

Bài báo nghiên cứu**HIỆU QUẢ KEO TỤ VI TẢO *DUNALIELLA SALINA* BẰNG CHITOSAN****Võ Hồng Trung*, Phạm Thị Ngọc Dung, Nguyễn Thị Hồng Phúc***Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam***Tác giả liên hệ: Võ Hồng Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com**Ngày nhận bài: 23-12-2021; ngày nhận bài sửa: 25-3-2022; ngày duyệt đăng: 27-3-2022***TÓM TẮT**

Dunaliella salina là vi tảo biển lục đơn bào, nhân thực, một nguồn sinh khối đầy hứa hẹn để sản xuất mỹ phẩm, dược phẩm và nhiên liệu sinh học. Tế bào có kích thước nhỏ và khả năng tổng hợp lượng lớn các carotenoid, đặc biệt là β -caroten trong các điều kiện ức chế. Thu hoạch *D. salina* A9 sử dụng chất keo tụ Chitosan với những nồng độ từ 65-85 mg/L và pH từ >6.5 đến >8.5 được nghiên cứu nhằm đánh giá sự keo tụ và hiệu quả thu hoạch *D. salina* trong nuôi cấy qui mô pilot ở Việt Nam. Kết quả cho thấy, nồng độ chitosan 85 mg/L và pH > 8.5 đạt hiệu quả keo tụ *D. salina* A9 cao hơn so với nồng độ chitosan và pH thấp. Tương tự, hiệu suất keo tụ tế bào vi tảo ở nồng độ chitosan 85 mg/L và pH > 8.5 đạt hiệu quả cao nhất với 94,19%.

Từ khóa: chitosan; *Dunaliella salina*; phương pháp keo tụ

1. Giới thiệu

Ngày nay, các sinh vật đơn bào, vi tảo, là một nguồn sinh khối hấp dẫn do năng suất cao và chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học ứng dụng làm chất phụ gia thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm, thức ăn gia súc và nhiên liệu tái tạo. Nuôi trồng, thu hoạch sinh khối và chiết tách để sản xuất các nguyên liệu mong muốn là những bước quan trọng trong quá trình sản xuất vi tảo (Tork, Khalilzadeh, & Kouchakzadeh, 2017). Trong đó, việc thu hoạch vi tảo gặp phải những hạn chế bao gồm nồng độ thấp trong môi trường nuôi cấy và kích thước nhỏ với hầu hết là điện tích âm trên bề mặt tế bào tảo, điều này là một trong những cản trở ảnh hưởng đến việc mở rộng và nhân rộng sản xuất vi tảo (Matter, Darwesh, & Eida, 2018; Tork et al., 2017). Vì vậy, việc thu hoạch sinh khối tảo từ môi trường nuôi cấy lỏng là một nút thắt lớn đối với sản xuất nhiên liệu sinh học một cách tiết kiệm khi sử dụng vi tảo làm nguyên liệu chế biến. Người ta ước tính rằng chi phí của quá trình thu hoạch chiếm tới 20-30% tổng chi phí sản xuất sinh khối, chiếm tổng cộng khoảng 50% chi phí sản xuất dầu cuối cùng (Low & Lau, 2017).

Cite this article as: Vo Hong Trung, Pham Thi Ngoc Dung, & Nguyen Thi Hong Phuc (2022). The flocculation efficiency of microalga *Dunaliella salina* using Chitosan. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(3), 458-465.

Có rất nhiều chất tạo keo tụ đã được nghiên cứu như muối vô cơ như sắt clorua (FeCl_3) và nhôm sulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) hoặc các polymer hữu cơ. Mặt khác, vật liệu sinh học tự nhiên có thể được sử dụng làm chất keo tụ bao gồm chitosan tạo màng sinh học, thường xuất phát từ quá trình khử chitin từ vỏ cua và tôm và poly (acid γ -glutamic), một sản phẩm ngoại bào từ *Bacillus subtilis*. Các kỹ thuật hiện đại liên quan đến việc tạo ra các vật liệu mới như hạt nano, hạt từ tính, polymer cation, vật liệu tổng hợp polymer, và thậm chí cả sự kết hợp của những vật liệu này. Muối vô cơ có nhược điểm là làm ô nhiễm sinh khối thu hoạch, khiến chúng không thích hợp cho động vật và con người tiêu thụ (Chua et al., 2019). Do đó, việc lựa chọn phương pháp thu hoạch phù hợp, hiệu quả và tiết kiệm theo quy mô sinh khối sắp thu hoạch có thể giảm tổng chi phí sản xuất. Phương pháp được chọn phải có thể giữ cho môi trường vi tảo không bị nhiễm các hợp chất độc hại (Tork et al., 2017).

Trong đó, các polymer tự nhiên điển hình như chitosan là một sự thay thế đầy tiềm năng để giải quyết những thách thức này (Rashid, Rehman, & Han, 2013). Chitosan ngày càng trở nên quan trọng như một chất tạo màng sinh học tự nhiên do sự kết hợp độc đáo của nó với các đặc tính như khả năng phân hủy sinh học, khả năng tương thích sinh học, khả năng tái tạo, hoạt tính sinh học và khả năng chấp nhận sinh thái. Chitosan là chất hữu cơ tự nhiên polyelectrolyt có trọng lượng phân tử cao, mật độ điện tích cao và đang được sử dụng rộng rãi trong xử lý nước. Nó có một điện tích dương thuần cho phép hấp thụ mạnh mẽ vi sinh vật bao gồm cả vi tảo tích điện âm. Với những tính năng này, chitosan được coi là chất kết tụ tiềm năng có thể được sử dụng để thu hoạch sinh khối vi tảo, giảm phí và tăng chất lượng thu hoạch sinh khối vi tảo (Trang et al., 2016).

Nghiên cứu về khả năng keo tụ của chitosan đối với 5 loài vi tảo biển có tầm quan trọng đối với nghề nuôi trồng thủy sản (*Skeletonema costatum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira nordenskoldii*, *Chlorella* sp. và *Thalassionema* sp.). Kết quả cho thấy, ở điều kiện bình thường trong môi trường nước biển nhân tạo, nếu không kiểm soát pH, hiệu suất keo tụ đạt 100% ở nồng độ chitosan khá cao (trên 40 mg/L). Khi pH được điều chỉnh về khoảng 7,8-8,0, hiệu suất keo tụ đạt 100% với nồng độ chitosan từ 40 mg/L trở lên. Tuy nhiên, khi pH được điều chỉnh về khoảng 7 hoặc thấp hơn, nồng độ chitosan cần thiết để đạt được hiệu suất keo tụ 95-100% đã giảm xuống còn 20 mg/L đối với *Chlorella* và 2 mg/L đối với *S. costatum* (Morales, de la Noüe, & Picard, 1985).

Dunaliella là vi tảo lục đơn bào, có hình trứng, hình êlip, hình trụ, hình quả lê, hoặc hình cầu tùy theo các giai đoạn tăng trưởng cũng như môi trường dinh dưỡng khác nhau trong nuôi cấy, kích thước rộng 4-15 μm và dài 6-25 μm (Butcher, 1959). *Dunaliella* là một trong những loài tảo lục chịu mặn có thể sản xuất và tích lũy ba sản phẩm có giá trị cao về thương mại là glycerol, β -carotene và acid béo (Ben-Amotz, 2019). Đặc biệt, *D. salina* được nuôi cấy trong điều kiện ức chế khác nhau tăng sản xuất carotene (10% trọng lượng khô) và

dịch trích chứa carotene này có hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và chống ung thư cao (Singh, Baranwal, & Reddy, 2016). Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành để xác định điều kiện keo tụ *D. salina* hiệu quả sử dụng polymer sinh học Chitosan, góp phần ứng dụng vào thực tiễn nuôi cấy thu nhận sinh khối *D. salina* tại Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. *Chủng Dunaliella salina*

D. salina A9 phân lập từ mẫu thu thập ở vùng ruộng muối Vĩnh Hảo, Bình Thuận được sử dụng để nuôi cấy và thu nhận bằng phương pháp keo tụ với Chitosan.

2.2. Các phương pháp phân tích

2.2.1. Xác định mật độ tế bào

Lấy 100 μ L dịch tảo được cố định bởi dung dịch Lugol (5% Iod và 10% muối KI). Mật độ tế bào được xác định bằng cách đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu mỗi 2-3 ngày, sử dụng kính hiển vi quang học với buồng đếm có độ sâu 0,1 mm và diện tích ô vuông 1mm^2 . Mật độ tế bào trong 1 mL được tính theo công thức (Guillard & Sieracki, 2005):

$$D = \frac{n}{i} \times 10^4 \times \text{hệ số pha loãng}$$

Trong đó:

n: tổng số tế bào đếm được

i: diện tích ô đếm

D: mật độ tế bào (tế bào/mL).

2.3. Sự keo tụ *Dunaliella salina* bằng Chitosan

D. salina được nuôi cấy trên môi trường MD4 1,5M NaCl và được thu hoạch sau 2-3 tuần tăng trưởng để tiến hành thí nghiệm.

Pha dung dịch mẹ chitosan (chitosan được cung cấp bởi Công ty cổ phần đầu tư S-Green Việt Nam): Hòa tan 5g/l chitosan trong 0,04M HCl (36,46%) và khuấy dung dịch bằng máy khuấy từ trong vòng 2 giờ (Blockx, Verfaillie, Thielemans, Muylaert, & Engineering, 2018).

Sự keo tụ của *Dunaliella salina* được thử nghiệm với 3 nồng độ chitosan là 65 mg/L, 75 mg/L, 85 mg/L. Các thí nghiệm được thực hiện trong cốc có mỏ 250 mL, chitosan từ dung dịch mẹ bổ sung vào dịch nuôi cấy vi tảo để đạt tổng thể tích là 100mL với các nồng độ chitosan 65 mg/L, 75 mg/L, 85 mg/L. Sau đó đem cho trộn bằng máy khuấy từ, pH được điều chỉnh qua ba mức là pH>6.5, pH>7.5, pH>8.5 thông qua việc bổ sung NaOH 1M hay HCl 1M. Tiếp đó các dung dịch tảo trên được cho vào bình lắng gạn để lắng sau 1 ngày và thu hoạch vi tảo.

2.4. Xác định hiệu suất keo tụ

Hiệu suất keo tụ hay phần trăm sinh khối được loại bỏ khỏi môi trường nuôi cấy trong thí nghiệm được xác định dựa trên mật độ tế bào trước và sau keo tụ bằng công thức sau:

$$\text{Hiệu suất keo tụ (\%)} = \left(\frac{B-A}{B} \right) \times 100$$

Trong đó:

A: số lượng tế bào (tế bào/ml) sau keo tụ bằng chitosan

B: số lượng tế bào (tế bào/ml) dịch vi tảo ban đầu.

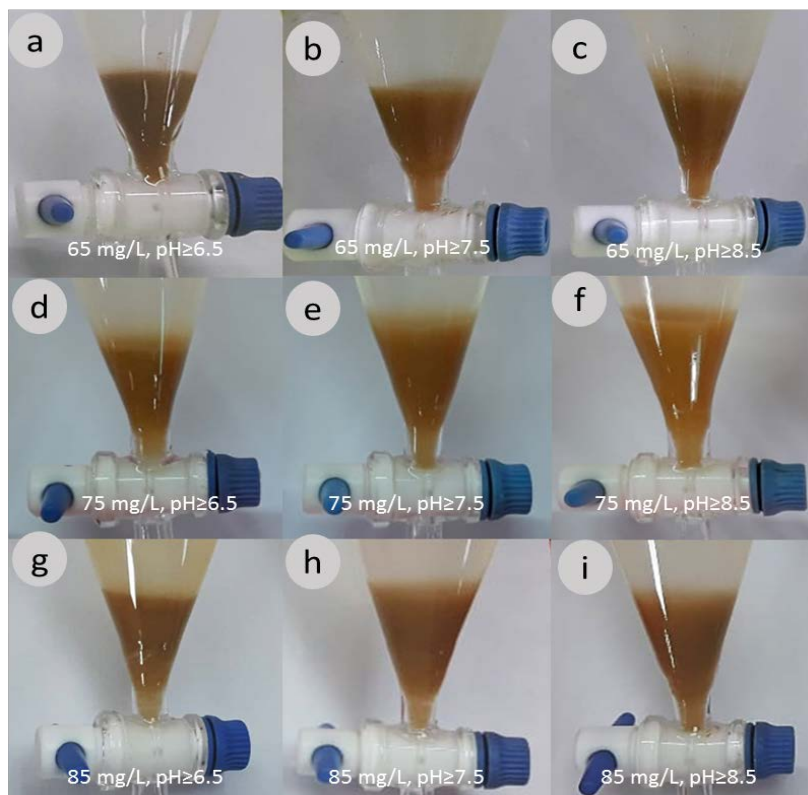
2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Microsoft office Excel 2013 và phân tích one way ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với sai số ý nghĩa $p < 0,05$. Tất cả các nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Sự keo tụ của Chitosan ở các pH khác nhau đối với vi tảo *Dunaliella salina*

Ảnh hưởng của pH đến quá trình keo tụ chitosan trong nước biển là do pH ảnh hưởng đến điện tích của các nhóm amin nên nó có ảnh hưởng quan trọng đến tính chất keo tụ của chitosan. Trong khoảng pH 6.5, sự keo tụ được hình thành tương đối chậm và cần xuất hiện ít, nên bề mặt mặt dung dịch vẫn còn sắc tố của tảo lơ lửng trong môi trường nuôi cấy. Trong khi đó, sự keo tụ quan sát được rõ tăng cao khi tăng nồng độ chitosan lên 75 mg/L và 85 mg/L ở pH cao (> 7.5) cùng với đó thời gian lắng nhanh xuất hiện ở đáy bình lắng gạn (Hình 1). Các kết quả này chỉ ra rằng chitosan thực sự có thể được sử dụng để tạo bông vi tảo trong môi trường nước biển, nhưng độ pH tương đối cao (7.5-10) là cần thiết so với độ pH thấp trong môi trường nước ngọt (pH < 7.5) (Blockx et al., 2018). Theo Augustine và cộng sự (2019), hiệu quả keo tụ của các chất chủ yếu phụ thuộc vào đặc tính của loài vi tảo, như thành phần thành tế bào, kích thước, tuổi nuôi, thành phần môi trường tăng trưởng và độ pH. Khả năng tương thích của chất keo tụ đối với việc thu hoạch quy mô lớn các loài vi tảo chủ yếu phụ thuộc vào lượng chất keo tụ cần thiết và độ pH để mang lại hiệu quả keo tụ mong muốn (Augustine, Tanwar, Tremblay, & Kumar, 2019).



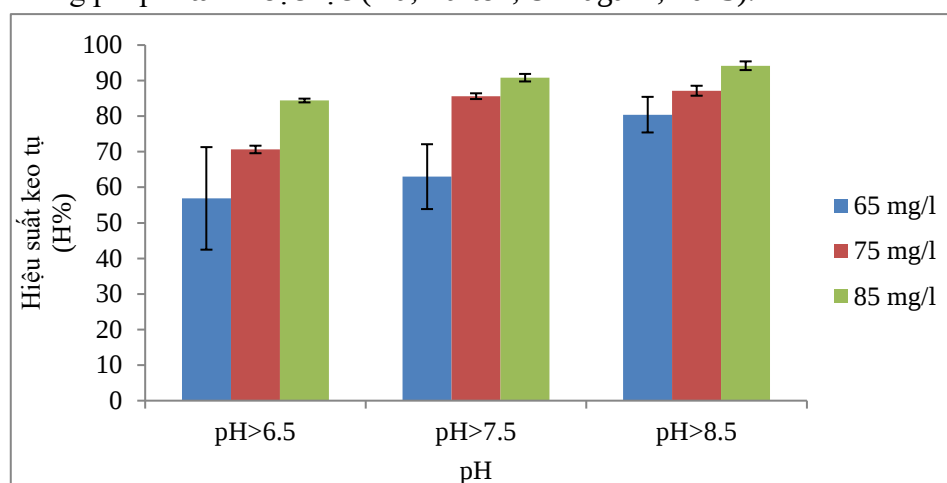
Hình 1. Nồng độ chitosan tương ứng với từng pH: (a) 65mg/L, $pH \geq 6.5$; (b) 65mg/L, $pH \geq 7.5$; (c) 65mg/L, $pH \geq 8.5$; (d) 75mg/L, $pH \geq 6.5$; (e) 75mg/L, $pH \geq 7.5$; (f) 75mg/L, $pH \geq 8.5$; (g) 85mg/L, $pH \geq 6.5$; (h) 85mg/L, $pH \geq 7.5$; (i) 85mg/L, $pH \geq 8.5$

3.2. Hiệu suất keo tụ của Chitosan đối với vi tảo *Dunaliella salina*

Với nồng độ chitosan là 65mg/L ở cả 3 pH khác nhau là >6.5 , >7.5 , >8.5 cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa ($p > 0,05$). Tương tự với nồng độ chitosan là 75mg/L và 85mg/L ở pH >6.5 không có sự thay đổi rõ rệt ($p > 0,05$), còn từ pH >7.5 và pH >8.5 ở hai nồng độ trên có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$). Tóm lại, với nồng độ chitosan > 75 mg/L cùng với điều kiện pH >7.5 cho đạt hiệu suất cao có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) để thu hoạch vi tảo. Trong đó, với nồng độ chitosan 85 mg/L và pH >8.5 cho đạt hiệu suất tủa tối ưu nhất (Hình 2 và Bảng 1). Mặt khác, khi tủa dung dịch tảo *D. salina* ở nồng độ muối cao từ 3M NaCl trở lên với nồng độ chitosan là 85 mg/L ở pH >8.5 thì lại không tủa được do lượng muối chứa trong sinh khối quá nhiều. Bởi vì chitosan có mật độ điện tích cation cao, và do đó có thể hấp thụ mạnh các tế bào vi tảo tích điện âm trên bề mặt của nó thông qua cầu nối polyme và trung hòa điện tích (Zhu, Li, & Hiltunen, 2018). Ảnh hưởng của pH đến quá trình keo tụ Chitosan trong nước biển do pH ảnh hưởng đến điện tích trên các nhóm amin nên nó có ảnh hưởng quan trọng đến tính chất keo tụ của chitosan. Ở pH thấp ($<7,5$), các nhóm amin của chitosan được proton hóa (một phần) và do đó tích điện dương, dẫn đến tương tác với các tế bào vi tảo tích điện âm và keo tụ theo cơ chế trung hòa điện tích và / hoặc cơ chế bắc cầu. Vì quá trình keo tụ trong nước biển xảy ra ở pH cao khi không có/ ít

điện tích trên polymer chitosan, nên quá trình keo tụ phải xảy ra thông qua một cơ chế khác. Hiện tượng này được gọi là tái ổn định phân tán và gây ra bởi sự đảo ngược điện tích bề mặt của tế bào vi tảo do sự hấp thụ cation chitosan trên bề mặt tế bào. Khi sử dụng chitosan trong môi trường nước biển trong nghiên cứu này, hiệu quả keo tụ vẫn cao khi vượt quá liều tối ưu và không xảy ra quá trình tái tạo phân tán. Điều này cũng chỉ ra cơ chế keo tụ khác của chitosan trong nước biển khi so sánh với nước ngọt (Blockx et al., 2018).

Theo Xu và cộng sự (2013), hiệu suất keo tụ đối với vi tảo *Chlorella sorokiniana* có thể đạt trên 99% ở pH < 7. Nồng độ chitosan tối ưu (xấp xỉ 10 mg/g trọng lượng khô tảo) được xác định chủ yếu bằng mật độ tế bào hơn là tuổi tế bào, hàm lượng lipid hoặc thành phần của môi trường. Chi phí cho quá trình thu hoạch vi tảo bằng chitosan cho giá thành thấp hơn so với phương pháp li tâm hoặc lọc (Xu, Purton, & Baganz, 2013).



Hình 2. Hiệu suất keo tụ của *D. salina* xử lý bằng chitosan với ba nồng độ khác nhau dưới tác động của ba pH khác nhau

Bảng 1. Hiệu suất keo tụ *D. salina* bằng chitosan với ba nồng độ và pH khác nhau

Nồng độ chitosan	Hiệu suất keo tụ (H%)		
	pH>6.5	pH>7.5	pH>8.5
65 mg/L	56,881 ± 14,419 ^{1a}	62,997 ± 9,118 ^{1a}	80,428 ± 5,006 ^{1a}
75 mg/L	70,642 ± 1,059 ^{1a}	85,627 ± 0,809 ^{12b}	87,156 ± 1,401 ^{12b}
85 mg/L	84,404 ± 0,530 ^{1a}	90,826 ± 1,059 ^{2b}	94,190 ± 1,223 ^{2b}

4. Kết luận

Sự keo tụ của vi tảo *D. salina* A9 ảnh hưởng bởi nồng độ chitosan và pH môi trường. Trong đó, với nồng độ Chitosan là 85 mg/L và pH ≥ 8.5 đạt được hiệu suất keo tụ cao nhất. Qua đó việc sử dụng chitosan một chất polymer không độc hại vừa tiết kiệm chi phí vừa hiệu quả trong việc keo tụ vi tảo.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Augustine, A., Tanwar, A., Tremblay, R., & Kumar, S. (2019). Flocculation processes optimization for reuse of culture medium without pH neutralization. *Algal Research*, 39, 101437.
- Ben-Amotz, A. (2019). Bioactive compounds: glycerol production, carotenoid production, fatty acids production. *The Alga Dunaliella, Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*, 189-207.
- Blockx, J., Verfaillie, A., Thielemans, W., Muylaert, K. J. A. S. C., & Engineering (2018). Unravelling the mechanism of chitosan-driven flocculation of microalgae in seawater as a function of pH, 6(9), 11273-11279.
- Butcher, R. (1959). An undescribed species of *Dunaliella* from the Cambridge collection of algae. *Hydrobiologia*, 12(4), 249-250.
- Chua, E. T., Eltanahy, E., Jung, H., Uy, M., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. J. G. C. (2019). Efficient Harvesting of *Nannochloropsis* Microalgae via Optimized Chitosan-Mediated Flocculation, 3(1), 1800038.
- Guillard, R. R., & Sieracki, M. S. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. *Algal culturing techniques*, 239-252.
- Low, Y., & Lau, S. W. (2017). *Effective flocculation of Chlorella vulgaris using chitosan with zeta potential measurement*. Paper presented at the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.
- Matter, I. A., Darwesh, O. M., & Eida, M. F. J. J. O. B. S. (2018). Harvesting of *Scenedesmus obliquus* by Bioflocculation: Appropriate Chitosan Concentrations with Various pH Values at Different Growth Stages, 11(5).
- Morales, J., de la Noüe, J., & Picard, G. (1985). Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. *Aquacultural Engineering*, 4(4), 257-270. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(85\)90018-4](https://doi.org/10.1016/0144-8609(85)90018-4)
- Rashid, N., Rehman, S. U., & Han, J.-I. J. P. B. (2013). Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan, 48(7), 1107-1110.
- Singh, P., Baranwal, M., & Reddy, S. M. (2016). Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharm Biol*, 54(10), 2269-2275. doi:10.3109/13880209.2016.1153660
- Tork, M. B., Khalilzadeh, R., & Kouchakzadeh, H. J. B. t. (2017). Efficient harvesting of marine *Chlorella vulgaris* microalgae utilizing cationic starch nanoparticles by response surface methodology, *Biotechnol Biofuels*, 243, 583-588.
- Trang, S. T., Nguyen, T. K. H., Nguyen, C. M., Tran, T. L. T., & Nguyen, T. H. (2016). Optimization of Harvesting of Microalgal *Thalassiosira pseudonana* Biomass Using Chitosan Prepared from Shrimp Shell Waste. *Asian Journal of Agricultural Research*, 10, 162-174
- Xu, Y., Purton, S., & Baganz, F. (2013). Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource technology*, 129, 296-301.
- Zhu, L., Li, Z., & Hiltunen, E. J. B. f. b. (2018). Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. *Biotechnol Biofuels*, 11(1), 183.

**THE FLOCCULATION EFFICIENCY
OF MICROALGA *DUNALIELLA SALINA* USING CHITOSAN**

Vo Hong Trung*, Pham Thi Ngoc Dung, Nguyen Thi Hong Phuc

Nguyen Tat Thanh University, Vietnam

*Corresponding author: Vo Hong Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Received: December 23, 2021; Revised: March 25, 2022; Accepted: March 27, 2022

ABSTRACT

Dunaliella salina, a unicellular, eukaryotic marine green microalgae, is a promising source of biomass for the production of cosmetics, pharmaceuticals, and biofuels. The cells are generally small in size and can synthesize large amounts of carotenoids, especially β -carotene pigments under different stress conditions. Harvesting *D. salina* A9 by using Chitosan flocculation with concentrations of 65-85 mg/L and pH values from > 6.5 to > 8.5 was used to evaluate the flocculation efficiency of the microalga in a pilot-scale in Vietnam. The results showed that the Chitosan concentration of 85 mg/L and pH > 8.5 obtained higher flocculation of *D. salina* A9 than low conditions. Similarly, the flocculation efficiency of microalgae at 85 mg/L of chitosan concentration and pH > 8.5 was highest with 94.19%.

Keywords: chitosan; *Dunaliella salina*; flocculation method