

NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN ĐIỀU KIỆN NUÔI TRỒNG THÍCH HỢP ĐỂ NÂNG CAO HÀM LƯỢNG LIPIT CỦA VI TẢO LỤC *Chlorella sorokiniana* CHO ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG SẢN XUẤT NHIÊN LIỆU SINH HỌC

Nguyễn Minh Châu³, Lê Thị Thơm¹, Nguyễn Cẩm Hà¹, Lê Anh Huy¹, Nguyễn Mạnh Đạt¹, Ngô Thị Hoài Thu¹, Nguyễn Thị Thu Trang³, Trần Thị Liên³, Vũ Thị Thu Hà³, Đặng Diễm Hồng^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

²Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST

³Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ lọc, hóa dầu, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Chlorella là chi vi tảo lục có tốc độ sinh trưởng nhanh và có khả năng tích lũy lipit trong tế bào cao, được xem như là phản ứng tự vệ của cơ thể tảo với điều kiện môi trường sống bất lợi. Nuôi trồng chi vi tảo này theo công nghệ nuôi cấy 2 giai đoạn đang được tập trung nghiên cứu trên thế giới để thu được sinh khối tảo có hàm lượng lipit cao nhằm cung cấp nguồn sinh khối cho sản xuất nhiên liệu sinh học. Nghiên cứu này trình bày kết quả về ảnh hưởng của điều kiện môi trường lên sinh trưởng và tích lũy lipit của loài *Chlorella sorokiniana* ở giai đoạn 2. Sau 4 ngày nuôi cấy ở giai đoạn 1 trong môi trường BG-11 có NaNO₃ 3 g/L, glucose 10 g/L, nhiệt độ 28-30°C, cường độ chiếu sáng 40-100 μmol/m²s, pH 7, *C. sorokiniana* đạt sinh trưởng tốt nhất và chuyển sang giai đoạn 2. Kết quả thu được ở giai đoạn 2 cho thấy khi bổ sung NaCl 30 g/L, NaHCO₃ 6 g/L vào môi trường nuôi, chiếu cường độ ánh sáng 150 μmol/m²s, *C. sorokiniana* có sinh khối khô (SKK) và hàm lượng lipit đạt cao nhất là 2,12 ± 0,06 g/L và 35,8% SKK, tương ứng. Axit béo C18:2 (chiếm 28,25% axit béo tổng số - total fatty acid/TFA), C18:3 (26,41% TFA), C16:0 (19,20% TFA) và C16:1 (17,25% TFA) là thành phần axit béo chính trong sinh khối tảo này nuôi trồng được. Kết quả thu được cho thấy sinh khối *C. sorokiniana* là nguyên liệu tiềm năng để sản xuất nhiên liệu sinh học chất lượng cao. Dựa trên độ không bão hòa của axit béo, tính toán chất lượng của biodiesel sản xuất từ thành phần axit béo trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn đạt 4 trên 5 tiêu chuẩn của Hoa Kỳ và Châu Âu đối với dầu diesel sinh học (B100), có tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn sản xuất.

Từ khóa: *Chlorella sorokiniana*, BG-11, điều kiện môi trường, nhiên liệu sinh học, nuôi cấy hai giai đoạn, vi tảo lục.

MỞ ĐẦU

Chlorella là một trong những chi vi tảo lục được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất thực phẩm, dược phẩm, xử lý môi trường và sản xuất nhiên liệu sinh học do sinh khối của chi này có chứa hàm lượng lớn lipit, protein, cacbohydrat, sắc tố, khoáng đa và vi lượng và vitamin (Ibrahim *et al.*, 2020). Trong đó, *Chlorella sorokiniana* là một loài tiềm năng của chi *Chlorella* có năng suất sinh khối lớn, có khả năng tích lũy lipit cao dưới điều kiện môi trường nuôi thiếu dinh dưỡng, có tính chống chịu cao với nhiệt độ lên đến 42°C nên nó đã trở thành nguồn nguyên liệu có giá trị để sản xuất nhiên liệu sinh học, cung cấp một giải pháp tiềm năng cho giảm bớt tình trạng cạn kiệt nhiên liệu hóa thạch (Menegazzo *et al.*, 2022). Có 3 phương thức nuôi trồng chính (quang tự dưỡng, dị dưỡng và tạp dưỡng) có thể áp dụng cho nuôi trồng vi tảo tùy thuộc vào nguồn cacbon (vô cơ hay hữu cơ) và có hay không có chiếu sáng. Ở phương thức nuôi trồng quang tự dưỡng, sử dụng các hệ thống bể hở và bể phản ứng quang sinh kín (closed photobioreactors - PBRs), tảo sử dụng ánh sáng mặt trời và CO₂ trong khí quyển để sinh trưởng và phát triển là nguồn nguyên liệu thô tái tạo cho ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học (Sajjadi *et al.*, 2018). Ngoài ra, một số loài vi tảo sẽ có hàm lượng lipit cao khi sống theo phương thức dị dưỡng (sử dụng nguồn cacbon hữu cơ và không cần ánh sáng) kết hợp điều kiện môi trường nuôi bất lợi như thiếu chất dinh dưỡng (nitơ, photpho) (Srinuanpan *et al.*, 2018) hay khi có mặt các ion kim loại (đồng, kẽm) (Tan *et al.*, 2024), có sự thay đổi về nồng độ muối (cao và thấp) cũng như có chiếu cường độ ánh sáng cao (Ali *et al.*, 2021). Tuy nhiên, ở điều kiện môi trường nuôi bất lợi sẽ làm giảm sinh trưởng của tảo. Dựa trên cơ sở nêu trên, việc nuôi cấy vi tảo theo 2 giai đoạn đã được nghiên cứu. Ở giai đoạn 1, vi tảo được nuôi trong môi trường thích hợp để tảo có sinh trưởng đạt cao nhất. Sau đó, tảo được chuyển sang giai đoạn 2 có sự bất lợi về điều kiện môi trường nuôi. Trong điều kiện bất lợi, tảo bị giảm sinh khối nhưng sinh khối lại có hàm lượng lipit rất cao được xem là một giải pháp đầy hứa hẹn để nâng cao tích lũy lipit trong sinh khối tảo. Theo nghiên cứu của Kakarla và đồng tác giả (2018), *C. sorokiniana* được nuôi cấy 2 giai đoạn trong môi trường BG-11 có bổ sung NaCl 60 g/L và NaHCO₃ 1g/L đã cho sinh khối có hàm lượng lipit đạt cao nhất là 38%SKK. Tiếp theo các kết quả nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023) đã công bố về lựa chọn được điều kiện nuôi thích hợp *C. sorokiniana* ở giai

đoạn 1, trong nghiên cứu này, điều kiện nuôi trồng bất lợi về dinh dưỡng khác nhau cho loài vi tảo này ở giai đoạn 2 để có được sinh khối tảo có hàm lượng lipid cao làm nguyên liệu cho định hướng sản xuất nhiên liệu sinh học sẽ được trình bày.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu: Tảo giống *C. sorokiniana* thuộc bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được lưu giữ ở 28°C, chiếu ánh sáng có cường độ 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, quang chu kỳ sáng: tối là 12:12 giờ. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu là thông dụng và đảm bảo độ tinh khiết cho thí nghiệm.

Phương pháp

Xác định sinh trưởng của tảo

Sinh trưởng của *C. sorokiniana* được đánh giá thông qua mật độ tế bào (MĐTB), SKK được xác định theo mô tả của Đặng Diễm Hồng (2019).

Phân tích hàm lượng lipid, protein, cacbohydrat, carotenoid và thành phần axit béo

Hàm lượng lipid tổng số được xác định theo phương pháp Bligh và Dyer (1959), có cải tiến phù hợp với điều kiện của Việt Nam (Đặng Diễm Hồng, 2019). Hàm lượng protein xác định theo phương pháp Bradford (1976), cacbohydrat xác định theo mô tả của Sun và đồng tác giả (2014). Thành phần và hàm lượng các axit béo của *C. sorokiniana* được xác định bằng GC/MS được tiến hành tại Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội theo mô tả của Đặng Diễm Hồng (2019).

Phân tích chất lượng biodiesel sản xuất từ sinh khối *C. sorokiniana*

Mức độ không bão hòa của thành phần axit béo và 5 chỉ số cơ bản của biodiesel: trọng lượng riêng, điểm chớp cháy, độ nhớt động học, chỉ số cetane và chỉ số iodine xác định theo công thức của Hoekman và đồng tác giả (2012).

Môi trường nuôi cấy *C. sorokiniana*

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường BG-11. Thành phần môi trường BG-11 gồm (g/L): NaNO_3 - 3,0; Na_2CO_3 - 0,02; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,036; Citric acid - 0,006; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,075; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,04; EDTANa_2 - 0,001; $(\text{NH}_4)[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2)_2]$ - 0,006; glucose - 10 và dung dịch A_5 - 1 mL. Trong đó, dung dịch A_5 (g/L): H_3BO_3 - 2,850, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,810, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,220, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,080, MoO_3 - 0,015, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,044). Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 1.000 mL có chứa 450 mL môi trường, 28°C, chiếu sáng có cường độ 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, quang chu kỳ sáng: tối là 24:0 giờ, pH 7,4; tốc độ lắc 200 vòng/phút, MĐTB gieo ban đầu là 10×10^6 TB/mL. Giống cấp 1: được nuôi ở môi trường BG-11 sau 6 ngày nuôi cấy (với giống gốc được nuôi giữ trên môi trường thạch).

Thí nghiệm lựa chọn điều kiện môi trường nuôi cấy thích hợp ở giai đoạn 2

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaCl (0; 20; 30; 40; 60 và 90 g/L), nồng độ NaHCO_3 (0; 1; 2; 4; 6; 8 và 10 g/L), nồng độ NaNO_3 (0; 0,02228; 1 và 2 g/L), nồng độ photpho dưới dạng $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0; 45; 90 và 150 mg/L), nồng độ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0; 15,7; 31,4; 47,1 và 68,2 mg/L), cường độ ánh sáng (0, 80, 150, 250 và 340 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) với quang chu kỳ sáng: tối là 24:0 giờ lên sinh trưởng và tích lũy lipid ở vi tảo *C. sorokiniana* đã được tiến hành nghiên cứu. Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 1.000 mL có chứa 450 mL môi trường, nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/ phút. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 2 lần. Hàng ngày lấy mẫu để xác định sinh trưởng bằng cách xác định SKK. Thí nghiệm sau kế thừa kết quả thông số tối ưu được lựa chọn của thí nghiệm trước. Loài *C. sorokiniana* được nuôi trong điều kiện tối ưu 4 ngày (ở giai đoạn 1). Sau đó, bổ sung điều kiện môi trường khác nhau cho từng thí nghiệm (ở giai đoạn 2) và thu sinh khối để phân tích thành phần dinh dưỡng, hàm lượng lipid và axit béo sau 2 ngày nuôi cấy.

Xử lý số liệu

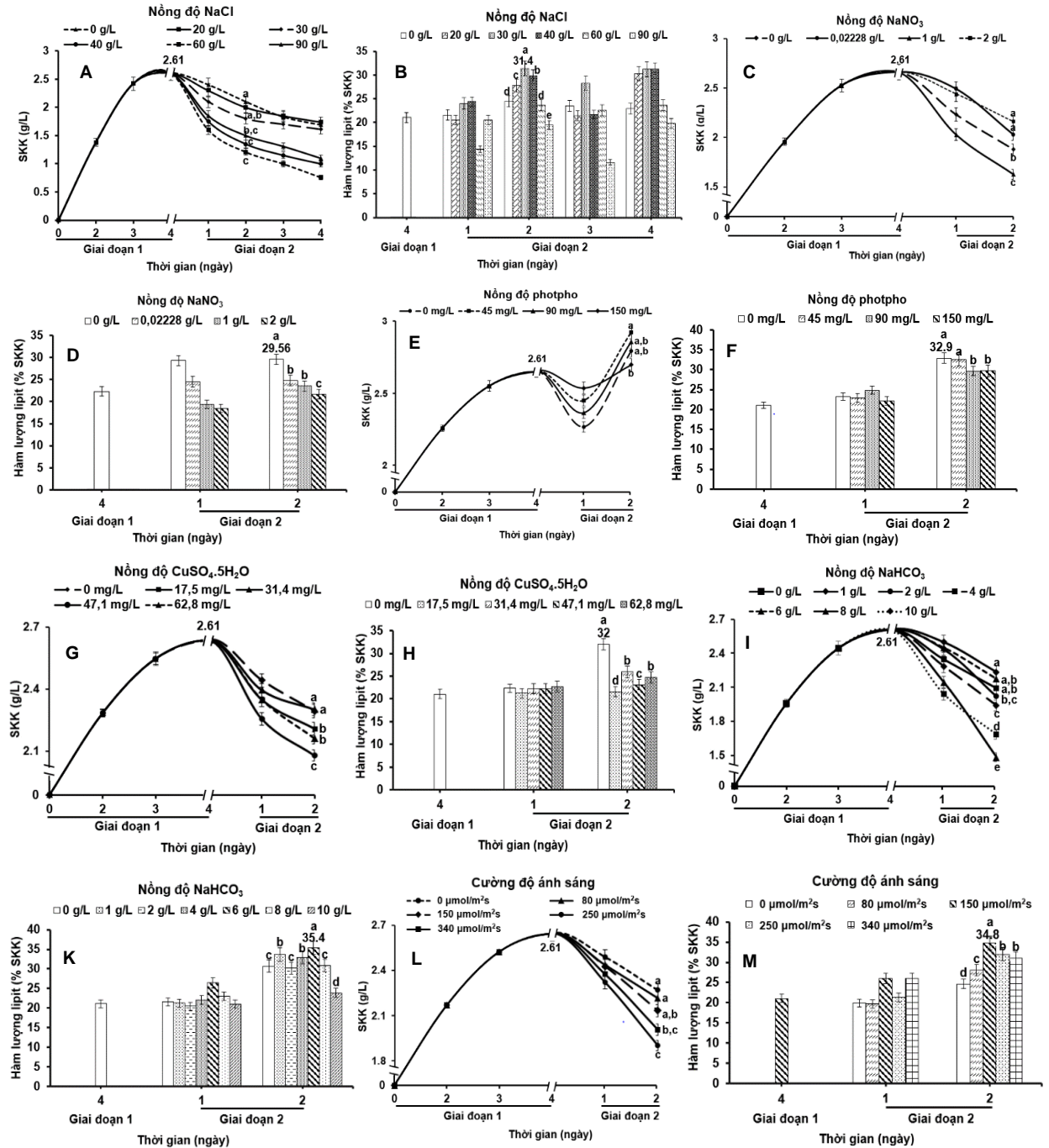
Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA một thành phần ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho tích lũy lipid của *C. sorokiniana* ở giai đoạn 2

Kế thừa các kết quả nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023) đã lựa chọn được các điều kiện nuôi thích hợp cho giai 1 bao gồm môi trường BG-11 có nguồn nitơ là NaNO_3 3g/L, nguồn carbon là glucose 10 g/L, nuôi lắc 200 vòng/phút ở cường độ ánh sáng 40 -100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, nhiệt độ 30°C, pH 7, chủng *C. sorokiniana* có khả năng sinh trưởng tốt nhất với SKK cao nhất đạt $2,84 \pm 0,06$ g/L và hàm lượng lipid cao nhất đạt $21,06 \pm 0,10$ sau 4 ngày nuôi cấy ở giai đoạn này.

Ảnh hưởng của nồng độ NaCl: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl (0; 20; 30; 40; 60 và 90 g/L) lên sinh trưởng và tích lũy lipid của *C. sorokiniana* (Hình 1A, 1B) cho thấy tảo tích lũy lipid tốt nhất trong môi trường có bổ sung 30 g/L NaCl với hàm lượng lipid đạt cao nhất là $31,40 \pm 0,84\%$ SKK và SKK đạt $1,8 \pm 0,31$ g/L sau 2 ngày bổ sung muối. Sinh trưởng của *C. sorokiniana* giảm dần trong các ngày nuôi khi tăng nồng độ muối. Kết quả này tương đối phù hợp với công bố của Yun và đồng tác giả (2019) khi nuôi chủng *Chlorella vulgaris* YH703 trong môi trường BG-11 có bổ sung 29,25 g/L NaCl, hàm lượng lipid đạt 24,7% SKK (so với đối chứng đạt 12,5% SKK) sau 2 ngày nuôi cấy ở giai đoạn 2. Do đó, nồng độ NaCl 30g/L được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Sinh trưởng và hàm lượng lipid của *C. sorokiniana* được nuôi trồng dưới điều kiện môi trường khác nhau. Nồng độ NaCl (A, B), nồng độ NaNO₃ (C, D), nồng độ photpho (E, F), nồng độ CuSO₄.5H₂O (G, H); nồng độ NaHCO₃ (I, J), cường độ ánh sáng (K, L)

Các chữ số a, b, c, d tại cùng một thời điểm chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$).

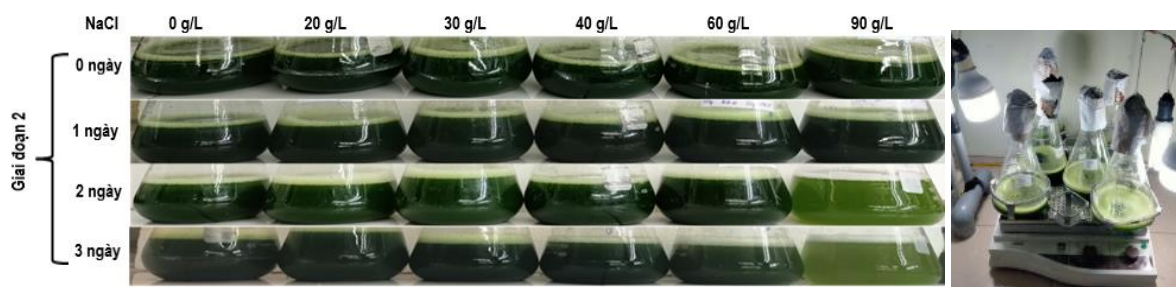
Ảnh hưởng của nồng độ NaNO_3 : Ở giai đoạn 2, sau 2 ngày nuôi cấy ở nồng độ 0 và 22,28 mg/L NaNO_3 , *C. sorokiniana* có sinh khối khô và tích lũy lipid đạt cao nhất là 1,89 và 2,04 g/L, $29,56 \pm 0,33$ và $24,8 \pm 0,33\%$ SKK, tương ứng (Hình 1C, 1D). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê sinh học ($p > 0,05$). Theo công bố của Xie và đồng tác giả (2020) khi kết hợp hai yếu tố độ mặn cao và hàm lượng nitơ thấp (22,28 mg/L NaNO_3) trong môi trường nuôi chủng *C. sorokiniana* SDEC-18 ở giai đoạn 2, hàm lượng lipid tăng lên 50,53% SKK nhưng SKK chỉ đạt 0,46 g/L. Do vậy, trong các thí nghiệm tiếp theo nên chọn nồng độ NaNO_3 0 g/L (không bổ sung thêm NaNO_3) ở giai đoạn 2 của quá trình nuôi cấy loài *C. sorokiniana*.

Ảnh hưởng của nồng độ photpho dưới dạng $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: Sau 2 ngày bổ sung muối và tăng hàm lượng photpho (0; 45; 90 và 150 mg/L) trong môi trường nuôi, sinh trưởng của *C. sorokiniana* không có sự thay đổi nhiều. Tuy nhiên, hàm lượng lipid và SKK trong môi trường có nồng độ photpho là 0 và 45 mg/L photpho đạt $32,9 \pm 0,40$ và $32,56 \pm 0,23$ %SKK và 2,74 và 2,86 g/L, tương ứng (Hình 1E, 1F) với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$). Do đó, lựa chọn bổ sung 0 mg/L photpho cho các thí nghiệm tiếp theo vừa đơn giản, dễ thực hiện và giảm thiểu các vi sinh vật khác vì trong thí nghiệm này, các nghiệm thức cần li tâm thu sinh khối sau đó bổ sung môi trường có chứa hàm lượng photpho tương ứng, dẫn đến khả năng nhiễm cao trong quá trình thao tác.

Ảnh hưởng của nồng độ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Sau 2 ngày bổ sung hàm lượng $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0; 15,7; 31,4; 47,1 và 68,2 mg/L) vào môi trường nuôi, sinh trưởng của *C. sorokiniana* không có sự thay đổi nhiều. Ở nồng độ 0 và 31,4 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *C. sorokiniana* có hàm lượng lipid và SKK đạt cao nhất là $32,00 \pm 0,27$ và $25,93 \pm 0,85$ %SKK và 2,24 và 2,25 g/L, tương ứng (Hình 1G, 1H). Sự khác biệt về lipid có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$). Như vậy, lựa chọn nồng độ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0 mg/L cho sinh khối tảo có hàm lượng lipid cao nhất sẽ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ NaHCO_3 : Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaHCO_3 (0; 1; 2; 4; 6; 8 và 10 g/L) lên sinh trưởng và hàm lượng lipid của *C. sorokiniana* đã cho thấy tảo có sinh khối và tích lũy lipid trong môi trường có bổ sung 6 g/L NaHCO_3 đạt 2,21 g/L và $35,4 \pm 1,33$ % SKK, tương ứng, sau 2 ngày bổ sung muối (Hình 1I, 1K). Theo Kakarla và đồng tác giả (2018) khi nuôi chủng *C. sorokiniana* HS1 ở môi trường BG-11 có bổ sung 1 g/L NaHCO_3 ở giai đoạn 2 đã cho sinh khối tảo có hàm lượng lipid đạt cao nhất là 38% SKK. Có sự khác biệt giữa kết quả nghiên cứu của chúng tôi so với công bố của Kakarla và đồng tác giả (2018) có thể là do sự sai khác về chủng giống và điều kiện nuôi khác nhau. Do vậy, nồng độ NaHCO_3 6 g/L đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng: Sau 2 ngày nuôi cấy ở giai đoạn 2, *C. sorokiniana* đạt sinh khối và hàm lượng lipid cao nhất là đạt 2,12 g/L và $34,80 \pm 0,52$ % SKK, tương ứng, ở cường độ ánh sáng $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (Hình 1L, 1M). Cường độ ánh sáng càng cao thì sinh trưởng càng bị giảm do đã có hiện tượng quang ức chế xảy ra nên hàm lượng lipid không tăng lên. Do vậy, cường độ ánh sáng $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (tương đương với 7 - 8 klux) đã được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Ảnh minh họa nuôi loài *C. sorokiniana* ở môi trường nuôi có nồng độ NaCl khác nhau ở giai đoạn 2

Phân tích thành phần axit béo và dinh dưỡng, chất lượng biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana*

Kết quả phân tích thành phần axit béo (Bảng 1) cho thấy trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* chủ yếu chứa các axit béo bão hòa và không bão hòa có 1 - 3 nối đôi như C16:0 (19,20% so với axit béo tổng số - TFA), C16:1 (17,25% TFA), C18:2 (28,25% TFA), C18:3 (26,41% TFA). Trong đó, các axit béo không bão hòa chiếm 79,92% so với TFA. Thành phần axit béo tương đối phù hợp với công bố của Menegazzo và đồng tác giả (2022), trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* CTT 7727 chứa chủ yếu các axit béo C16:0 (39,68% TFA), C16:1 (7,22% TFA), C18:0 (5,49% TFA), C18:1 (17,20% TFA), C18:2 (15,97% TFA) và C18:3 (11,03% TFA). Có sự khác biệt giữa hàm lượng các axit béo giữa kết quả của chúng tôi và công bố của Menegazzo và đồng tác giả (2022) do có sự sai khác về chủng giống và điều kiện nuôi trồng. Kết quả cho thấy sinh khối nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi đảm bảo chất lượng để làm nguyên liệu sản xuất nhiên liệu sinh học.

Bảng 1. Thành phần axit béo và dinh dưỡng có trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn

STT	Axit béo	Tên axit béo	Hàm lượng axit béo (% TFA)	STT	Tên axit béo	Hàm lượng axit béo (% TFA)
1	C16:2	7,10-Hexadecadienoic axit	7,80	10	Tổng các axit béo không no	79,92
2	C16:1	7-Hexadecenoic axit	17,25	11	Mức độ không bão hòa	1,69
3	C16:0	Palmitic axit	19,20	12	Protein (% SKK)	9,10 ± 0,50
4	C17:1	Heptadecenoic axit	0,21	13	Lipit (% SKK)	35,40 ± 1,33
5	C17:0	Margaric axit	0,24	14	Cacbohydrat (% SKK)	7,57 ± 0,1
6	C18:2	Linoleic axit	28,25	15	Chlorophyll a (µg/mL)	7,76 ± 0,10
7	C18:3	Gamma Linolenic axit	26,41	16	Chlorophyll b (µg/mL)	3,91 ± 0,15
8	C18:0	Stearic axit	0,62	17	Carotenoit (µg/mL)	0,51 ± 0,07
9		Tổng các axit béo no	20,06			

Ghi chú: Mức độ không bão hòa = [1 x (% monene) + 2 x (% diene) + 3 x (% Triene) ...]/100

Thành phần dinh dưỡng của *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng ở giai đoạn 2 (Bảng 1) đã cho thấy hàm lượng lipit, protein và cacbohydrat đạt lần lượt là 35,40 ± 1,33; 9,10 ± 0,5 và 7,57 ± 0,1 % SKK, tương ứng. Hàm lượng chlorophyll a, chlorophyll b và carotenoit đạt 7,76 ± 0,1; 3,91 ± 0,15 và 0,51 ± 0,07 (µg/mL), tương ứng. Do có chứa hàm lượng lớn các chất dinh dưỡng, đặc biệt là hàm lượng lipit cao nên *C. sorokiniana* rất phù hợp làm nguyên liệu cho sản xuất nhiên liệu sinh học trong tương lai.

Bảng 2. Dự đoán 5 chỉ số của biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn (Hoekman et al., 2012)

Mẫu	5 chỉ số của biodiesel				
	Trọng lượng riêng (kg/m ³)	Điểm chớp cháy (°C)	Độ nhớt động học	Chỉ số cetane	Chỉ số iodine (g I ₂ /100 g)
<i>C. sorokiniana</i> nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn (của công bố này)	882	172,04	4,14	51,62	138,24
Mức cho phép (theo tiêu chuẩn Hoa Kỳ và châu Âu) B100	860 – 900	> 101	1,9 - 6,0	> 47	< 120

Chất lượng biodiesel phụ thuộc vào mức độ không bão hòa của thành phần axit béo (Hoekman et al., 2012). Kết quả phân tích các chỉ số của biodiesel (Bảng 2) cho thấy biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn đạt 4 trên 5 tiêu chí của Hoa Kỳ và Châu Âu đối với dầu diesel sinh học (B100). Chỉ số iodine của biodiesel được dự đoán cao hơn giá trị cho phép nên cần giảm hàm lượng các axit béo có nhiều nối đôi có trong sinh khối chủng *C. sorokiniana* để sản xuất biodiesel có chất lượng cao.

KẾT LUẬN

Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy *C. sorokiniana* ở giai đoạn 2 là môi trường BG-11 có NaNO₃ 3g/L, glucose 10 g/L được duy trì đến giai đoạn 2. Ở giai đoạn 2 có bổ sung thêm NaCl 30 g/L, NaHCO₃ 6 g/L, cường độ ánh sáng 150 µmol/m²s trong 4 ngày nuôi cấy. Hàm lượng lipit, protein và cacbohydrat đạt lần lượt là 35,4 ± 1,33; 9,10 ± 0,5 và 7,57 ± 0,1 %SKK, tương ứng. Sinh khối tảo này giàu các axit béo không bão hòa 1 và đa nối đôi như C16:0 (19,20% so với TFA), C16:1 (17,25% TFA), C18:2 (28,25% TFA), C18:3 (26,41% TFA), tương đối phù hợp cho sản xuất nhiên liệu sinh học sau khi loại bỏ bớt các axit béo không bão hòa có nhiều nối đôi. Chất lượng của biodiesel sản xuất từ sinh khối chủng *C. sorokiniana* nuôi cấy tạp dưỡng 2 giai đoạn đạt 4 trên 5 tiêu chí của Hoa Kỳ và Châu Âu đối với dầu diesel sinh học (B100), có tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn sản xuất.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi đề tài “Nghiên cứu sản xuất năng lượng sạch với giá cạnh tranh từ sinh khối vi tảo chứa dầu bằng năng lượng mặt trời và CO₂ theo hướng công nghệ khép kín không phế thải” (do GS.TS. Vũ Thị Thu Hà làm chủ nhiệm và GS.TS. Đặng Diễm Hồng làm chủ nhiệm đề tài nhánh).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali HEA, El-Fayoumy EA, Rasmy WE, Soliman RM, Abdullah MA (2021). Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. *J Appl Phycol* 33: 227-239.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Đặng Diễm Hồng (2019). *Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 749 trang.

Đặng Diễm Hồng, Lê Thị Thơm, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Anh Huy, Nguyễn Mạnh Đạt, Tô Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Thùy Linh, Vũ Thị Thu Hà (2023). Nghiên cứu lựa chọn điều kiện nuôi trồng thích hợp cho sinh trưởng của vi tảo lục *Chlorella sorokiniana* ứng dụng sản xuất nhiên liệu sinh học. *Tuyển tập báo cáo toàn văn tại Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2023*, trang 632-637.

Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan, M (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and sustainable energy reviews* 16(1): 143-169.

Ibrahim IA, Elbaily ZI (2020). A review: Importance of chlorella and different applications. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 65(1): 16-34.

Kakarla R, Choi JW, Yun JH, Kim BH, Heo J, Lee S, Cho DH, Ramanan R, Kim HS (2018). Application of high-salinity stress for enhancing the lipid productivity of *Chlorella sorokiniana* HS1 in a two-phase process. *Journal of microbiology* 56: 56-64.

Menegazzo ML, Nascimento VM, Hestekin CN, Hestekin JA, Fonseca GG (2022). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* cultivated in outdoor photobioreactors for biodiesel production. *Biofuels* 13(4): 483-488.

Sajjadi B, Chen WY, Raman AAA, Ibrahim S (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97: 200-232.

Srinuanpan S, Cheirsilp B, Prasertsan P, Kato Y, Asano Y (2018). Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: nutrient starvations and cost-effective harvesting process. *Renew Energy* 122: 507-516.

Tan S, Wen F, Liu D, Lu H, Li L, Zhu L (2024). Physiological responses and lipid accumulation of freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* under short-term zinc stress in water solution. *Algal Research* 80: 103528.

Xie Z, Pei H, Zhang L, Yang Z, Nie C, Hou Q, Yu Z (2020). Accelerating lipid production in freshwater alga *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 by seawater and ultrasound during the stationary phase. *Renew Energy* 161: 448-456.

Yun CJ, Hwang KO, Han SS, Ri HG (2019). The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and bioenergy* 127: 105277.

RESEARCH ON SELECTING OPTIMAL CULTURE CONDITIONS FOR ENHANCING LIPID ACCUMULATION OF GREEN MICROALGA *Chlorella sorokiniana* FOR BIOFUEL PRODUCTION

Nguyen Minh Chau³, Le Thi Thom¹, Nguyen Cam Ha¹, Le Anh Huy¹, Nguyen Manh Dat¹, Ngo Thi Hoai Thu¹, Nguyen Thi Thu Trang³, Tran Thi Lien³, Vu Thi Thu Ha³, Dang Diem Hong^{1,2*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

³National Key Laboratory for Petrochemical Refinery Technologies, Vietnam Institute of Industrial Chemistry

SUMMARY

Chlorella is a fast-growing green microalga genus with a high lipid accumulation capacity within cells, regarded as a self-defense mechanism against adverse culture conditions. The cultivation of this algal genus using two-stage cultivation technology is a globally focused research project to achieve high algal biomass and lipid content for biofuel production. This study presents research results on the effects of culture conditions on the growth and lipid accumulation of *Chlorella sorokiniana* during the second stage. After 4 days of culture at the optimum conditions (i.e., BG-11 medium containing NaNO₃ 3 g/L, glucose 10 g/L, temperature 28-30°C, light intensity 40-100 μmol/m²s, pH 7) in the first stage, *C. sorokiniana* achieved the highest growth and transitioned to the second-stage cultivation. Obtained results from the second stage cultivation revealed that supplementing the cultivation medium with 30 g/L NaCl, 6 g/L NaHCO₃ under a light intensity of 150 μmol/m²s led to *C. sorokiniana* achieving the highest dry cell weight (DCW) and lipid content of 2.12 ± 0.06 g/L and 35.8% DCW, respectively. The predominant fatty acids in biomass were C16:0 (19.20% of total fatty acids -TFA), C16:1 (17.25% TFA), C18:2 (28.25% TFA), C18:3 (26.41% TFA). The results indicated that *C. sorokiniana* biomass is a potential feedstock for high-quality biofuel production. Based on the degree of unsaturation, the evaluation of biodiesel quality from the fatty acid composition of *C. sorokiniana* biomass cultured in two-stage mixotrophic conditions has shown that biodiesel is predicted to reach 4 out of 5 parameters according to U.S. and European standards on biodiesel (B100), showing potential for practical applications.

Keywords: *Chlorella sorokiniana*, BG-11, biofuel, culture conditions, green microalgae, two-stage cultivation.

* Author for correspondence: Tel: 02437911059; ddhong60vn@yahoo.com (Prof. Dr. Dang Diem Hong)