vi tảo được đánh giá là nguồn thực phẩm tiềm năng cho người và động vật nuôi nhờ có giá trị dinh dưỡng cao, tốc độ tăng sinh khối lớn, khả năng sống được trong nhiều điều kiện môi trường. Sinh khối vi tảo đặc biệt có ý nghĩa trong ngành nuôi trồng thủy sản, do cần thức ăn sống có giá trị dinh dưỡng cao. *Nannochloropsis* sp. là một trong những loài vi tảo biển có nguồn dinh dưỡng cao với đầy đủ các thành phần protein, carbohydrate, lipid, acid amin, acid béo không bão hòa, khoáng chất, chất chống oxy hóa và

giàu sắc tố. Vi tảo *Nannochloropsis* sp. phân bố rộng rãi, có vai trò quan trọng trong việc tái tạo hệ sinh thái giảm thiểu ô nhiễm môi trường và được sử dụng làm thức ăn chính cho thủy sản như ấu trùng cá, giáp xác, động vật hai mảnh vỏ, thân mềm,... (Phượng, 2023; Trung và cộng sự, 2023). Tuy nhiên, việc thu hồi vi tảo ở quy mô lớn hiện đang gặp nhiều thách thức về công nghệ, thiết bị và chi phí. Các phương pháp phổ biến hiện đang được áp dụng để thu hoạch vi tảo gồm ly tâm, siêu lọc, tuyển nổi, keo tụ..., mỗi phương pháp có ưu và nhược điểm riêng. Trong đó, phương pháp

keo tụ thể hiện tính vượt trội trong thu hoạch sinh khối vi tảo ở quy mô lớn, giữ được tế bào vi tảo sống có thể tái nuôi cấy, tính khả thi cao về mặt công nghệ và chi phí đầu tư thấp. Gần đây, các nhà khoa học đã nghiên cứu thu hoạch vi tảo bằng polyme sinh học như chitosan nhằm đảm bảo an toàn cho động vật nuôi. Tuy nhiên, hầu hết phương pháp kết tụ vi tảo bằng chitosan được ứng dụng nhiều đối với các loài vi tảo nước ngọt và nước lợ. Hiệu quả thu hoạch vi tảo biển bằng chitosan thấp do bị ảnh hưởng bởi cường độ ion quá cao và độ pH của môi trường. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả thu hoạch vi tảo bằng polyme sinh học như chủng vi tảo, kích thước tế bào, mật độ và thành phần của tế bào, loại polyme (trọng lượng phân tử, mật độ điện tích trên phân tử) và hàm lượng chất keo tụ, thành phần môi trường nuôi cấy (Yang và cộng sự, 2016; Pugazhendhi và cộng sự, 2019; Phụng, 2023).

Kết quả các nghiên cứu ứng dụng chitosan để thu hoạch vi tảo biển *Nannochloropsis* sp. (kích thước 2-4 μm) có sự khác nhau và được giải thích bởi nhiều cơ chế kết bông vi tảo, bao gồm trung hoà điện tích, quét, bắc cầu, vá và trọng lực (Trung và cộng sự, 2023; Phụng, 2023). Các tương tác giữa chitosan và vi tảo liên quan đến liên kết cộng hoá trị, tương tác tĩnh điện, liên kết hydro, lực van der Waals và các lực đặc hiệu cao khác dẫn đến các cơ chế keo tụ khác nhau (Yang và cộng sự, 2016; Trung và cộng sự, 2023). Trong môi trường dung dịch vi tảo *Nannochloropsis* sp. tích điện âm bắt gặp chitosan là một polyme tích điện dương làm trung hoà điện tích bề mặt trên tế bào, ngoài ra chitosan còn có thể liên kết các hạt lại với nhau bằng các liên kết bắc cầu thông qua lực hấp dẫn vật lý/hóa học. Tuy nhiên, trong môi trường dịch vi tảo biển có độ mặn cao, chitosan có xu hướng gấp chặt lại và không thể liên kết với các tế bào vi tảo gây ức chế quá trình kết bông (Pugazhendhi và cộng sự, 2019). Vấn đề này cần được nghiên cứu kỹ hơn về tính chất của chitosan ảnh hưởng đến quá trình keo tụ của bông vi tảo biển có kích thước siêu nhỏ ($< 5 \mu\text{m}$) và môi trường

nước biển có pH kiềm trong khoảng 7,5 – 8,5. Trọng lượng phân tử, độ deacetyl, độ nhớt là những tính chất quan trọng quyết định việc ứng dụng của chitosan trong các lĩnh vực công nghệ sản xuất khác nhau (y dược, thực phẩm, nông nghiệp và môi trường). Chitosan có độ deacetyl cao ($\text{DD} > 90\%$) càng có nhiều nhóm NH_3^+ tích điện dương và vi tảo *Nannochloropsis* sp. có điện tích âm, do đó sẽ tăng cường cả hiệu ứng trung hoà điện tích và liên kết bắc cầu nhờ lực đẩy tĩnh điện trong phân tử (Yang và cộng sự, 2016). Chitosan có trọng lượng phân tử cao với mật độ điện tích cao phù hợp ứng dụng thu hoạch vi tảo siêu nhỏ (Pugazhendhi và cộng sự, 2019; Trung và cộng sự, 2023). Như vậy, khả năng tương tác tĩnh điện của chitosan với các tế bào vi tảo thông qua cơ chế trung hoà điện tích và cơ chế bắc cầu (chitosan mạch dài, Mw cao) hoặc cơ chế vá (chitosan mạch ngắn, Mw thấp) (Phụng, 2023).

Dịch vi tảo cô đặc sau thu hoạch bằng polyme sinh học (chitosan) được xem là thức ăn sống tiềm năng và hiệu quả trong nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là dễ vận chuyển và bảo quản (Phụng, 2023). Kết quả công bố bởi Trung và cộng sự (2023) cho thấy phương pháp thu hoạch bằng muối chitosan có kết hợp điều chỉnh pH môi trường kiềm mang lại hiệu quả cao về hiệu suất thu sinh khối hơn là chỉ sử dụng muối chitosan, nhưng có ảnh hưởng đến hiệu suất thu các chất màu. Điều này được giải thích do sự tác động của độ pH đến quá trình keo tụ, ảnh hưởng đến thành tế bào vi tảo, gây vỡ tế bào (Pugazhendhi và cộng sự, 2019). Trong khi các chất màu ở dạng tự do rất dễ bị hư hỏng, nhưng chưa có nghiên cứu nào quan tâm ảnh hưởng của phương pháp thu đến quá trình bảo quản các chất màu của dịch vi tảo sống.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định loại chitosan với trọng lượng phân tử phù hợp để thu hồi sinh khối đậm đặc của vi tảo *Nannochloropsis* sp., đồng thời đánh giá khả năng bảo vệ các chất màu trong sinh khối theo thời gian bảo quản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Dịch sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. (Hình 1) được nuôi cấy tại Trung tâm Nghiên cứu Giống và Dịch bệnh thủy sản (Trường Đại học Nha Trang) có kích thước $2 \div 4 \mu\text{m}$, độ mặn của dịch sinh khối vi tảo $30 \div 40\text{‰}$, pH môi trường $7,8 \div 8,4$. Tại thời điểm tiến hành nghiên cứu, dịch sinh khối vi tảo đạt mật độ tế bào trong khoảng $(36 \div 40) \times 10^6 \text{ tb/mL}$, sinh khối đạt trong khoảng $0,13 \div 0,15 \text{ g/L}$ (tính trên hàm lượng chất khô), điện thế zeta trong khoảng $5,9 \div 6,2 \text{ mV}$ và cố định thời gian lấy mẫu lúc 15 giờ hàng ngày.

2.1.2. Chitosan

Chitosan dạng vảy, màu trắng được sản xuất theo quy trình của Phuong và cộng sự (2022) từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng, sau đó nghiền đến kích cỡ hạt 35 mesh (Chitosan 1, Mw_{520}) đạt độ deacetyl trong khoảng $89 \div 91\%$, độ ẩm $\leq 10\%$, hàm lượng khoáng và protein còn lại $\leq 1\%$. Chitosan 1 là nguyên liệu để sản xuất chitosan 2 (cắt mạch 1 lần, Mw_{220}) và chitosan 3 (cắt mạch 2 lần, Mw_{60}) theo phương pháp của Minh và cộng sự (2017): nghiền chitosan (80 mesh) được xử lý trương nở với NaOH 0,2%, ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ và cắt mạch với H_2O_2 0,3% ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ để thu nhận chitosan có khối lượng phân tử thấp. Tính chất của các chitosan 1, 2 và 3 thể hiện trong Bảng 1.

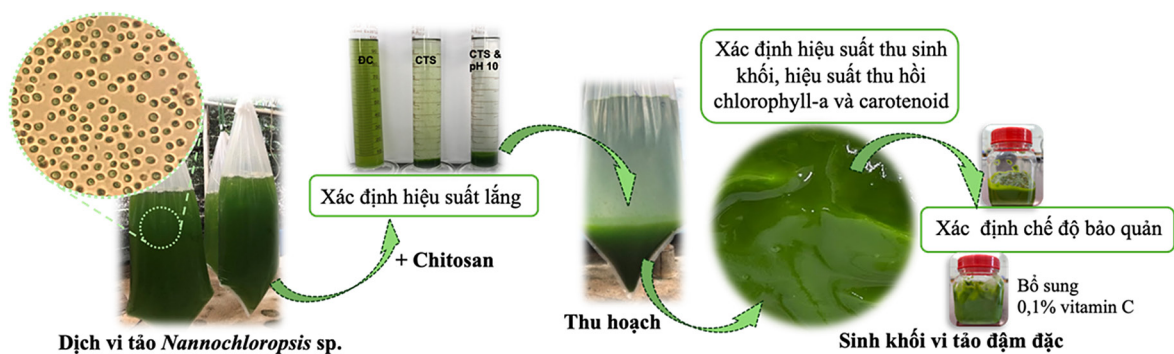
Bảng 1. Tính chất cơ bản của chitosan

Thông số	Chitosan 1 (C1)	Chitosan 2 (C2)	Chitosan 3 (C3)
Mw (kDa)	$520,3 \pm 36,6$	$220,5 \pm 20,7$	$60,8 \pm 5,2$
Điện thế Zeta (mV)	$86,7 \pm 1,7$	$50,3 \pm 0,6$	$38,2 \pm 0,5$
Độ tan 1% chitosan hòa tan trong acid acetic 1%	$99,0\% \pm 1,2$	$99,0 \pm 0,9$	$99,7 \pm 0,3$
Độ nhớt (cPs)	335 ± 24	$76,4 \pm 22$	$8,6 \pm 1,2$
pH của dung dịch 1% chitosan	$3,0 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$

2.1.3 Hoá chất

Acid acetic, NaOH 1,0 M, vitamin C tinh khiết (LA, Merck), nước khử ion (DI) được cung cấp từ phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu



Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát.

Sơ đồ thí nghiệm tổng quát thu sinh khối vi tảo đậm đặc được trình bày ở Hình 1. Mẫu dịch vi tảo *Nannochloropsis* sp. được thu từ các túi nuôi sinh khối thể tích 50 lít (50 cm × 140 cm) tại Trung tâm Nghiên cứu Giống và Dịch bệnh thủy sản, Trường Đại học Nha Trang. Các thí nghiệm xác định hiệu suất lắng được tiến hành tại Trung tâm Thí nghiệm và Thực hành, Trường Đại học Nha Trang. Sau khi chọn loại chitosan với nồng độ sử dụng phù hợp, các bông keo tụ vi tảo được lọc qua lớp vải mỏng để thu sinh khối vi tảo đậm đặc. Các mẫu vi tảo thu nhận được cho vào các hũ nhựa kín, bọc bằng giấy nhôm để bảo quản ở các chế độ nhiệt độ khác nhau.

2.2.1. Xác định ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến hiệu suất lắng của vi tảo *Nannochloropsis* sp. theo thời gian

Vi tảo *Nannochloropsis* sp. được cho vào cốc thủy tinh, bổ sung chitosan 1 ở các nồng độ (ppm) khác nhau từ 0, 20, 40, 60, 80, 100 vào dịch vi tảo. Hỗn hợp vi tảo và chitosan được khuấy đều bằng thiết bị Jarrest SW6 Stuart với tốc độ khuấy là 50 rpm trong vòng 15 phút. Sau đó chuyển dịch vi tảo sang ống đong và quan sát hiện tượng lắng của sinh khối, tiến hành lấy mẫu ở các thời điểm (15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 phút) để xác định hiệu suất lắng và đo pH môi trường dịch vi tảo.

2.2.2. Xác định ảnh hưởng của loại chitosan có trọng lượng phân tử khác nhau đến hiệu suất lắng và khả năng sinh trưởng của sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. sau thu hoạch

Sau khi chọn nồng độ chitosan thích hợp, tiến hành thử nghiệm 3 loại chitosan có trọng lượng phân tử khác nhau gồm chitosan 1 (C1, Mw_{520}), chitosan 2 (C2, Mw_{220}) và chitosan 3 (C3, Mw_{60}). Tiến hành xác định hiệu suất lắng vi tảo và thử nghiệm nuôi cấy để đánh giá khả năng sinh trưởng trở lại của tế bào vi tảo sau thu hoạch.

2.2.3. Xác định ảnh hưởng của phương pháp thu nhận bằng chitosan đến hiệu suất lắng và hiệu suất thu hồi carotenoid và chlorophyll-a của vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Tiến hành thử nghiệm so sánh ảnh hưởng của phương pháp thu bằng chitosan kết hợp điều chỉnh pH 10 (Trung và cộng sự, 2023) đến hiệu

quả thu sinh khối và hiệu quả bảo vệ chất màu trong vi tảo. Sau đó tiến hành bảo quản sinh khối thu được ở các nhiệt độ $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, $4 \pm 2^\circ\text{C}$ và nhiệt độ phòng ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) trong 12 tuần, xác định tỷ lệ tồn thất hàm lượng chất màu carotenoid và chlorophyll-a.

2.3. Các phương pháp phân tích

- Hàm lượng ẩm được xác định theo phương pháp AOAC.

- Trọng lượng phân tử (M_w) của chitosan được xác định thông qua độ nhớt nội bằng nhớt kế Ubbelohde 523 10/13 (đường kính 0,2 mm) ở 25°C , AVS 470, Germany, công thức tính theo Mark-Houwink (Zhang và Neau, 2001). Độ nhớt biểu kiến của chitosan bằng nhớt kế Brookfield (AMETEK BROOKFIELD, USA) ở 25°C sau khi hoà tan chitosan hoàn toàn trong acid acetic 1% với nồng độ 1g/100mL. Điện thế Zeta của chitosan và vi tảo *Nannochloropsis* sp. được xác định trên thiết bị Nano Particle Analyser SZ-100 (HORIBA Scientific).

- Xác định khả năng sinh trưởng của vi tảo bằng cách lấy 0,5 g sinh khối vi tảo đậm đặc sau thu hoạch cho vào 500 mL môi trường nuôi cấy F2 (Guillard, 1975) và nước biển (tỷ lệ 1/1000) có độ mặn 30 - 40‰ (đã được hấp tiệt trùng), vortex nhẹ 1 phút và sục khí liên tục trong quá trình nuôi. Điều kiện nuôi cấy: duy trì nhiệt độ ở 20 – 25°C , cường độ ánh sáng khoảng 1000 – 3000 lux, pH 7,8 – 8,4. Tiến hành lấy mẫu tế bào vi tảo ở cùng thời điểm và xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm bằng buồng đếm tế bào máu Neubauer's improved, China.

- Hiệu suất thu sinh khối (M) xác định theo công thức (1.1). Trong đó, m_1 và m_2 (g) là khối lượng dịch vi tảo ban đầu và dịch sinh khối ở dạng sệt sau khi loại nước.

$$M (\%) = \frac{m_2 * 100}{m_1} \quad (1.1)$$

- Hàm lượng chlorophyll-a và carotenoid được xác định bằng phương pháp của Sumanta và cộng sự (2014). Hiệu suất thu hồi các chất màu (chlorophyll-a: RE_{Ch-a} , carotenoid tổng số: RE_{Ca}) theo công thức (1.2) và (1.3). Trong đó, Ch_T , C_T (g) là hàm lượng chlorophyll-a, carotenoid trong mẫu vi tảo ban đầu; Ch_S , C_S là

hàm lượng chlorophyll-a, carotenoid trong mẫu sinh khối vi tảo sau khi thu hoạch.

$$RE_{Ch-a} (\%) = \frac{Ch_S * 100}{Ch_T} \quad (1.2)$$

$$RE_{Ca} (\%) = \frac{C_S * 100}{C_T} \quad (1.3)$$

Hiệu suất lắng (FE: Flocculation efficiency) được xác định bằng cách đo mật độ quang học của vi tảo trước và sau khi tiến hành keo tụ bông trong môi trường dung dịch nuôi tại được lấy mẫu vị trí có khoảng cách 2/3 chiều cao ống đong 100 mL. Mật độ quang học (OD) được đo trên máy quang phổ UV-VIS (DR6000, HACH) ở bước sóng 490 nm. Công thức tính hiệu suất lắng (1.4) bằng phương pháp đo mật độ quang học (Trung và cộng sự, 2023). Trong đó, OD_T : mật độ quang học của dung dịch tảo trước khi keo tụ, OD_S : mật độ quang học của dung dịch sau khi keo tụ.

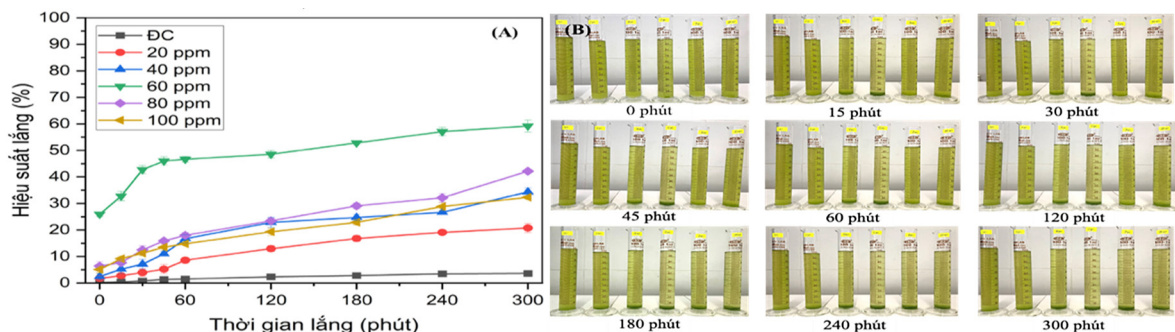
$$FE (\%) = \frac{OD_T - OD_S}{OD_T} \times 100 \quad (1.4)$$

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu báo cáo là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại với 3 lần phân tích, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel 2019, xử lý thống kê bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 26 và vẽ đồ thị bằng phần mềm Origin.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến hiệu suất lắng của vi tảo *Nannochloropsis* sp. theo thời gian



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan và thời gian lắng đến hiệu suất lắng sinh khối vi tảo (A) và hình ảnh quan sát vi tảo kết lắng thứ tự các mẫu từ trái sang phải là mẫu đối chứng (ĐC) và các nồng độ chitosan tăng dần từ 20 ppm đến 100 ppm (B).

Kết quả ở Hình 2 và Bảng 2 cho thấy khi sử dụng chitosan từ mẫu đối chứng với nồng độ 0 ppm và tăng dần đến 100 ppm có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất lắng vi tảo. Hiệu suất lắng ở nồng độ chitosan 60 ppm có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các mẫu vi tảo được kết bông và lắng ở các nồng độ thấp hơn là 20 – 40 ppm và nồng độ cao hơn là 80 – 100 ppm. Kết quả này có xu hướng tương tự với nghiên cứu của Trung và cộng sự (2023) khi sử dụng chitosan lactate để thu hồi vi tảo *Nannochloropsis* sp. Hiệu suất lắng vi tảo tăng khi tăng nồng độ chitosan, hiệu suất lắng đạt cực đại khi lượng chitosan đủ để phản ứng tĩnh điện và tạo cầu nối kết bông vi tảo vào mạch chitosan. Tuy nhiên, khi lượng chitosan lớn hơn mức cần thiết sẽ làm cho mạch chitosan không gắn kết được với tế bào tạo nên lực đẩy điện tích bề mặt các hạt vi tảo được hấp thụ chitosan (Blockx và cộng sự, 2018; Trung và cộng sự, 2023). Việc sử dụng chitosan lactate (105 cPs) ở nồng độ phù hợp (300 ppm) mang lại hiệu suất lắng cao, chỉ sau 15 phút để lắng trong môi trường pH tự nhiên đã đạt được hiệu suất lắng $> 70\%$ và đạt 58,8% ở nồng độ chitosan lactate 250 ppm (Trung và cộng sự, 2023), trong khi hiệu suất lắng vi tảo ở nghiên cứu này chỉ đạt khoảng 33% (60 ppm, 335 cPs). Điều này có thể do chitosan lactate có cấu trúc phân bố các nhóm chức khác với chitosan ảnh hưởng đến hiệu suất kết bông (Yang và cộng sự, 2016) và được hoà tan trực tiếp trong nước và có độ pH 4,7 (Trung và cộng sự, 2023), giảm khả năng tác động đến tế bào vi tảo (Pugazhendhi và cộng sự, 2019).

Quá trình keo tụ vi tảo bằng chitosan được hình thành bởi cơ chế trung hoà điện tích giữa tế bào vi tảo có điện thế Zeta trong khoảng -6 mV và chitosan 1 có điện thế Zeta khoảng $+87$ mV. Tuy nhiên, do vi tảo được nuôi trong điều kiện nước mặn ($30 \div 40\text{‰}$), hầu hết điện tích dương của các phân tử chitosan bị che chắn bởi cường độ ion cao trong môi trường. Điều kiện này làm giảm quá trình hình thành cầu nối liên kết giữa tế bào vi tảo và phân tử chitosan (Pugazhendhi và cộng sự, 2019). Tuy nhiên, phản ứng keo tụ của chitosan vẫn xảy ra ở môi trường pH cao của nước biển nhờ phân tử chitosan có xu hướng cuộn lại và hình thành mạng lưới để bẫy các tế bào vi tảo thành một khối bông lớn bởi hai cơ chế tạo cầu nối và cơ chế quét (Blockx và cộng sự, 2018). Bản chất

chitosan có điểm đẳng điện pK_i 6,5 nên khi cho chitosan vào dung dịch vi tảo có môi trường pH khoảng 7,5 – 8,5 làm chitosan không tích điện, kết quả làm giảm khả năng keo tụ vi tảo. Khi lượng chitosan cho vào ở nồng độ càng cao (0 – 100 ppm) thì pH môi trường càng hạ xuống (Bảng 2) từ pH tự nhiên 8,0 xuống 6,8, do dung dịch chitosan 1 (1% chitosan trong acid acetic 1%) có pH khoảng 3,5. Kết quả này ảnh hưởng đến quá trình keo tụ vi tảo. Khi thời gian lắng kéo dài, pH môi trường vi tảo có xu hướng tăng độ kiềm, điều này có thể do quá trình kết bông được hình thành nhờ sự trung hoà của tế bào vi tảo tích điện âm và chitosan tích điện dương (Pugazhendhi và cộng sự, 2019). Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ chitosan 60 ppm là phù hợp để thu nhận dịch vi tảo.

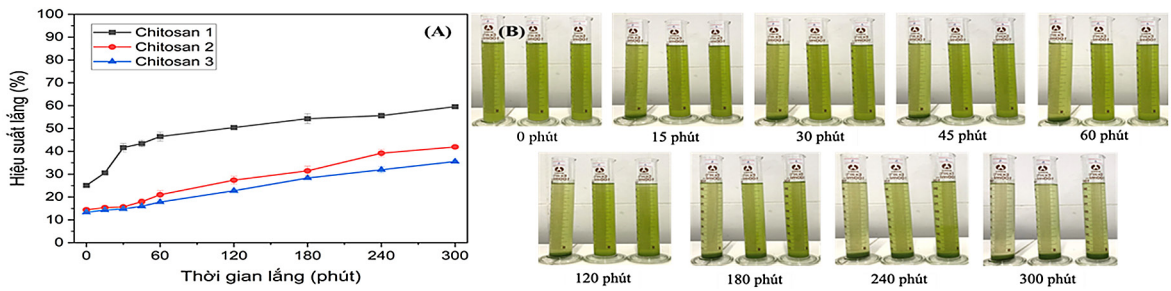
Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến pH môi trường dung dịch vi tảo tại các thời gian lắng khác nhau

Thời gian lắng	Giá trị pH ở các nồng độ chitosan khác nhau				
	20 ppm	40 ppm	60 ppm	80 ppm	100 ppm
0 phút	$7,77 \pm 0,19$	$7,50 \pm 0,20$	$7,22 \pm 0,18$	$7,00 \pm 0,22$	$6,80 \pm 0,23$
60 phút	$7,93 \pm 0,18$	$7,63 \pm 0,19$	$7,44 \pm 0,19$	$7,35 \pm 0,21$	$6,98 \pm 0,22$
120 phút	$8,10 \pm 0,21$	$7,77 \pm 0,21$	$7,64 \pm 0,23$	$7,49 \pm 0,24$	$7,10 \pm 0,24$
180 phút	$8,19 \pm 0,23$	$7,88 \pm 0,20$	$7,80 \pm 0,21$	$7,62 \pm 0,23$	$7,37 \pm 0,25$
240 phút	$8,22 \pm 0,21$	$8,04 \pm 0,23$	$7,94 \pm 0,24$	$7,79 \pm 0,24$	$7,42 \pm 0,23$
300 phút	$8,23 \pm 0,22$	$8,16 \pm 0,21$	$8,06 \pm 0,24$	$7,98 \pm 0,23$	$7,54 \pm 0,24$

3.2. Ảnh hưởng của trọng lượng phân tử chitosan đến hiệu suất lắng và khả năng sinh trưởng trở lại của sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. sau thu hoạch

Đặc tính quan trọng của chitosan gồm trọng lượng phân tử (Mw), độ deacetyl (DD) và độ nhớt, có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả kết lắng và hoạt tính sinh học của sinh khối vi tảo. Ngoài ra kích thước và mật độ vi tảo, nhiệt độ, pH, tốc độ khuấy và cường độ ion môi trường dịch tảo cũng ảnh hưởng đến quá trình keo tụ bông vi tảo (Yang và cộng sự, 2016; Pugazhendhi và cộng sự, 2019; Trung và cộng sự, 2023). Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chitosan 1 (C1, Mw₅₂₀), chitosan 2 (C2, Mw₂₂₀), chitosan 3 (C3, Mw₆₀) ở cùng nồng độ là 60 ppm đến hiệu suất lắng vi tảo *Nannochloropsis* sp. được biểu diễn ở Hình 3.

Kết quả cho thấy việc sử dụng chitosan có trọng lượng phân tử càng cao thì khả năng kết bông vi tảo càng cao và tốc độ lắng càng nhanh ($p < 0,05$). Trọng lượng phân tử là yếu tố quan trọng quyết định quá trình keo tụ hơn là độ deacetyl. Cấu trúc của chitosan có khối lượng phân cao khi ở trạng thái dung dịch được mở rộng, quá trình kết bông vi tảo của chitosan do liên kết bắc cầu và quét, hơn là quá trình trung hoà điện tích (Chen và cộng sự, 2003; Yang và cộng sự, 2016). Do đó, khi sử dụng chitosan trọng lượng phân tử càng cao thì khả năng kết bông vi tảo càng lớn, dễ dàng lắng và lọc hơn, được ưu tiên ứng dụng thực tế (Yang và cộng sự, 2016). Tuy nhiên, việc kết bông quá lớn bởi các liên kết tĩnh điện hình thành khối bông lớn sẽ gây khó khăn khi tách tế bào riêng lẻ để có thể nuôi cấy phục hồi.

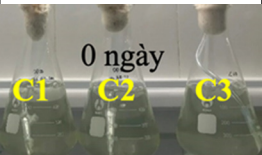
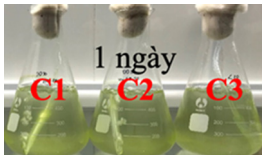
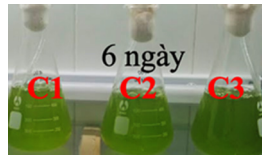


Hình 3. Ảnh hưởng của trọng lượng phân tử chitosan và thời gian lắng đến hiệu suất lắng sinh khối vi tảo (A) và hình ảnh quan sát vi tảo kết lắng thứ tự các mẫu từ trái sang phải bằng chitosan 1, chitosan 2 và chitosan 3 (B).

Sinh khối vi tảo đậm đặc sau khi thu hoạch bằng các loại chitosan (C1, C2, C3) tại thời điểm 120 phút, tiến hành lọc thu sinh khối vi tảo; sinh khối vi tảo được tiến hành nuôi cấy để đánh giá khả năng phục hồi. Kết quả nuôi cấy được thể hiện trên Bảng 3, cho thấy quá trình phát triển của tế bào vi tảo được thu bằng các loại chitosan đạt mật độ khác biệt ($p < 0,05$) sau 1 ngày nuôi. Sự thay đổi về màu sắc của các bình nuôi cấy C2 và C3 (thu hoạch bằng chitosan 2 và 3) có màu xanh đậm gần giống nhau ($p > 0,05$) và khác biệt rõ rệt ($p < 0,05$) so với bình C1 ở ngày thứ 6 đạt mật độ tế bào khoảng $37,8 - 39,3 \times 10^6$ tb/mL. Kết quả này cho thấy vi tảo thu nhận bằng chitosan có trọng

lượng phân tử thấp có khả năng phục hồi và phát triển tốt hơn so với vi tảo thu nhận bằng chitosan có trọng lượng phân tử cao. Qua quan sát tế bào vi tảo trên kính hiển vi quang học Olympus BX41TF sau khi thu, khả năng tạo tủa của chitosan có trọng lượng phân tử cao có sự kết bông vi tảo lớn, do chitosan có cấu trúc mạch dài và độ nhớt cao. Ngược lại, quan sát khối bông vi tảo thu bằng chitosan có trọng lượng phân tử thấp (C3, Mw_{60}) rời hạt, có lẽ được kết tủa bởi cơ chế vá (Yang và cộng sự, 2016; Phương, 2023). Do vậy, mật độ tế bào nuôi cấy phát triển sau 1 ngày đạt thấp hơn 1,7 lần so với vi tảo thu nhận bằng chitosan có trọng lượng phân tử cao hơn (C1, Mw_{520}).

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng trở lại của sinh khối vi tảo sau khi keo tụ bằng các loại chitosan khác nhau

									
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Loại chitosan	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Mật độ tế bào (tb/mL) $\times 10^6$	$0,65 \pm 0,02^c$	$0,48 \pm 0,02^b$	$0,38 \pm 0,02^a$	$34,56 \pm 1,7^a$	$37,83 \pm 1,9^b$	$39,29 \pm 1,4^b$			

Việc lựa chọn loại chitosan với trọng lượng phân tử phù hợp phụ thuộc vào mục đích thu hoạch sinh khối vi tảo đậm đặc. Nếu mục tiêu là lưu giữ tế bào sống, đảm bảo khả năng tái nuôi cấy và sinh trưởng tốt sau quá trình thu hoạch, đồng thời loại bỏ nước để thuận tiện cho vận chuyển và bảo quản, thì chitosan có trọng lượng phân tử thấp ($Mw < 220$ kDa) có thể là lựa chọn thích hợp. Tuy nhiên, mục tiêu của nghiên cứu này là thu hoạch sinh khối vi

tảo đậm đặc với hiệu suất cao và ít ảnh hưởng đến các hoạt chất sinh học (Bảng 4). Do đó, loại chitosan có trọng lượng phân tử trung bình (chitosan 1, Mw 520 kDa) đã được lựa chọn trong nghiên cứu này.

3.3. Ảnh hưởng của phương pháp thu nhận bằng chitosan đến hiệu suất lắng và hiệu suất thu hồi carotenoid và chlorophyll-a của vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Kết quả Bảng 4 cho thấy việc kết hợp sử

dụng chitosan và điều chỉnh pH 10 (120 phút lắng) mang lại hiệu quả lắng (FE = 89%) cao gần gấp 2 lần so với chỉ sử dụng chitosan (FE = 48%) ở cùng nồng độ (60 ppm). Do vậy, nước loại của mẫu kết lắng bằng chitosan kết hợp điều chỉnh pH 10 trong, mật độ tế bào còn lại trong nước loại chỉ đạt khoảng $6,7 \times 10^6$ tb/mL, thấp hơn 2 lần so với nước loại của mẫu chỉ kết lắng bằng chitosan. Nghiên cứu của Pugazhendhi và cộng sự (2019) đã khẳng định việc tăng độ pH môi trường dịch vi tảo sẽ thúc đẩy quá trình kết bông, tăng hiệu suất lắng đến 90%. Sau lắng tiến hành lọc bông vi tảo, hiệu suất thu sinh khối của phương pháp chỉ sử dụng chitosan thấp hơn phương pháp kết hợp 10% và mật độ tế bào vi tảo thu được từ hai phương pháp thứ tự đạt khoảng 115×10^6 tb/mL và 143×10^6 tb/mL. Quá trình kết bông của vi tảo đòi hỏi loại polyme có tích điện dương cao, khi môi trường

dịch vi tảo ở độ kiềm cao làm ảnh hưởng đến khả năng tích điện của polyme và ngăn cản quá trình kết bông (Pugazhendhi và cộng sự, 2019). Đồng thời, khi quan sát đếm tế bào dưới kính hiển vi quang học, phát hiện sinh khối vi tảo thu bằng phương pháp kết hợp điều chỉnh pH 10 xuất hiện những tế bào bị vỡ, ảnh hưởng đến hoạt chất màu trong vi tảo. Điều này cho thấy việc thu hoạch sinh khối vi tảo phụ thuộc rất nhiều vào độ pH môi trường (Pugazhendhi và cộng sự, 2019). Hiệu suất thu hàm lượng các chất màu (chlorophyll-a và carotenoid) của vi tảo bằng chitosan có xu hướng cao hơn so với vi tảo thu nhận bằng chitosan kết hợp với điều chỉnh pH 10, dao động trong khoảng 86,7% đến 94,7%. Kết quả này tương đương với kết quả công bố bởi Trung và cộng sự (2023) khi thu nhận vi tảo bằng muối chitosan lactate ở pH 10.

Bảng 4. So sánh hiệu quả thu hồi sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng chitosan (CTS) và kết hợp điều chỉnh pH 10 sau 120 phút lắng

Phương pháp thu	CTS	CTS + pH
Hiệu suất lắng (%)	$48,6 \pm 0,9$	$89,2 \pm 0,5$
Hiệu suất thu sinh khối (%)*	$88,0 \pm 2,5$	$98,3 \pm 1,6$
Mật độ vi tảo còn lại trong dịch loại (tb/mL) $\times 10^6$	$16,2 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,4$
Mật độ vi tảo của sinh khối vi tảo đậm đặc (tb/mL) $\times 10^6$	$114,5 \pm 20,5$	$143,0 \pm 21,7$
Hiệu suất thu hồi chlorophyll-a (%)*	$94,7 \pm 2,6$	$93,5 \pm 3,9$
Hiệu suất thu hồi carotenoid (%)*	$89,0 \pm 0,7$	$86,7 \pm 0,3$

*Tính trên chất khô tuyệt đối.

3.4. Ảnh hưởng của phương pháp thu nhận và điều kiện bảo quản đến tỷ lệ tổn thất carotenoid và chlorophyll-a của vi tảo *Nannochloropsis* sp.

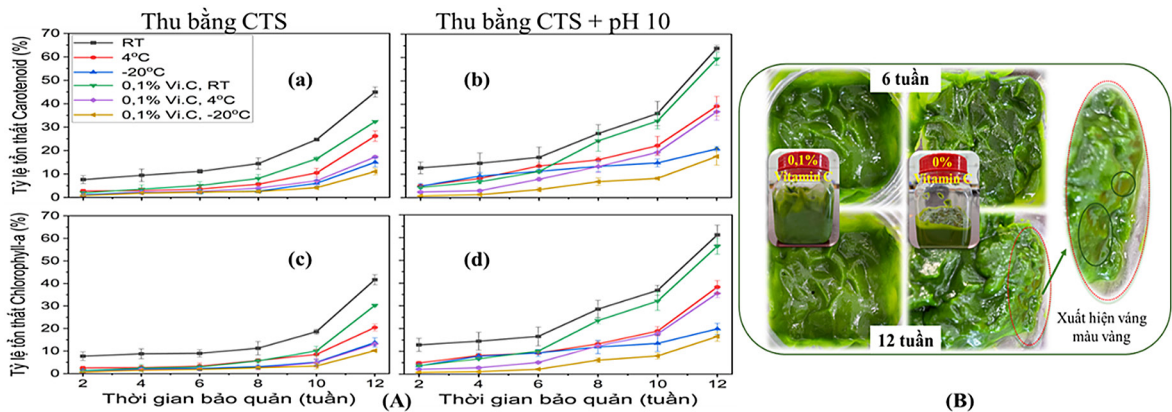
Mẫu sinh khối vi tảo đậm đặc thu nhận bằng hai phương pháp (chitosan và chitosan có kết hợp điều chỉnh pH 10) được chia làm hai nhóm, một nhóm không bổ sung vitamin C và một nhóm có bổ sung 0,1% vitamin C. Các nhóm mẫu được bảo quản ở ba chế độ nhiệt độ ($-20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, RT: $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) trong thời gian 12 tuần. Kết quả đánh giá tỷ lệ tổn thất carotenoid và chlorophyll-a của vi tảo được thể hiện trên Hình 4. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tổn thất chất màu carotenoid và chlorophyll-a của

tất cả các mẫu vi tảo tăng dần theo thời gian bảo quản. Phương pháp thu nhận và nhiệt độ bảo quản có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ tổn thất chất màu carotenoid và chlorophyll-a của vi tảo. Vi tảo bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn có tỷ lệ tổn thất chất màu carotenoid và chlorophyll-a thấp hơn. Ở cùng một nhiệt độ bảo quản, mẫu vi tảo có bổ sung 0,1% vitamin C có tỷ lệ tổn thất chất màu carotenoid và chlorophyll-a thấp hơn so với mẫu vi tảo không bổ sung vitamin C (Hình 4A). Ở cùng một điều kiện bảo quản (nhiệt độ, có bổ sung/không bổ sung vitamin C), mẫu vi tảo thu nhận bằng chitosan có tỷ lệ tổn thất chất màu carotenoid (Hình 4A-a) và chlorophyll-a (Hình 4A-c) thấp hơn so với mẫu

vi tảo thu nhận bằng chitosan kết hợp với điều chỉnh pH 10 (Hình 4A-b và 4A-d). Kết quả này có thể được giải thích, màu sắc đặc trưng của các tế bào vi tảo sau thu hoạch được bảo vệ nhờ đặc tính tạo lớp bao phủ của phân tử chitosan, có thể bảo vệ tế bào không bị vỡ nên ít gây ảnh hưởng đến các hoạt chất màu (Trung và cộng sự, 2023). Tỷ lệ tổn thất chất màu carotenoid và chlorophyll-a tăng khi tăng nhiệt độ bảo quản có thể do sự phát triển vi sinh vật, gây hư hỏng các chất màu trong sinh khối vi tảo bảo quản theo thời gian khi ở nhiệt độ cao (Nunes và cộng sự, 2009). Ở nhiệt độ lạnh đông có thể ức chế vi sinh vật rất tốt nhưng nó gây ra mất ổn định tế bào chất, phá vỡ ty thể, nhân, plastid và cuối cùng là màng tế bào dẫn đến tổn thương không thể phục hồi (Lynch và Lauchli, 1988). Low và Toledo (2015) cũng đã nghiên cứu khả năng sống sót của tế bào vi tảo sau 16 tuần bảo quản lạnh ở 0 – 5°C; kết quả cho thấy tỷ lệ sống của tế bào vi tảo đạt 97%, cao hơn nhiều so với vi tảo bảo quản ở nhiệt độ -18°C.

Ngoài ra, vitamin C bổ sung vào sinh khối vi tảo nhằm giữ được lượng tế bào sống và ngăn ngừa sự hư hỏng sản phẩm do vi sinh vật ở nhiệt độ lạnh trong khoảng 3 – 5°C (Khalili và cộng sự, 2019). Kết quả thể hiện trên Hình 4B cho thấy mẫu vi tảo không bổ sung vitamin C xuất hiện vầng màu vàng ở viền hũ sau 12 tuần bảo quản. Hiện tượng này có thể là một số tế bào bị hư hỏng nên khi carotenoid bị thoát ra ở dạng tự do sẽ bị oxy hoá làm biến màu (Lynch và Lauchli, 1988; Trung và cộng sự, 2023).

Từ các phân tích trên cho thấy, điều kiện thu nhận và bảo quản phù hợp đối với sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. là thu bằng chitosan (chitosan 1, Mw_{520}) nồng độ 60 ppm; mẫu vi tảo sau thu nhận được bổ sung 0,1% vitamin C và bảo quản ở nhiệt độ $4 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 10 tuần. Điều kiện bảo quản này tạo thuận lợi trong vận chuyển và bảo quản các tế bào sống để có thể tái nuôi cấy, đồng thời tiết kiệm năng lượng điện và đầu tư thiết bị.



Hình 4. (A) Tỷ lệ tổn thất hàm lượng carotenoid (a,b) và chlorophyll-a (c,d) của vi tảo thu nhận bằng chitosan (CTS) (a, c) và thu nhận bằng chitosan kết hợp với điều chỉnh pH 10 (b, d) ở các điều kiện bảo quản khác nhau và (B) Hình ảnh sinh khối vi tảo đậm đặc được thu bằng chitosan và bảo quản sau 6 và 12 tuần ở $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xác định các điều kiện hiệu quả để thu hồi sinh khối đậm đặc của vi tảo *Nannochloropsis* sp. và bảo quản tốt các sắc tố có giá trị bằng phương pháp keo tụ sinh học. Cụ thể, việc sử dụng chitosan với trọng lượng phân tử 520 kDa ở nồng độ 60 ppm cho

thấy hiệu suất thu hồi sinh khối cao (88,0%) cùng khả năng bảo toàn các sắc tố đáng kể (thu hồi chlorophyll-a ~95,0%, carotenoid ~89,0%). Hơn nữa, sinh khối đậm đặc này có thể được bảo quản hiệu quả trong 10 tuần ở nhiệt độ $4 \pm 2^\circ\text{C}$ khi bổ sung 0,1% vitamin C, với mức tổn thất các sắc tố thấp (carotenoid

~7%, chlorophyll-a ~5%). Những kết quả này cho thấy phương pháp thu hồi và bảo quản được đề xuất có tiềm năng ứng dụng thực tế

trong việc cung cấp sinh khối *Nannochloropsis* sp. chất lượng cao cho ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Đan Phượng (2023), “Phương pháp thu hoạch vi tảo và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản”, Tạp chí Khoa học & Công nghệ thủy sản, 4, 123-136.
2. AOAC (1990), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, *The Association of Official Analytical Chemistry*, Washington, DC.
3. Blockx J., Verfaillie A., Thielemans W., and Muylaert K., (2018), “Unravelling the Mechanism of Chitosan-Driven Flocculation of Microalgae in Seawater as a Function of pH,” *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(9), 11273-11279.
4. Chen L., Chen D., and Wu C. (2003), “A New Approach for the Flocculation Mechanism of Chitosan”, *J. Polym. Environ.*, 11(3), 87-92.
5. Guillard, R.R.L. (1975), “Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates”, *In Culture of Marine Invertebrate Animals*, 29-60), Springer, Boston, MA.
6. Khalili M.A., Kenari A.A., Rezaei M. and Mirzakhani, M.K. (2019), “Antioxidant and Antibacterial Effects of Vitamins C and E Alone or a Combination on Microalgae (*Nannochloropsis oculata*) Paste Quality during Cold Storage”, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(10), 1051 – 1062.
7. Low C. and Toledo M.I. (2015), “Assessment of the shelf-life of *Nannochloropsis oculata* flocculates stored at different temperatures”, *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(2), 315 – 321.
8. Lynch J. and Lauchli A. (1988), “Salinity affects intracellular calcium in corn root protoplasts”, *Plant Physiology*, 87(2), 351 – 356.
9. Minh N. C., Cuong H. N., Phuong P. T. D., Schwarz S., Stevens W. F., Hoa N. V. and Trung T. S., 2017. Swelling-assisted reduction of chitosan molecular weight in the solid state using hydrogen peroxide. *Polymer Bulletin*, 74, 3077-3087.
10. Nunes M., Pereira A., Pereira J.F. and Yasumaru F. (2009), “Evaluation of the Microalgae Paste Viability Produced in a Mollusk Hatchery in Southern Brazil”, *Journal of the world aquaculture society*, 40(1), 87 – 94.
11. Phuong P.T.D., Trung T.S., Stevens W.F., Minh N.C., Bao H.N.D., Hoa N.V. (2022). Valorization of heavy waste of modern intensive shrimp farming as a potential source for chitin and chitosan production. *Waste and Biomass Valorization*, 13, 823-830.
12. Pugazhendhi A., Shobana S., Bakonyi P., Nemestóthy N., Xia A., and Kumar G. (2019), “A review on chemical mechanism of microalgae flocculation via polymers”, *Biotechnology Reports*, 21, e.00302.
13. Sales R., Souza-Santos L. P. (2020), “Production of concentrated inocula from the microalgae *Nannochloropsis oculata*”, *Aquaculture International*,
14. Sukenik A., Bilanovic D., and Shelef G. (1988), “Flocculation of microalgae in brackish and sea waters”, *Biomass*, 15(3), 187-199.
15. Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J. & Suprakash, R. (2014), “Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents”, *Res. J. Chem. Sci.*, 4(9), 63-69.
16. Trung T.S., Phuong P.T.D., Minh N.C., Thuong N.T.N., Prinyawiwatkul W., Bao H.N.D, Hoa N.V. (2023), “Swollen-state preparation of chitosan lactate from moulted shrimp shells and its application for harvesting marine microalgae *Nannochloropsis* sp.”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 244, 125337.
17. Yang R., Li H., Huang M., Yang H., and Li A. (2016), “A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment”, *Water Research*, 95, 59-89.
18. Zhang H., Neau S.H. (2001), “In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation”, *Biomaterials*, 22(12), 1653-1658.