

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trịnh Thị Hiền

**NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH SINH
HỌC CỦA POLYSACCHARIDE NGOẠI BÀO TỪ VI TẢO LỤC
Chlorella sorokiniana ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG LÀM THỰC PHẨM
BẢO VỆ SỨC KHỎE CHO NGƯỜI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trịnh Thị Hiền

**NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH SINH
HỌC CỦA POLYSACCHARIDE NGOẠI BÀO TỪ VI TẢO LỤC
Chlorella sorokiniana ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG LÀM THỰC PHẨM
BẢO VỆ SỨC KHỎE CHO NGƯỜI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS. TS. Đặng Diễm Hồng

2. TS. Đinh Thị Thu Hằng

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật

Hà Nội, ngày 22 tháng 06 năm 2026

Tác giả luận văn



Trịnh Thị Hiền

LỜI CẢM ƠN

Sau quá trình triển khai nghiên cứu, em đã hoàn tất nội dung của luận văn “Nghiên cứu tách chiết và xác định hoạt tính sinh học của polysaccharides ngoại bào từ vi tảo lục *Chlorella sorokiniana* định hướng ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người”. Luận văn này được hoàn thiện không chỉ nhờ sự cố gắng của cá nhân em, mà còn nhờ sự đồng hành và giúp đỡ nhiệt tình của các cá nhân cũng như tập thể liên quan.

Lời đầu tiên, em xin trân trọng gửi lời cảm ơn sâu sắc tới GS. TS. Đặng Diễm Hồng, nhóm Công nghệ tảo, phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và TS. Đinh Thị Thu Hằng - Trưởng phòng Phòng đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình hướng dẫn, cung cấp định hướng nghiên cứu và tạo mọi điều kiện thuận lợi để em hoàn thành luận văn này.

Em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo cùng toàn thể giảng viên Khoa Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, những người đã tận tâm giảng dạy và truyền đạt cho em những tri thức quý báu trong suốt thời gian học tập.

Đồng thời, em xin bày tỏ sự biết ơn chân thành tới Ban Lãnh đạo phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam cùng toàn thể cán bộ nhóm Công nghệ tảo, Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Sinh học (TS. Lê Thị Thơm; TS. Nguyễn Cẩm Hà, ThS. Nguyễn Mạnh Đạt...) đã dành nhiều sự hỗ trợ quý báu cho em trong quá trình thực hiện luận văn.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến đề tài “Nghiên cứu phát triển công nghệ và đánh giá hiệu quả kinh tế quy trình nuôi trồng, thu nhận protein đơn bào, axit béo omega-3-6-7-9 và các sản phẩm khác có giá trị gia tăng từ các loài vi tảo *Schizochytrium*, *Chlorella* và *Spirulina* ứng dụng làm thực phẩm cho con người, thức ăn chăn nuôi”, mã số: NĐT/ITA/24/05, Nghị định thư Việt Nam - Cộng hòa Ý, Bộ Khoa học và Công nghệ do GS. TS. Đặng Diễm Hồng làm chủ nhiệm đã hỗ trợ kinh phí, cung cấp điều kiện cần thiết và cho phép em khai thác các kết quả nghiên cứu để phục vụ cho luận văn.

Sau cùng, em bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới gia đình và bạn bè, những người đã luôn ủng hộ, khích lệ và là điểm tựa tinh thần vững chắc cho em trong

suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn nói chung cũng như cảm ơn chân thành tới tập thể lớp BIO2024A nói riêng, đã quan tâm, hỗ trợ và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp em hoàn thành công việc trong thời gian qua.

Hà Nội, ngày 22 tháng 06 năm 2026

Tác giả luận văn

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Trinh Thi Hien', with a horizontal line underneath.

Trịnh Thị Hiền

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	iv
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	viii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Giới thiệu về vi tảo.....	4
1.2. Tổng quan về <i>Chlorella sorokiniana</i> DDH	5
1.2.1. Ứng dụng của vi tảo.....	6
1.2.2. Nuôi trồng vi tảo.....	8
1.2.4. Tình hình nghiên cứu đối với chi <i>Chlorella</i>	9
1.3. Polysaccharide ngoại bào (Extracellular polysaccharides - EPSs)	11
1.3.1. Giới thiệu chung về EPSs.....	11
1.3.2. EPSs từ vi tảo.....	12
1.3.3. Con đường sinh tổng hợp EPSs từ vi tảo.....	12
1.3.4. Hoạt tính sinh học của EPSs.....	17
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	20
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	20
2.1.1. Đối tượng.....	20
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị.....	20
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	21
2.2.1. Phương pháp xác định sinh trưởng bằng số lượng tế bào được đếm bằng buồng đếm Burker - Turk.....	21
2.2.2. Phương pháp xác định sinh trưởng bằng khối lượng khô.....	22
2.2.3. Phương pháp tách chiết EPSs từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH	22
2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng EPSs từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH	22
2.2.5. Phương pháp xác định hàm lượng lipid, protein, carotenoit	23
2.2.6. Phương pháp chụp ảnh hình thái bề mặt của EPSs bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy - SEM)	23
2.2.7. Phương pháp xác định đặc điểm của EPSs bằng thông qua đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier	24

2.2.8. Xác định hoạt tính chống ô xy hóa bằng trung hòa gốc tự do bằng DPPH.....	24
2.2.9. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào khác nhau.....	24
2.3. Bố trí thí nghiệm.....	25
2.4. Xử lý số liệu.....	27
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	28
3.1. Lựa chọn môi trường nuôi và nghiên cứu điều kiện môi trường nuôi thích hợp cho sinh trưởng và tích lũy EPSs cao ở <i>C. sorokiniana</i> DDH	28
3.2. Lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp trong môi trường Endo.....	30
3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon.....	30
3.2.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ.....	31
3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N.....	32
3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	34
3.2.5. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng.....	36
3.3. Nhân nuôi và xác định thành phần dinh dưỡng của <i>C. sorokiniana</i> DDH	38
3.4. Tách chiết EPSs từ dịch nuôi loài <i>C. sorokiniana</i> DDH	40
3.5. Quan sát hình thái và cấu trúc bề mặt của EPSs tách chiết được bằng kính hiển vi điện tử quét.....	40
3.6. Đặc điểm của EPSs thu được từ <i>C. sorokiniana</i> DDH thông qua phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier	43
3.7. Hoạt tính chống oxy hóa của EPSs thu được từ môi trường nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH.....	44
3.8. Hoạt tính gây độc tế bào của EPSs thu từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH trên các dòng tế bào khác nhau.....	45
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	51
PHỤ LỤC.....	60

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	
EPSs	Extracellular polysaccharides	Polysaccharides ngoại bào
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	
MĐTĐB		Mật độ tế bào
OD	Optical density	Mật độ quang
PUFAs	Polyunsaturated Fatty Acids	Axit béo không bão hòa đa nối đôi
ROS	Reactive Oxygen Species	Các gốc tự do (ROS)
SEM	Scanning Electron Microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
SKK		Sinh khối khô
TCA	Trichloroacetic acid	
VAST	Vietnam Academy of Science and Technology	Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Sinh trưởng và thành phần dinh dưỡng trong sinh khối và dịch nuôi của <i>C. sorokiniana</i> DDH nuôi trồng được sau 5 ngày nuôi cấy	38
---	----

DANH MỤC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ

Hình 2.1. Hình ảnh minh họa hình thái <i>C. sorokiniana</i> DDH.....	20
Hình 3.1. Sinh trưởng (A) và hàm lượng EPSs (B) của <i>C. sorokiniana</i> DDH nuôi trồng trong các môi trường khác nhau.....	28
Hình 3.2. Ảnh minh họa nhân nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH trong 3 môi trường gồm: Endo, MTC và BG-11.....	30
Hình 3.3. Sinh trưởng (A) và hàm lượng EPSs (B) từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH trong các nguồn cacbon khác nhau.....	30
Hình 3.4. Sinh trưởng (C) và hàm lượng EPSs (D) từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH được nuôi trồng trong các nguồn nito khác nhau.....	32
Hình 3.5. Sinh trưởng (E) và hàm lượng EPSs (F) từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH được nuôi trồng trong các tỷ lệ C/N khác nhau.....	33
Hình 3.6. Sinh trưởng (G) và hàm lượng EPSs (H) từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH được nuôi trồng dưới các điều kiện nhiệt độ khác nhau	35
Hình 3.7. Sinh trưởng (I) và hàm lượng EPSs (K) từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH được nuôi trồng dưới các điều kiện cường độ ánh sáng khác nhau.	36
Hình 3.8. Hình ảnh minh họa một số quá trình thí nghiệm khảo sát các điều kiện nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH	38
Hình 3.9. Một số hình ảnh minh họa một số quá trình thí nghiệm khảo sát các điều kiện nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH	40
Hình 3.10. Hình ảnh minh họa cho quá trình tách chiết EPSs từ vi tảo lục <i>C. sorokiniana</i> DDH	41
Hình 3.11. Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) của EPSs được tách chiết từ dịch nuôi của loài <i>C. sorokiniana</i> DDH sau 5 ngày nuôi trồng.....	42
Hình 3.12. Hình ảnh phổ FTIR của EPSs thu được từ dịch nuôi trồng <i>C. sorokiniana</i> DDH.....	44
Hình 3.13. Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH(%) (A) và giá trị IC ₅₀ (mg/mL) (B) của EPSs thu được từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH	45
Hình 3.14. Phần trăm ức chế tế bào (%) của EPSs thu được từ dịch nuôi <i>C. sorokiniana</i> DDH trên các dòng tế bào khác nhau.	46

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, nhu cầu khai thác các sản phẩm sinh học có nguồn gốc tự nhiên và thân thiện với môi trường đang tăng đáng kể, một phần do sự chuyển dịch toàn cầu hướng đến mô hình kinh tế sinh học tuần hoàn và giảm thiểu sử dụng nguyên liệu hóa thạch. Một trong số đó, polysaccharide ngoại bào (Extracellular polysaccharides - EPSs) ngày càng nhận được sự chú ý từ các nhà khoa học. Các EPSs có cấu trúc phức tạp, được tiết ra trong quá trình sinh trưởng của vi tảo đóng vai trò bảo vệ tế bào trước các điều kiện bất lợi của môi trường hoặc giúp tăng khả năng bám dính và tương tác sinh học. Với thành phần đa dạng bao gồm các monosaccharide như glucose, galactose, mannose, rhamnose, fucose cùng với các nhóm chức sulfate, carboxyl hoặc acetyl hóa, EPSs từ vi tảo đã được ghi nhận sở hữu nhiều hoạt tính sinh học giá trị như chống oxy hóa, kháng khuẩn, điều hòa miễn dịch, chống viêm cũng như đặc tính tạo gel, nhũ hóa và ổn định trong các lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Tuy nhiên, việc khai thác EPSs từ vi tảo còn một số hạn chế, trong đó nổi bật là hiệu suất sản xuất thường thấp, dẫn đến chi phí thu hồi và tinh sạch cao. Quá trình tổng hợp EPSs của vi tảo chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố môi trường bao gồm ánh sáng, nhiệt độ và điều kiện dinh dưỡng. Nhiều nghiên cứu đã công bố về điều kiện nuôi cấy nhằm tăng năng suất EPSs, bao gồm bất lợi về dinh dưỡng, pH, độ mặn, cường độ ánh sáng. Để có thể tách chiết - tinh sạch EPSs đạt hiệu suất cao, nhiều phương pháp cho thu hồi và sấy khác nhau cũng đã được công bố nhằm giảm thiểu tiêu thụ dung môi và năng lượng. Việc sản xuất EPSs cần kết hợp với thu hồi CO₂ và khai thác đồng thời các hợp chất có giá trị cao hơn như lipid, protein, sắc tố... nhằm giảm chi phí sản xuất.

Mỗi loài tảo có đặc điểm sinh lý và đặc điểm dinh dưỡng khác nhau. *Arthrospira (Spirulina) platensis* là loài vi khuẩn lam giàu dinh dưỡng được nuôi trồng trên quy mô công nghiệp và bán công nghiệp trên phạm vi toàn cầu bao gồm cả ở Việt Nam, được công bố là hàm lượng EPSs rất thấp so với các loài vi tảo khác. Trong khi đó, vi tảo lục nước ngọt *Chlorella sorokiniana* có sinh trưởng nhanh, khả năng chịu stress tốt và có hàm lượng EPSs cao khi điều kiện nuôi bất lợi về nhiệt độ, pH, thiếu hụt nitơ hoặc tăng độ mặn, có hoạt tính chống đông máu, chống oxy hóa mạnh được ứng dụng trong lĩnh vực dược phẩm và mỹ phẩm. Khác biệt hoàn toàn so với hai loài trên, *Schizochytrium*

mangrovei là chủng vi tảo biển dị dưỡng, sinh trưởng nhanh, có hàm lượng lipid, các axit béo không bão hòa đa nối nối (Polyunsaturated Fatty Acid-PUFAs) dạng omega 3-6 cao. Các chủng thuộc chi *Schizochytrium* thường tiết EPSs với hàm lượng cao, có cấu trúc đặc biệt và hoạt tính sinh học cao khi được nuôi trong điều kiện dị dưỡng giàu glucose hoặc stress dinh dưỡng. Mặc dù đã có một số nghiên cứu về EPSs đối với vi tảo nhưng số lượng nghiên cứu về tách chiết và đánh giá hoạt tính sinh học của EPSs từ *C. sorokiniana* vẫn còn nhiều hạn chế, đặc biệt là các nghiên cứu hướng đến ứng dụng trong lĩnh vực công nghiệp thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Việc tối ưu hóa quy trình tách chiết, xác định đặc điểm sinh học và hoạt tính sinh học của EPSs từ *C. sorokiniana* được kỳ vọng sẽ góp phần nâng cao hiệu quả khai thác nguồn tài nguyên vi tảo này, đồng thời mở ra hướng ứng dụng bền vững và thân thiện với môi trường.

Xuất phát từ những tiềm năng nghiên cứu và ứng dụng nêu trên, đề tài **“Nghiên cứu tách chiết và xác định hoạt tính sinh học của polysaccharide ngoại bào từ vi tảo lục *Chlorella sorokiniana* định hướng ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người”** được thực hiện nhằm cung cấp các cơ sở khoa học và thực tiễn phục vụ cho việc phát triển các sản phẩm giàu EPSs, góp phần gia tăng giá trị kinh tế của vi tảo và đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về nguồn nguyên liệu sinh học an toàn và hiệu quả.

Mục tiêu của đề tài

Có được điều kiện môi trường nuôi có khả năng sinh tổng hợp cao EPSs, có được điều kiện tách chiết, tinh sạch, thành phần hóa học chính và tác dụng sinh học của EPSs được tách chiết từ dịch nuôi cấy vi tảo lục *C. sorokiniana* theo định hướng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người. Mục tiêu cụ thể của đề tài:

- Khảo sát điều kiện môi trường nuôi tối ưu cho sinh tổng hợp EPSs cao ở vi tảo *C. sorokiniana*;
- Khảo sát điều kiện tách chiết, tinh sạch EPSs từ dịch nuôi cấy *C. sorokiniana*;
- Xác định thành phần hóa học chính của EPSs từ dịch nuôi cấy vi tảo *C. sorokiniana*;

- Đánh giá tiềm năng sinh học theo định hướng ứng dụng của EPSs được tách chiết từ dịch nuôi *C. sorokiniana* làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

Để thực hiện được Mục tiêu nêu trên, một số nội dung nghiên cứu được đặt ra như sau:

- Lựa chọn môi trường và tối ưu hóa điều kiện môi trường nuôi thích hợp cho sinh trưởng và hàm lượng EPSs cao ở *C. sorokiniana*;
- Tách chiết, tinh sạch EPSs từ dịch nuôi cấy *C. sorokiniana*;
- Xác định thành phần hóa học chính của hợp chất EPSs tách chiết được từ môi trường nuôi cấy *C. sorokiniana*;
- Khảo sát hoạt tính sinh học như hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính chống tăng sinh tế bào khối u của EPSs tách chiết được.

Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu về vi tảo

Vi tảo là nhóm sinh vật đơn bào hoặc đa bào có tính đa dạng và phong phú cao, phân bố rộng rãi trong hầu hết các hệ sinh thái như nước ngọt, nước biển, hồ siêu mặn và thậm chí ở các sa mạc và Bắc Cực.... Chúng được chia thành tảo nhân chuẩn và nhân sơ. Chúng chuyển hóa năng lượng ánh sáng và CO₂ thành sinh khối. Cơ chế quang hợp của chúng tương tự như các loài thực vật bậc cao trên cạn, nhưng do cấu trúc đơn giản và chìm trong môi trường nước nơi mà chúng có thể lấy nước, CO₂ và các chất dinh dưỡng khác để chuyển đổi năng lượng mặt trời thành sinh khối hiệu quả hơn. Chúng cũng có thể tận dụng nước ngọt, nước lợ, nước mặn, nước thải để làm nguồn dinh dưỡng. Nhiều loài vi tảo có khả năng sống trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau như: từ quang tự dưỡng sang dị dưỡng hoặc tạp dưỡng. Vi tảo là nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng và đã được nghiên cứu rộng rãi do khả năng dễ thích ứng và phát triển trong nhiều mô hình nuôi, từ các hệ thống kín đến các ao hở, nhằm tối ưu điều kiện nuôi để tăng năng suất sinh khối [1,2].

Vi tảo là nhóm sinh vật có khả năng thích nghi cao và có thể nuôi cấy dưới nhiều điều kiện môi trường khác nhau, bằng các phương pháp nuôi cấy hở (hệ thống ao, hồ) hoặc kín (hệ thống closed photobioreactor-PBRs). Trong điều kiện quang tự dưỡng, vi tảo sử dụng ánh sáng làm nguồn năng lượng và CO₂ làm nguồn cacbon để chuyển hóa thành sinh khối thông qua quá trình quang hợp để tăng trưởng và phát triển bình thường. Vi tảo cần được cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng thiết yếu, trong đó nitơ và phốt pho là hai nguyên tố chính, chiếm khoảng 10 - 20% sinh khối khô (SKK). Ngoài ra, các nguyên tố khoáng đa lượng như Na, Mg, Ca, K cùng với vi lượng như Fe, Zn, B, Mn, Mo, Co cũng đóng vai trò quan trọng trong các hoạt động sinh lý và quá trình trao đổi chất của tế bào tảo [3].

Quá trình sinh trưởng của vi tảo nói chung diễn ra qua nhiều pha sinh trưởng đặc trưng, bao gồm: pha tiềm, pha lũy thừa, pha cân bằng và pha suy thoái. Mỗi loài vi tảo có ngưỡng nhu cầu dinh dưỡng và điều kiện môi trường riêng biệt, tuy nhiên, các yếu tố cốt lõi ảnh hưởng đến sinh trưởng đều xoay quanh: nguồn cacbon (hữu cơ và/hoặc vô cơ), nitơ, phốt pho, ánh sáng, nhiệt độ, pH, độ mặn, oxy hòa tan, CO₂ và các chất vi lượng. Ngoài ra, các yếu tố vận hành như tốc độ khuấy trộn, hình dạng và kích thước hệ thống nuôi, thời

gian thu hoạch và tần suất bổ sung môi trường có thể tác động đáng kể đến năng suất sinh khối và hiệu suất tích lũy các hợp chất sinh học như protein, axit béo PUFAs, EPSs và sắc tố carotenoid [1,4].

1.2. Tổng quan về *Chlorella sorokiniana*

Sự gia tăng dân số toàn cầu, cùng với nhu cầu ngày càng cao về dinh dưỡng và yêu cầu đảm bảo chất lượng dinh dưỡng cũng như an toàn sinh học, đang thúc đẩy mạnh mẽ quá trình tìm kiếm các nguồn nguyên liệu tự nhiên, bền vững cho ngành thực phẩm và chăn nuôi.

Chlorella là chi vi tảo lục đơn bào thuộc giới (Kingdom): Plantae; ngành (division): Chlorophyta; lớp (class): Trebouxiophyceae; bộ (order) Chlorellales; họ (family): Chlorellaceae; chi (genus): *Chlorella*; loài *C. sorokiniana* Shihira & R. W. Krauss 1965 (tên gọi trước là *Chlorella pyrenoidose*) (www.algaebase.org).

Chlorella là một trong những chi vi tảo lục được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi nhất hiện nay. Với thành phần dinh dưỡng phong phú bao gồm protein đơn bào (Single Cell Protein - SCP) chất lượng cao, các axit béo PUFAs dạng omega - 3, 6, 7 và 9, các EPSs có hoạt tính sinh học, cùng các sắc tố carotenoid có khả năng chống oxy hóa mạnh. *Chlorella* không chỉ là nguồn nguyên liệu lý tưởng cho lĩnh vực thực phẩm bổ sung bảo vệ sức khỏe, mà còn được xem là phụ gia tiềm năng trong thức ăn chăn nuôi [3]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy sinh khối *Chlorella* có thể giúp cải thiện hệ vi sinh đường ruột, tăng khả năng miễn dịch, hỗ trợ chống viêm và chống oxy hóa [5]. Việc bổ sung *Chlorella* vào chế độ ăn của người hoặc động vật có thể góp phần cải thiện sức khỏe tổng thể, tăng cường chuyển hóa lipid, kiểm soát đường huyết và ngăn ngừa một số rối loạn trao đổi chất [6]. Trong lĩnh vực chăn nuôi, *Chlorella* được sử dụng như một nguồn protein thay thế, đồng thời giúp cải thiện tỷ lệ tăng trưởng, nâng cao chất lượng thịt và khả năng đề kháng ở vật nuôi mà không gây tác dụng phụ như kháng sinh tổng hợp [7]. Bên cạnh đó, nhờ khả năng hấp thụ dinh dưỡng từ nước thải hữu cơ và các dòng chất thải công nghiệp, *Chlorella* còn đóng vai trò tích cực trong việc xử lý môi trường kết hợp sản xuất sinh khối [6]. Trong xu thế đó, vi tảo đặc biệt là các loài có tốc độ sinh trưởng cao, thành phần hóa sinh phong phú như *C. sorokiniana* đang thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học như một đối tượng giàu tiềm năng nhờ vào giá trị sinh học cao, khả năng sản xuất sinh khối lớn dưới điều kiện môi

trường nuôi thiếu dinh dưỡng, có tính chống chịu cao với nhiệt độ lên đến 42°C, chi phí ứng dụng vào quy mô lớn hợp lý.

1.2.1. Ứng dụng của vi tảo

1.2.1.1. Ứng dụng trong nông nghiệp

Chi tảo *Chlorella* đã được sử dụng làm thức ăn trong chăn nuôi gia súc, gia cầm và nuôi trồng thủy, hải sản. Vi tảo cũng đang được ứng dụng trong ngành nông nghiệp nhờ xu hướng gia tăng sử dụng các sản phẩm bền vững như thuốc trừ sâu sinh học và phân bón sinh học đang được đưa vào thị trường để thay thế các hoá chất nông nghiệp gây ô nhiễm môi trường [8]. Vi tảo nói chung và loài *C. sorokiniana* nói riêng đã được nghiên cứu có thể sinh tổng hợp một số chất chuyển hoá có khả năng kiểm soát sinh học đối với côn trùng và mầm bệnh thực vật cho cây trồng như giúp tăng sinh trưởng và tăng năng suất của cây trồng. Chúng có khả năng làm giàu chất dinh dưỡng cho đất và tăng cường khả năng sử dụng các nguồn dinh dưỡng đa lượng và vi lượng do kích thích hoạt động của hệ vi sinh vật đất [9].

1.2.1.2. Ứng dụng trong công nghiệp

Việc nuôi cấy vi tảo *Chlorella* ở quy mô lớn đã được bắt đầu vào đầu những năm 1960, sau đó là đến vi khuẩn lam *Arthrospira (Spirulina)* vào những năm 1970. Đến những năm 1980, các cơ sở sản xuất tảo quy mô lớn đã được xuất hiện/thành lập ở châu Á, Ấn Độ, Mỹ, Israel và Úc [10]. Nghiên cứu về tảo không chỉ tập trung vào việc cải tiến sản xuất các sản phẩm truyền thống mà còn tập trung vào phát triển các sản phẩm mới từ sinh khối tảo như dầu diesel sinh học, ethanol sinh học. Vi tảo được coi là một trong những nguyên liệu hứa hẹn nhất cho nhiên liệu sinh học. Trên toàn thế giới, các chương trình nghiên cứu và mô hình đang được thực hiện để phát triển công nghệ cần thiết nhằm mở rộng sản xuất năng lượng và hợp chất từ tảo từ quy trình nuôi mang tính chất thủ công sang nuôi trồng ở quy mô công nghiệp [7].

1.2.1.3. Ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm

Ở hầu hết các nước phát triển, người dân tiêu thụ các mặt hàng thực phẩm có năng lượng cao do lối sống hiện đại, dẫn đến các vấn đề về sức khỏe như béo phì, bệnh tim và tiểu đường trở nên rất phổ biến. Vi tảo được xem là nguồn chứa nhiều chất dinh dưỡng đa dạng như protein, vi lượng, vitamin, polysaccharit, cacbonhydrat, các PUFAs, cũng như các chất có hoạt tính sinh học. Hiện nay, hầu hết các sản phẩm vi tảo được thương mại hóa đều có sẵn trên thị trường

dưới dạng thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người, ở dạng viên nén, viên nang, nước uống và các sản phẩm của chúng được trộn với bột nhão, đồ ăn nhẹ, kẹo, kẹo cao su, mì, rượu vang, đồ uống và ngũ cốc [7]. Vi khuẩn lam *Spirulina* (*Arthrospira*) có hàm lượng protein, giá trị dinh dưỡng cao và đã trở nên phổ biến trên toàn thế giới như một thực phẩm bổ sung. Nó có hàm lượng axit amin là 62% và là nguồn cung cấp vitamin A, B₁, B₂, B₁₂ tự nhiên và phong phú, cũng như các sắc tố carotenoids và xanthophyll [11]. Ngoài ra, nó còn có một lượng đáng kể các axit béo thiết yếu và axit linoleic mà con người không thể tổng hợp được [7].

1.2.1.4. Ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản

Các ứng dụng của vi tảo trong nuôi trồng thủy sản chủ yếu liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến dinh dưỡng của nhiều loài động vật nuôi thủy sản khác nhau. Những loài vi tảo được sử dụng thường xuyên nhất trong lĩnh vực này là *Spirulina*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* và *Thalassiosira* [8]. Vi tảo giàu dinh dưỡng nêu trên từ lâu đã được sử dụng làm nguồn thức ăn tươi sống cho ấu trùng của hầu hết các loại thủy hải sản như tôm, cá, cua, nhuyễn thể hai mảnh vỏ do chúng có kích thước nhỏ, phù hợp với miệng của ấu trùng của đối tượng nuôi, hàm lượng dinh dưỡng cao lại dễ tiêu hóa, ít độc, không gây ô nhiễm môi trường, có tốc độ sinh trưởng nhanh và có khả năng nuôi trồng ở quy mô công nghiệp và bán công nghiệp để cung cấp sinh khối cho đối tượng nuôi khi cần thiết [10]. Thành phần các PUFAs có mặt trong sinh khối như EPA (eicosapentaenoic acid; C20:5 ω -3), DHA (docosahexaenoic acid; C22:6 ω -3), DPA (docosapentaenoic acid; C22:5 ω -3 hoặc C22:5 ω -6) có vai trò quan trọng trong việc giúp ấu trùng của động vật nuôi chuyển giai đoạn, tăng tỷ sống của ấu trùng nuôi, góp phần làm tăng chất lượng của thực phẩm biển [11].

1.2.1.5. Ứng dụng của trong mỹ phẩm

Các loài tảo có sự phân bố rộng rãi và thành phần hóa học của chúng có giá trị tiềm năng cao, là nguồn cung cấp hoạt chất sinh học tự nhiên. Do đó, chúng đã được ứng dụng làm các sản phẩm chứa hợp chất tảo có thể phục hồi những tổn thương trên da và tóc. Do da người thường xuyên tiếp xúc với bức xạ cực tím (UV) từ ánh sáng mặt trời nên nó thường chịu những tác động có hại thông qua tính chất quang hóa của bức xạ UV. Bên cạnh đó, tảo là nguồn cung cấp nhiều hoạt chất sinh học như phlorotannin, carotenoids,

polysaccharides và axit amin có tiềm năng phát triển các sản phẩm dinh dưỡng, dược phẩm và mỹ phẩm. Các chất chuyển hóa từ tảo đã được nghiên cứu về tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm của chúng trong việc bảo vệ da, làm trắng da, chống oxy hóa, trị mụn, kháng nấm và chống dị ứng [13].

1.2.1.6. Ứng dụng của vi tảo trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe và thức ăn chăn nuôi

Vi tảo đặc biệt là các loài có tốc độ sinh trưởng cao, thành phần hóa sinh phong phú như *Chlorella* đang được quan tâm như một đối tượng giàu tiềm năng nhờ vào giá trị sinh học cao, khả năng sản xuất sinh khối lớn và khả năng nuôi cấy trong điều kiện không cạnh tranh với đất canh tác hoặc nguồn nước ngọt.

Chlorella là một trong những chi tảo lục được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi nhất hiện nay. Với thành phần dinh dưỡng đa dạng gồm protein đơn bào chất lượng cao, omega-3, 6, 7, 9 và EPSs có hoạt tính sinh học, cùng các sắc tố carotenoid có khả năng chống oxy hóa mạnh, *Chlorella* không chỉ là nguồn nguyên liệu lý tưởng trong lĩnh vực thực phẩm bảo vệ sức khỏe, mà còn được xem là phụ gia tiềm năng trong thức ăn chăn nuôi [7].

Các nghiên cứu gần đây cho thấy, vi tảo còn được ứng dụng ngày càng nhiều trong ngành chăn nuôi như một nguồn nguyên liệu thay thế bền vững cho các nguồn protein truyền thống. Sinh khối vi tảo có thể được bổ sung trực tiếp vào khẩu phần ăn của gia súc, gia cầm và thủy sản nhằm cung cấp protein, vitamin, khoáng chất và các hợp chất sinh học thiết yếu. Việc sử dụng vi tảo trong thức ăn chăn nuôi không những góp phần nâng cao giá trị dinh dưỡng của khẩu phần mà còn giúp giảm sự phụ thuộc vào các nguồn nguyên liệu protein thông thường như bột cá và đậu tương. [3,12].

Ngoài giá trị dinh dưỡng, vi tảo còn mang lại lợi ích về mặt sinh thái. Nhiều loài vi tảo đã được chứng minh có khả năng hấp thụ hiệu quả các hợp chất chứa nitơ và phospho trong nước thải, từ đó vừa góp phần xử lý môi trường vừa tạo ra nguồn sinh khối có thể tái sử dụng cho sản xuất phân bón sinh học hoặc thức ăn chăn nuôi. Cách tiếp cận này được xem là một giải pháp tiềm năng trong mô hình kinh tế tuần hoàn và sản xuất nông nghiệp bền vững [9,10].

1.2.2. Nuôi trồng vi tảo

Vi tảo là nhóm sinh vật có khả năng thích nghi cao và có thể được nuôi cấy dưới nhiều điều kiện môi trường khác nhau, bằng các phương pháp nuôi cấy hở (hệ thống ao, hồ) hoặc kín (hệ thống photobioreactor). Trong điều kiện quang tự dưỡng, vi tảo sử dụng ánh sáng làm nguồn năng lượng và CO₂ làm nguồn cacbon để chuyển hóa thành sinh khối thông qua quá trình quang hợp. Để tăng trưởng và phát triển bình thường, vi tảo cần được cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng thiết yếu, trong đó nitơ và phốt pho là hai nguyên tố chính, chiếm khoảng 10 - 20% SKK. Ngoài ra, các nguyên tố đa lượng như Na, Mg, Ca, K cùng với vi lượng như Fe, Zn, B, Mn, Mo, Co cũng đóng vai trò quan trọng trong hoạt động sinh lý và trao đổi chất của tế bào tảo [3,14].

Quá trình sinh trưởng của vi tảo nói chung diễn ra qua nhiều pha sinh trưởng đặc trưng, bao gồm pha tiềm phát, pha lũy thừa, pha cân bằng và pha suy thoái. Mỗi loài vi tảo có ngưỡng nhu cầu dinh dưỡng và điều kiện môi trường riêng biệt. Tuy nhiên, yếu tố cốt lõi chi phối quá trình sinh trưởng xoay quanh: nguồn cacbon (hữu cơ và/hoặc vô cơ), nitơ, phốt pho, ánh sáng, nhiệt độ, pH, độ mặn, oxy hòa tan, CO₂ và các chất khoáng đa và vi lượng. Ngoài ra, các yếu tố vận hành như tốc độ khuấy trộn, hình dạng và kích thước hệ thống nuôi, thời gian thu hoạch và tần suất bổ sung môi trường dinh dưỡng cũng ảnh hưởng đáng kể đến năng suất sinh khối và hiệu suất tích lũy các hợp chất sinh học như protein, PUFAs, EPSs và sắc tố carotenoit [15].

Ở quy mô lớn, vi tảo có thể được nuôi ngoài trời trong các ao hoặc hồ lộ thiên nhằm tận dụng ánh sáng tự nhiên và giảm chi phí. Tuy nhiên, phương pháp này có nguy cơ nhiễm tạp cao và khó kiểm soát các thông số môi trường. Một số mô hình hiện đại hơn đã kết hợp nuôi tảo với các nguồn nước thải công nghiệp hoặc nông nghiệp - vừa cung cấp dinh dưỡng cho tảo, vừa xử lý nguồn nước ô nhiễm. Bên cạnh đó, xu hướng nuôi tảo biển trong môi trường tự nhiên như vùng nước ven bờ cũng đang thu hút sự quan tâm do chi phí vận hành thấp và khả năng khai thác nguồn dinh dưỡng sẵn có từ nước biển [3].

Đặc biệt, trong điều kiện nuôi tạp dưỡng - kết hợp giữa quang tự dưỡng và dị dưỡng - hiệu suất tích lũy sinh khối và các sản phẩm có hoạt tính sinh học của vi tảo có thể được cải thiện rõ rệt. Tuy nhiên, để đạt được điều này, cần tối ưu hóa đồng thời các yếu tố môi trường như thành phần dinh dưỡng, nhiệt độ và cường độ ánh sáng.

1.2.3. Tình hình nghiên cứu đối với chi *Chlorella*

1.2.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Chi *Chlorella* là một trong những nhóm vi tảo lục được nghiên cứu rộng rãi nhất trên thế giới nhờ tốc độ sinh trưởng nhanh, khả năng thích nghi tốt và giá trị dinh dưỡng cao. Các nghiên cứu tập trung chủ yếu vào thành phần hóa sinh, công nghệ nuôi trồng, ứng dụng trong thực phẩm chức năng, thức ăn chăn nuôi, xử lý môi trường và sản xuất năng lượng sinh học [3,10,11]. Nhiều công trình đã chứng minh sinh khối *Chlorella* chứa hàm lượng protein, lipid, vitamin, khoáng chất và các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, cho thấy tiềm năng lớn trong sản xuất thực phẩm bổ sung và các sản phẩm chăm sóc sức khỏe [5,6,16]. Bên cạnh đó, khả năng tích lũy lipid và các hợp chất có giá trị cao đã thúc đẩy nhiều nghiên cứu về ứng dụng *Chlorella* trong sản xuất nhiên liệu sinh học và các sản phẩm sinh học giá trị gia tăng [4,17].

Ngoài ra, *Chlorella* còn được nghiên cứu rộng rãi trong xử lý nước thải nhờ khả năng hấp thụ hiệu quả các hợp chất chứa nitơ và phospho, đồng thời tạo ra nguồn sinh khối có thể tái sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau. Hiện nay, xu hướng nghiên cứu trên thế giới đang tập trung vào tối ưu hóa hệ thống nuôi trồng và khai thác hiệu quả các hợp chất sinh học có giá trị nhằm phục vụ phát triển kinh tế sinh học bền vững [1, 2, 9].

1.2.3.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Chi vi tảo *Chlorella* nước ngọt hay nước mặn (biển) đã được các nhà nghiên cứu tảo học Việt Nam nghiên cứu khá lâu từ những năm 1970 của thế kỷ trước. Trong đó, tại Việt Nam tập trung nghiên cứu nhiều vào loài *C. vulgaris* là chủ yếu như nghiên cứu đặc điểm sinh học, nuôi trồng ở các quy mô khác nhau trong điều kiện phòng thí nghiệm [18]. Do có thành phần dinh dưỡng cao nên *C. vulgaris* đã được sử dụng làm thức ăn cho gia súc (bò), gia cầm (gà, vịt) và trong nuôi trồng thủy sản cũng đã được công bố [12,19]. Nhiều nghiên cứu đã được công bố về việc sử dụng loài *C. vulgaris* trong xử lý nước thải ô nhiễm hữu cơ, loại bỏ kim loại nặng [20]. Một số báo cáo khoa học tập chung vào sử dụng chi *Chlorella* trong xử lý nước thải chăn nuôi để sản xuất nhiên liệu sinh học [21], nuôi sinh khối *C. vulgaris* cho sản xuất biodiesel đạt 5 tiêu chuẩn chính cho diesel sinh học thu được [7,22]. Tuy nhiên, nghiên cứu trong nước về loài *C. sorokiniana* vẫn còn rất hạn chế, mới chỉ tập trung trong nghiên cứu sử dụng sinh khối làm nhiên liệu sinh học theo phương thức tảo dưỡng với

các hệ thống kín dung tích 20-50 Lit [23]. Đã có nghiên cứu nào về loài này ở quy mô 300 Lit theo phương thức tạp dưỡng ở Việt Nam [24].

Trong nuôi cấy theo cả phương thức quang tự dưỡng, dị dưỡng hay tạp dưỡng thì khả năng sinh tổng hợp và tích lũy các hợp chất sinh học có hoạt tính của *Chlorella* phụ thuộc rất lớn vào điều kiện nuôi cấy, đặc biệt là thành phần của môi trường dinh dưỡng, nhiệt độ và ánh sáng. Các yếu tố này ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ sinh trưởng, cũng như tỷ lệ tổng hợp protein, lipid, polysaccharide ngoại bào và các hợp chất thứ cấp khác.

1.3. Polysaccharide ngoại bào (Extracellular polysaccharides - EPSs)

1.3.1. Giới thiệu chung về EPSs

EPSs là các hợp chất carbohydrate có khối lượng phân tử lớn, được cấu tạo từ nhiều đơn vị monosaccharide lặp lại, liên kết với nhau thông qua các liên kết glycosidic. Chúng là một trong những thành phần sinh học quan trọng, tham gia vào nhiều chức năng khác nhau của tế bào như dự trữ năng lượng, cấu trúc và bảo vệ tế bào [25, 26]. Về mặt cấu trúc, EPSs có thể tồn tại dưới dạng mạch thẳng hoặc mạch nhánh, với sự đa dạng về loại monosaccharide cấu thành, kiểu liên kết (α - hoặc β -glycosidic) và mức độ phân nhánh. Những đặc điểm này quyết định các tính chất lý hóa của EPSs như độ hòa tan, độ nhớt và khả năng tạo gel [26]. Phần lớn EPSs có khả năng hòa tan trong nước ở các mức độ khác nhau, thường tan tốt hơn trong nước nóng so với nước lạnh, trong khi hầu như không có khả năng hòa tan trong các dung môi hữu cơ điển hình như methanol, chloroform hoặc hexan [25, 26].

Dựa trên thành phần cấu tạo, polysaccharide được chia thành hai nhóm chính: homopolysaccharide (chỉ gồm một loại monosaccharide, ví dụ như cellulose hoặc tinh bột) và heteropolysaccharide (gồm nhiều loại monosaccharide khác nhau). Ngoài thành phần carbohydrate, một số polysaccharide còn chứa các nhóm chức hoặc thành phần phi carbohydrate như sulfate, phosphate, acetyl hoặc protein liên kết, góp phần tạo nên tính đa dạng về cấu trúc và chức năng sinh học [27].

Trong vi sinh vật, polysaccharide có thể được phân loại theo vị trí và vai trò sinh học thành ba nhóm chính: (i) polysaccharide nội bào, đóng vai trò dự trữ năng lượng; (ii) polysaccharide cấu trúc thuộc thành tế bào, như peptidoglycan hoặc lipopolysaccharide; và (iii) polysaccharide ngoại bào

(EPSs), được tổng hợp trong tế bào và tiết ra môi trường xung quanh. Trong đó, EPSs thường được xem là các chất chuyển hóa thứ cấp, được sản xuất mạnh ở giai đoạn cuối của pha sinh trưởng, đặc biệt là pha cân bằng [28].

1.3.2. EPSs từ vi tảo

EPSs là các polyme saccharide ngoại bào có khối lượng phân tử cao được bao bọc trong bề mặt tế bào của vi sinh vật hoặc được tổng hợp từ bên ngoài tế bào. Nhiệm vụ chính của chúng là bảo vệ tế bào, đảm bảo sự bám dính, duy trì độ ẩm và thích nghi với điều kiện bất lợi của môi trường. Chúng cũng góp phần vào nhận dạng tế bào và hình thành biofilm [29]. Koçer và cộng sự (2021) [30] đã công bố rằng *C. sorokiniana* tiết EPSs vào dịch nuôi ngoài tế bào với hàm lượng ghi nhận là $0,1630 \pm 0,0016$ g/L, cho thấy polysaccharide này đã thực sự được giải phóng ra môi trường và có thể thu hồi từ dịch huyền phù qua các biện pháp thu gom bằng kết tủa. Kết quả này chứng tỏ rõ ràng EPSs không chỉ tồn tại nội bào mà còn ở dạng hòa tan bên ngoài tế bào. EPSs có nhiều đặc điểm công nghệ và sinh lý quan trọng để sử dụng an toàn trong ngành công nghiệp thực phẩm. Các nghiên cứu cho rằng có nhiều loài vi sinh vật có khả năng sản xuất EPSs bao gồm vi khuẩn, nấm và vi tảo [31]. Trong đó, vi tảo là vi sinh vật có thể quang hợp, chứa hàm lượng lipid, EPSs và cacbohydrate cao. Chúng được sử dụng trong rất nhiều ứng dụng khác nhau vì có khả năng sinh trưởng nhanh, dễ dàng và có thành phần hóa học đa dạng có hoạt tính sinh học cao nên được ứng dụng làm nguyên liệu trong ngành dược phẩm và thực phẩm cũng như sản xuất nhiên liệu sinh học như biodiesel và bioethanol.

EPSs từ vi tảo ngày càng được quan tâm nhờ cấu trúc phức tạp và có đặc tính chống đông máu, kháng vi rút, chống oxy hóa, chống hình thành khối u và điều hòa hệ thống miễn dịch [31, 32]. Một số EPSs từ các loài tảo đỏ (*Porphyridium*), tảo lục (*Chlorella*, *Scenedesmus*) và vi khuẩn lam (*Spirulina*, *Arthrospira*) đã được ghi nhận có tác dụng bảo vệ tế bào, cải thiện hệ vi sinh đường ruột, tăng khả năng tiêu hóa và hấp thu dinh dưỡng. Đặc biệt, chúng được sử dụng trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người và thức ăn chăn nuôi. Ngoài ra, EPSs có khả năng tạo gel sinh học, làm chất ổn định trong thực phẩm và hỗ trợ miễn dịch cho vật nuôi.

1.3.3. Con đường sinh tổng hợp EPSs từ vi tảo

EPSs ở vi tảo được tổng hợp thông qua một chuỗi các quá trình sinh hóa phức tạp, bắt đầu từ việc cố định cacbon và chuyển hóa thành các tiền chất

đường hoạt hóa, sau đó được polymer hóa và vận chuyển ra ngoài tế bào. Mặc dù cơ chế cụ thể có thể khác nhau giữa các loài, quá trình sinh tổng hợp EPSs ở vi tảo nhìn chung bao gồm ba giai đoạn chính: (i) hình thành tiền chất monosaccharide, (ii) hoạt hóa và polymer hóa, và (iii) vận chuyển và bài tiết ra môi trường ngoại bào [33, 34].

1.3.3.1. Giai đoạn hình thành tiền chất monosaccharide

Ở vi tảo quang tự dưỡng, nguồn cacbon cho quá trình tổng hợp EPSs chủ yếu bắt nguồn từ CO₂ thông qua chu trình Calvin. CO₂ được cố định thành các hợp chất trung gian như glyceraldehyde-3-phosphate (G3P), sau đó được chuyển hóa thành các đường phosphoryl hóa như glucose-6-phosphate (G6P) và fructose-6-phosphate (F6P), là các tiền chất quan trọng trong sinh tổng hợp carbohydrate [17, 35].

Trong điều kiện dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, vi tảo có thể sử dụng các nguồn cacbon hữu cơ như glucose hoặc acetate, tham gia vào các con đường chuyển hóa trung tâm như đường phân (glycolysis) và con đường pentose phosphate để tạo ra tiền chất cho sinh tổng hợp EPSs [36]. Các con đường này cung cấp cả nguồn cacbon và năng lượng cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp polysaccharide.

1.3.3.2. Giai đoạn hoạt hóa và polymer hóa

Các monosaccharide tự do cần được hoạt hóa dưới dạng nucleotide sugar (như UDP-glucose, GDP-mannose, UDP-galactose) trước khi tham gia vào quá trình tổng hợp polysaccharide. Quá trình này được xúc tác bởi các enzyme như UDP-glucose pyrophosphorylase và giữ vai trò trung gian thiết yếu trong sinh tổng hợp carbohydrate [36, 37]. Sau khi được hoạt hóa, các đơn vị đường sẽ được liên kết với nhau thông qua hoạt động của các enzyme glycosyltransferase để hình thành chuỗi polysaccharide. Quá trình polymer hóa này có thể diễn ra tại màng tế bào hoặc các cấu trúc liên quan đến hệ thống nội màng [33, 37]. Cấu trúc cuối cùng của EPSs, bao gồm loại monosaccharide, kiểu liên kết glycosidic và mức độ phân nhánh, phụ thuộc vào hệ enzyme tham gia cũng như điều kiện môi trường nuôi cấy [35].

1.3.3.3. Giai đoạn vận chuyển và bài tiết EPSs

Sau khi được tổng hợp, các chuỗi polysaccharide sẽ được vận chuyển qua màng tế bào và tiết ra môi trường ngoại bào. Quá trình này có thể liên quan đến các hệ thống vận chuyển chuyên biệt hoặc cơ chế tiết polysaccharide phụ

thuộc vào loài vi sinh vật. EPSs có thể tồn tại ở dạng hòa tan trong môi trường nuôi (released EPS) hoặc ở dạng liên kết lỏng lẻo với bề mặt tế bào (capsular hoặc slime layer). Quá trình bài tiết EPSs thường được tăng cường trong các điều kiện stress môi trường như thiếu dinh dưỡng (đặc biệt là nitơ), cường độ ánh sáng cao hoặc thay đổi độ mặn. Đây được xem là cơ chế thích nghi giúp tế bào bảo vệ khỏi các yếu tố bất lợi và duy trì cân bằng sinh lý [27].

1.3.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp EPSs

Quá trình sinh tổng hợp EPSs ở vi tảo chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố môi trường cùng với điều kiện nuôi cấy, bao gồm nguồn cacbon, tỷ lệ C/N, ánh sáng, nhiệt độ, pH và các yếu tố stress như độ mặn hoặc kim loại nặng [27,33]. Trong đó, sự thiếu hụt nitơ thường được ghi nhận là yếu tố kích thích tích lũy polysaccharide, do tế bào chuyển hướng dòng cacbon từ tổng hợp protein sang tích lũy carbohydrate, bao gồm cả EPSs. Những thay đổi này không chỉ ảnh hưởng đến sản lượng mà còn tác động đến cấu trúc và hoạt tính sinh học của EPSs.

1.3.3.4.1. Ảnh hưởng của ánh sáng

Cường độ ánh sáng được xem là một trong những yếu tố quan trọng trong nuôi trồng vi tảo. Thời gian và cường độ ánh sáng ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình quang hợp của vi tảo và có ảnh hưởng đến thành phần sinh hóa của vi tảo và năng suất sinh khối [38]. Cường độ ánh sáng quá thấp hoặc quá cao đều không tốt cho vi tảo. Nếu cường độ ánh sáng quá thấp, vi tảo sẽ không thể chuyển hoá CO₂ thành năng lượng dẫn đến sinh trưởng giảm. Ngược lại, cường độ ánh sáng cao hơn sẽ làm tăng tốc độ quang hợp đến một mức nào đó, sau đó nó chững lại cho đến khi tốc độ quang hợp được cân bằng bởi quá trình quang hô hấp và sự ức chế quang hóa. Bên cạnh đó, mật độ tế bào quá thấp nhưng cường độ ánh sáng quá cao lại gây ức chế quá trình sinh trưởng của tảo. Chính vì vậy, cường độ ánh sáng tối ưu cần phải được xác định bằng thực nghiệm trong từng trường hợp để tối đa hóa quá trình đồng hóa CO₂ với tốc độ quang hô hấp tối thiểu và càng ít quang ức chế càng tốt [2]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, cần có một khoảng thời gian cụ thể của chu kỳ sáng/tối để tảo quang hợp vì ánh sáng cần thiết để tổng hợp ATP và NADPH, điều khiển các phản ứng tối của quá trình quang hợp tạo ra khung cacbon. Hầu hết các nghiên cứu đều chỉ ra rằng quang chu kỳ sáng: tối là 16:8 giờ là thích hợp nhất cho tảo phát triển [3]. Vi tảo được chiếu ánh sáng có cường độ thích hợp sẽ thúc đẩy hoạt động

quang hợp, trong khi mức độ ánh sáng quá mức hoặc không đủ có thể dẫn đến ức chế quang hợp hoặc hạn chế tăng trưởng [2]. Nghiên cứu về ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến sản xuất EPSs cũng được thực hiện trên vi khuẩn lam. Chiếu ánh sáng liên tục ở cường độ ánh sáng cao được phát hiện là có lợi cho việc sản xuất EPSs ở vi khuẩn lam. Vi khuẩn lam *Aponinum* có thể tổng hợp EPSs ở cường độ ánh sáng $500 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ ($\mu\text{mol/m}^2\text{/s}$) [39], tương tự như vậy, *Anabena* spp. với sản lượng EPSs cao nhất được phát hiện ở cường độ ánh sáng $460 \mu\text{mol/m}^2\text{/s}$ [40]. Chentir et al. (2017) đã quan sát thấy sự gia tăng sản lượng EPSs của vi khuẩn lam khi cường độ ánh sáng tăng lên [41].

1.3.3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của vi tảo và ảnh hưởng trực tiếp đến các quá trình sinh hóa, bao gồm cả quá trình quang hợp và trong cơ quan nội bào của tế bào tảo. Mỗi loài có nhiệt độ tăng trưởng tối ưu riêng. Việc tăng nhiệt độ đến phạm vi tối ưu sẽ làm tăng sự phát triển của tảo theo cấp số nhân, nhưng việc tăng hoặc giảm nhiệt độ vượt quá điểm tối ưu sẽ làm suy giảm tốc độ sinh trưởng hoặc thậm chí ngừng hoạt động sinh lý của tảo [42]. Nuôi cấy vi tảo ở nhiệt độ không tối ưu sẽ dẫn đến làm giảm sinh khối cao, đặc biệt là trong các hệ thống nuôi hử ở các ao, hồ. Nhiệt độ là yếu tố quan trọng trong nuôi trồng ở quy mô lớn, đặc biệt nuôi trong các ao hử và cần được theo dõi cẩn thận vì dịch nuôi tảo có sự thay đổi nhiệt độ đáng kể theo thời gian [43]. Nhiệt độ thấp ảnh hưởng đến quá trình quang hợp bằng cách giảm hoạt động đồng hóa cacbon, trong khi nhiệt độ quá cao làm giảm quá trình quang hợp bằng cách làm bất hoạt các protein tham gia trong cấu tạo nên bộ máy quang hợp và làm xáo trộn sự cân bằng năng lượng trong tế bào. Nhiệt độ cao hơn cũng làm giảm kích thước tế bào và hô hấp. Sự suy giảm quang hợp dẫn đến tốc độ tăng trưởng giảm [44]. Nhiệt độ là một trong những thông số chính ảnh hưởng đến các quá trình trao đổi chất trong tế bào vi tảo. Nhiệt độ cũng có thể tác động đến quá trình sản xuất EPSs và giá trị tối ưu của nó đối với quá trình tổng hợp EPSs là đặc thù của từng loài. Trong các nghiên cứu về ảnh hưởng của cường độ ánh sáng và nhiệt độ đến quá trình sản xuất EPSs của chủng *Graesiella* ưa nhiệt, năng suất EPSs cao nhất thu được ở nhiệt độ cao nhất được thử nghiệm, tức là 40°C và ở cường độ ánh sáng thấp nhất là $20 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ [45].

1.3.3.4.3. Ảnh hưởng của pH và độ mặn

pH của môi trường nuôi cấy là một yếu tố quan trọng khác ảnh hưởng đến sự phát triển của vi tảo [46]. Các loài vi tảo có khả năng thích nghi với môi trường nuôi có pH khác nhau. Hầu hết các loài vi tảo có khả năng sinh trưởng tốt ở môi trường có pH khoảng từ 6 đến 8,8. Các nguồn môi trường tăng trưởng khác nhau có giá trị pH khác nhau. Hầu hết các loài tảo đều nhạy cảm với pH và rất ít loài có thể chịu đựng được phạm vi pH rộng. Tuy nhiên, vẫn có một số trường hợp được báo cáo như loài *C. vulgaris* có thể phát triển ở phạm vi pH rộng tuy nhiên tốc độ tăng trưởng tối đa và năng suất sinh khối được báo cáo ở môi trường có pH 9-10 [47].

1.3.4.5. Các phương thức sinh trưởng của vi tảo

Vi tảo xuất hiện ở khắp nơi và sinh sống trong nhiều môi trường khác nhau. Ở vi tảo có 3 phương thức sinh trưởng khác nhau như quang tự dưỡng, dị dưỡng và tạp dưỡng. Tùy thuộc vào điều kiện mà chúng sử dụng nguồn cacbon và sự cần thiết chiếu sáng sẽ khác nhau. Sau đây là các đặc điểm của các điều kiện nuôi trồng theo kiểu quang tự dưỡng, dị dưỡng và tạp dưỡng cho vi tảo.

- *Quang tự dưỡng*

Vi tảo thường sống trong điều kiện quang tự dưỡng với việc sử dụng CO₂ vô cơ có trong khí quyển làm nguồn cacbon để tăng trưởng. Chúng chuyển đổi CO₂ có trong khí quyển, H₂O và ánh sáng thành các chất hữu cơ thông qua quá trình quang hợp. Điều này làm cho việc nuôi trồng bằng phương thức quang tự dưỡng rất tiết kiệm và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, quá trình nuôi trồng theo phương thức quang tự dưỡng thường bị giới hạn bởi việc phân bố ánh sáng khi mật độ tế bào tăng lên quá cao, điều này ảnh hưởng lớn đến việc thu nhận ánh sáng làm giảm sinh trưởng của vi tảo, do đó năng suất sinh khối của vi tảo sẽ bị giảm đáng kể [48].

- *Dị dưỡng*

Vi sinh vật dị dưỡng nói chung và vi tảo dị dưỡng nói riêng sử dụng nguồn cacbon hữu cơ để làm nguồn cacbon và nguồn năng lượng mà không cần ánh sáng. Chúng sinh trưởng thông qua quá trình hô hấp và lên men kết hợp.

Mặc dù vi tảo thường sử dụng nguồn cacbon vô cơ để quang hợp nhưng việc vi tảo sinh trưởng chậm làm cho năng suất thu được thấp. Để tối đa hoá việc sản xuất sinh khối với năng suất cao, người ta đã đề xuất phương pháp nuôi

cây trong đó nguồn cacbon hữu cơ được sử dụng thay cho nguồn cacbon vô cơ [49]. Nhờ việc cung cấp nguồn cacbon hữu cơ mà năng suất sinh khối vi tảo được tăng đáng kể nhờ tăng năng suất sinh trưởng và mật độ tế bào mà không phụ thuộc vào chiếu sáng. Ngoài ra, hàm lượng các chất có giá trị gồm lipid, sắc tố có thể được tăng cường [31]. Tuy nhiên, trái lại với năng suất cao của phương pháp nuôi cấy tự dưỡng (không xảy ra quá trình quang hợp) thì việc chúng phát thải CO₂ trực tiếp vào không khí lại nảy sinh vấn đề ô nhiễm môi trường.

- *Tạp dưỡng*

Việc nuôi cấy tạp dưỡng được ưa chuộng hơn vì phương pháp này cải thiện được nhiều hạn chế so với phương thức quang tự dưỡng và dị dưỡng. Thứ nhất, việc sử dụng nguồn cacbon hữu cơ giúp tảo tăng năng suất hơn rất nhiều lần so với sử dụng nguồn cacbon vô cơ trong nuôi trồng quang tự dưỡng. Thứ hai, vi tảo nuôi trong điều kiện dị dưỡng môi trường sẽ không có ánh sáng khiến quá trình quang hợp không xảy ra, nghĩa là nguồn năng lượng duy nhất làm cacbon hữu cơ sẽ được vi tảo sử dụng và giải phóng CO₂. Trong điều kiện nuôi dị dưỡng, CO₂ giải phóng không thể sử dụng làm nguồn cacbon cho quá trình quang hợp, dẫn đến pH của môi trường nuôi cấy bị thay đổi và tiếp theo tác động tới tốc độ sinh trưởng của vi tảo. Do vậy, điều này ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất sinh khối [50]. Do đó, nuôi trồng theo phương thức tạp dưỡng thường tránh được các nhược điểm của nuôi quang tự dưỡng và dị dưỡng. Một ưu điểm khác của việc nuôi trồng vi tảo trong điều kiện tạp dưỡng là hàm lượng lipid cao hơn trong sinh khối tảo và tăng năng suất lipid đối với một số loài tảo. Sản lượng sinh khối cao hơn và hàm lượng lipid cao hơn dẫn đến năng suất lipid cao hơn, đồng nghĩa với việc thu hồi năng lượng cao hơn. Nghiên cứu của Liang et al (2009) [51] đã thông báo về sự phát triển của *C. vulgaris* trong ba điều kiện tăng trưởng với nguồn cacbon khác nhau gồm acetate, glucose và glycerol và kết quả nghiên cứu thu được cho thấy năng suất sinh khối và lipid cao nhất ở chế độ nuôi trồng theo phương thức tạp dưỡng.

1.3.4. Hoạt tính sinh học của EPSs

EPSs là nhóm hợp chất sinh học với sự đa dạng về cấu trúc và được ghi nhận với nhiều hoạt tính sinh học quan trọng. Các hoạt tính này phụ thuộc chặt chẽ vào đặc điểm cấu trúc của EPSs như khối lượng phân tử, thành phần monosaccharide, kiểu liên kết glycosidic và sự hiện diện của các nhóm chức như sulfate hoặc uronic acid [52,53].

EPSs có khả năng loại bỏ các gốc tự do (ROS) thông qua cơ chế cho electron hoặc nguyên tử hydro, từ đó làm giảm stress oxy hóa trong tế bào. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh EPSs thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do mạnh trong các hệ thử nghiệm như DPPH, ABTS và FRAP [53]. Hoạt tính này thường tăng khi EPSs có khối lượng phân tử thấp hoặc chứa các nhóm chức hoạt động như sulfate và hydroxyl [52].

EPSs có thể điều hòa đáp ứng miễn dịch thông qua việc kích thích hoặc ức chế sản xuất cytokine (như TNF- α , IL-6, IL-10), đồng thời ảnh hưởng đến hoạt động của đại thực bào và tế bào lympho [54]. Một số EPSs còn có khả năng ức chế các con đường tín hiệu liên quan đến viêm như NF- κ B hoặc MAPK, từ đó làm giảm phản ứng viêm.

EPSs được ghi nhận có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn và virus thông qua nhiều cơ chế khác nhau như phá vỡ màng tế bào, ức chế sự bám dính hoặc can thiệp vào quá trình sao chép của vi sinh vật [50]. Một số EPSs có nguồn gốc từ vi sinh vật biển còn biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn đáng kể với vi khuẩn Gram dương và Gram âm [53].

Một số EPSs có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư thông qua việc kích hoạt quá trình apoptosis hoặc điều hòa chu kỳ tế bào. Ngoài ra, EPSs còn có thể tăng cường hệ miễn dịch, gián tiếp góp phần chống lại sự phát triển của khối u [52].

EPSs từ vi tảo, đặc biệt là các loài thuộc chi *Chlorella* gây chú ý trong nghiên cứu nhờ khả năng biểu hiện nhiều hoạt tính sinh học có giá trị trong ngành thực phẩm và y sinh. Thành phần EPSs từ *Chlorella* thường bao gồm các monosaccharide như glucose, galactose, mannose và có thể chứa các nhóm chức như sulfate hoặc axit uronic, góp phần tạo nên hoạt tính sinh học đặc trưng [16]. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo EPSs từ *Chlorella* có khả năng bắt giữ gốc tự do và giảm stress oxy hóa. Hoạt tính này được đánh giá thông qua các phương pháp như DPPH, ABTS và scavenging ROS nội bào. EPSs từ *C. sorokinian* được ghi nhận có hoạt tính chống oxy hóa chịu ảnh hưởng bởi nồng độ và cấu trúc phân tử.

EPSs từ *Chlorella* có thể hoạt hóa hệ miễn dịch thông qua việc tăng cường hoạt động của đại thực bào, thúc đẩy sản xuất nitric oxide (NO) và các cytokine miễn dịch. Qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng của nó trong việc tăng cường sức đề kháng và hỗ trợ điều trị bệnh [16]. Một số EPSs từ *Chlorella*

đã được báo cáo có khả năng làm giảm phản ứng viêm thông qua việc ức chế sản xuất các chất trung gian gây viêm. Hoạt tính này có ý nghĩa quan trọng trong việc phòng ngừa các bệnh mạn tính liên quan đến viêm.

Nhờ các hoạt tính sinh học đa dạng và tính an toàn sinh học cao, EPSs từ *Chlorella* được xem là nguồn nguyên liệu tiềm năng trong phát triển thực phẩm bảo vệ sức khỏe. EPSs được ứng dụng như chất chống oxy hóa tự nhiên, đóng vai trò như tác nhân tăng cường miễn dịch hoặc thành phần hỗ trợ hệ vi sinh đường ruột [16,53].

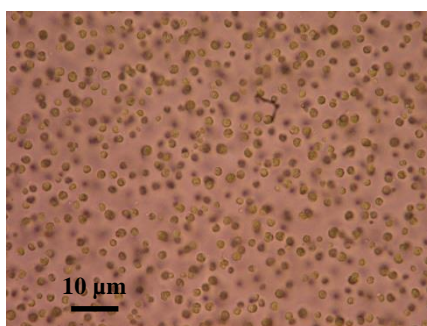
Ở Việt Nam, phần lớn các nghiên cứu về *C. sorokiniana* mới chủ yếu tập trung vào sinh khối, lipid và sản xuất biodiesel. Mặc dù, EPSs đã được chứng minh là một trong những thành phần quan trọng trong dịch nuôi tảo, việc khai thác EPSs từ dịch nuôi tảo *C. sorokiniana* vẫn chưa được nghiên cứu một cách toàn diện và có hệ thống. Hiện chưa có công trình nào công bố quy trình tách chiết, tinh sạch EPSs và xác định hoạt tính sinh học của chúng từ loài tảo này trong điều kiện nuôi trồng tại Việt Nam. Đồng thời, tiềm năng ứng dụng EPSs trong dịch nuôi cấy *C. sorokiniana* trong lĩnh vực thực phẩm và thức ăn chăn nuôi hoàn toàn chưa được khai thác. Trong bối cảnh ngành thực phẩm và chăn nuôi đang hướng tới các nguồn nguyên liệu tự nhiên, thân thiện với môi trường, giàu dinh dưỡng và có hoạt tính sinh học cao. Bên cạnh nguồn sinh khối *C. sorokiniana* có khả năng: phát triển thực phẩm bảo vệ sức khỏe, hỗ trợ tiêu hóa, chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch, tách chiết EPSs từ dịch nuôi cấy vi tảo làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người và động vật nuôi là một hướng đi đầy triển vọng. Việc nghiên cứu tách chiết kết hợp đánh giá hoạt tính sinh học của EPSs thu được trong dịch nuôi cấy *C. sorokiniana* sẽ mở ra hướng phát triển mới. EPSs sẽ làm gia tăng giá trị khai thác các chất có hoạt tính sinh học trong quá trình nuôi cấy *C. sorokiniana*, mở rộng chuỗi giá trị sản phẩm từ vi tảo ngoài lipid và protein, đồng thời làm giảm chi phí sản xuất. Chính từ những cơ sở phân tích trên, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu **“Nghiên cứu tách chiết và xác định hoạt tính sinh học của polysaccharide ngoại bào từ vi tảo lục *Chlorella sorokiniana* định hướng ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người”**.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng

- Đối tượng: Chủng giống *C. sorokiniana* DDH thuộc bộ sưu tập giống của nhóm Công nghệ tảo, Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) được sử dụng cho nghiên cứu. Trong đó, chủng *C. sorokiniana* DDH 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 được thiết lập là 12:12 giờ được sử dụng trong nghiên cứu. Hình 2.1 là ảnh minh họa hình thái tế bào *C. sorokiniana* DDH.



Hình 2.1. Hình ảnh minh họa hình thái tế bào *C. sorokiniana* DDH

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị

Hóa chất

Thành phần môi trường Endo nuôi cấy *C. sorokiniana* DDH bao gồm (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,105, Glucose - 30, KNO_3 - 4,8, KH_2PO_4 - 1,2, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,016, Na_2EDTA - 2,1, A5 - 1mL.

Thành phần môi trường BG-11 nuôi cấy *C. sorokiniana* DDH bao gồm (g/L): NaNO_3 - 1,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,041, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,075, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,036, citric acid - 0,006, ferric amoniumcitrate - 0,006, EDTA - 0,001, Na_2CO_3 - 0,02, glucose - 30, A5 - 1mL;

Thành phần môi trường C nuôi cấy *C. sorokiniana* DDH bao gồm (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,04, glucose - 30, Tris base - 0,5, KNO_3 - 0,1, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,15, $\text{Na}_2\text{Glycerophosphate}$ - 0,05, PIV - 3mL.

Trong đó, thành phần PIV bao gồm (mg/L): H_3BO_3 - 2,86, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,81, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,22, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,07, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,021. Thành phần dung dịch A5 bao gồm (g/L): H_3BO_3 - 2,850, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -

1,810, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,220, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,080, MoO_3 - 0,015, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,044).

Ngoài ra, các hóa chất phục vụ các thí nghiệm khác như axit trichloroacetic (TCA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), buthanol, chloroform, hexane, ethanol... do Trung Quốc sản xuất và đảm bảo độ tinh khiết trong các thí nghiệm.

Dụng cụ, thiết bị

Buồng đếm hồng cầu Burkert-Turk (Đức); Pipetman các loại 20, 100, 200 và 1000 μ L (Gilson, France); Pipette Pasteur (USA); Cân phân tích Precisa XB 1200C (max 1200g; e-0,1g; d- 0,01g) (Switzerland); Cân phân tích Shimadzu AY 120 (max 120g, d=0,1mg); Máy đo mật độ quang học UV - 1601 Shimadzu (Nhật Bản); Máy chụp ảnh SEM Hitachi S-4800 (Serial, HI-9022-0003, Nhật Bản), máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier IR InfraLUM FT-08 (Lumex Instruments, Nga); Tủ sấy Cornthem (New Zealand); Tủ sấy Gallenkamp (USA); Máy ly tâm Sorvall LeGen RT 1900w (Kendro, Germany); Kính hiển vi quang học Olympus CX21 (Japan); Nồi khử trùng (Trung Quốc); Máy ảnh kỹ thuật số Canon IXY Digital 70 (Japan); máy quang phổ nanospect (Đức); box cấy (Việt Nam); hệ thống kín nuôi cấy PBRs 300 Lit; Phễu chiết, phễu lọc, cốc đong, ống đong, các loại bình tam giác từ loại 100, 250, 500 và 1000 mL; Giấy pH; Giấy lọc thường; Giấy lọc GF/C ... và một số dụng cụ khác đã được sử dụng cho nghiên cứu.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp xác định sinh trưởng bằng số lượng tế bào được đếm bằng buồng đếm Burkert - Turk

Xác định sinh trưởng thông qua mật độ tế bào (MĐTB) được tiến hành theo mô tả của Đặng Diễm Hồng (2019) [12]. Lắc đều mẫu, mẫu được đếm trực tiếp hoặc pha loãng 50 - 100 lần bằng nước cất. MĐTB được xác định bằng buồng đếm hồng cầu Burkert-Turk (Hirschmann, Laborgerate Hilgenberg, Đức), dưới kính hiển vi Olympus CX21 (Mỹ). Buồng đếm Burkert-Turk gồm 16 khu, mỗi khu gồm 16 ô vuông nhỏ. Mẫu tảo nhỏ trên buồng đếm, được đếm tại 5 khu, 4 khu ở 4 góc và 1 khu ở giữa. Đếm lặp lại 10 lần, lấy giá trị trung bình giữa các lần đếm (M).

Tính toán MĐTB theo công thức:

MĐTĐB (TB/mL) = $M \times \frac{16}{5} \times \text{số lần pha loãng} \times 10^4$ (Nếu mẫu có MĐTĐB cao)

Hoặc MĐTĐB (TB/mL) = $((M \times 16/5) / \text{hệ số cô đặc}) \times 10^4$ (nếu mẫu có MĐTĐB thấp)

2.2.2. Phương pháp xác định sinh trưởng bằng khối lượng khô

Sinh trưởng của *C. sorokiniana* DDH được đánh giá thông qua SKK của tế bào được xác định theo phương pháp của Đặng Diễm Hồng (2019) [12]. SKK được xác định bằng phương pháp sấy khô mẫu ở 105°C, thực hiện theo quy trình như sau: cốc cân được sấy ở 105°C trong 3 giờ. Lấy cốc ra và để nguội trong bình hút ẩm (desiccator) trong 10 phút. Khối lượng cốc được xác định bằng cách cân và lặp lại đến khi đạt giá trị không đổi ta được m_1 (g). Lấy 5 - 10 mL dịch tảo li tâm loại bỏ môi trường nuôi, rửa lại 2 lần bằng nước cất. Sinh khối tươi thu được được hòa lại bằng nước cất, chuyển vào cốc đã sấy khô và tiếp tục sấy ở 105 °C trong 24 giờ, rồi tiến hành cân khối lượng cốc và sinh khối. Quá trình sấy và cân được lặp lại cho đến khi khối lượng cân được không đổi là m_2 (g).

- Tính SKK của tảo theo công thức sau:

$$\text{SKK (g/L)} = ((m_2 - m_1)/10) \times 1000$$

Trong đó: m_1 là khối lượng khô của cốc cân

m_2 là khối lượng khô của (sinh khối tảo + cốc cân); lượng dịch lấy xác định sinh khối là 10 mL; 1000 là 1000 mL (tức là 1 L).

2.2.3. Phương pháp tách chiết EPSs từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH

Quá trình chiết xuất EPSs được thực hiện dựa theo công bố của Koçer và cộng sự (2021) [30] có một số thay đổi nhỏ cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Dịch nuôi cấy vi tảo sau khi ly tâm thu dịch nổi ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút sẽ được kết tủa protein bằng TCA 12% (w/v), giữ qua đêm ở 4 °C, trong điều kiện tĩnh. Sau đó, hỗn hợp dịch được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút để loại tủa protein. Bổ sung ethanol lạnh 96% (v/v) vào dịch nổi với tỷ lệ là 1:2 (dịch nổi: ethanol), tiếp tục giữ trong 24 giờ ở 4 °C. Sau đó, ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút, 4 °C và sấy khô ở 45 °C, thu được EPSs dạng bột khô.

2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng EPSs từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH

Phương pháp xác định hàm lượng EPSs được xác định theo công bố của Lê Thị Thúy Hằng (2017) [55]. Nguyên tắc: Hàm lượng đường trong EPSs được xác định thông qua phản ứng tạo màu đặc trưng giữa các sản phẩm phân hủy của đường trong môi trường axit sulfuric với phenol. Cường độ màu càng đậm, giá trị OD đo ở bước sóng 490 nm càng cao, phản ánh hàm lượng đường càng lớn. Glucose được sử dụng làm chất chuẩn trong quá trình phân tích.

Chuẩn bị: Phenol 5%: Hút 5mL dung dịch phenol và sử dụng nước cất định mức lên 100 mL, thu được dung dịch phenol 5%.

Xây dựng phương trình đường chuẩn

Glucose được pha ở các nồng độ 0 - 150 $\mu\text{g/mL}$ để làm đường chuẩn. Trộn hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL mẫu + 1 mL phenol 5 % + 5 mL H_2SO_4 đậm đặc, để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hỗn hợp được lắc đều và giữ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Tiến hành đo OD ở bước sóng 490 nm. Blank là mẫu phản ứng với nước cất. Từ kết quả thu được xây dựng được phương trình đường chuẩn: $Y = 176,98X - 25,24$ với ($R^2 = 0,9963$). Trong đó: Y là hàm lượng glucose ($\mu\text{g/mL}$); X là giá trị OD_{490nm}.

Tiến hành:

Cân m g, sử dụng nước cất hòa tan mẫu với nồng độ nhất định.

Trộn hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL mẫu + 1 mL phenol 5 % + 5 mL H_2SO_4 đậm đặc, để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau 20 phút, tiến hành đo OD ở bước sóng 490 nm. Blank là mẫu phản ứng với nước cất. Giá trị OD_{490nm} thu được được thay vào phương trình đường chuẩn trên tính được hàm lượng EPSs.

2.2.5. Phương pháp xác định hàm lượng lipid, protein, carotenoit

Hàm lượng lipid tổng số được xác định theo phương pháp Bligh và Dyer (1959) [56]. Phương pháp xác định hàm lượng protein được thực hiện theo phản ứng Bradford bằng thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 theo Bradford (1976) [58]. Hàm lượng carotenoit tổng số được xác định theo phương pháp Lichtenthal (1994) [57], có cải tiến phù hợp với điều kiện của Việt Nam theo Đặng Diễm Hồng, 2019 [12].

2.2.6. Phương pháp chụp ảnh hình thái bề mặt của EPSs bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy - SEM)

Đặc điểm hình thái bề mặt của EPSs được nghiên cứu bằng cách quan sát mẫu dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) trên thiết bị Hitachi S-4800

(Serial, HI-9022-0003, Nhật Bản), điện áp gia tốc 5.0 kV, dòng phát xạ 10mA ở các độ phóng đại khác nhau, tại Viện Khoa học Vật liệu, VAST. Quy trình xử lý mẫu: Nạo nhẹ mẫu cho vào ống ependorf có chứa dung dịch cacodylate 0,1 M, ly tâm 3000v/5phút (2-3 lần). Mẫu được cố định trong dung dịch 2,5-3% glutaraldehyde/ cacodylate 0,1M, pH = 7,2-7,4 (1 giờ hoặc qua đêm ở nhiệt độ 4°C). Sau đó, rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1M trong 5 phút mỗi lần, lặp lại 3 lần. Cố định mẫu bằng OsO₄ 1% trong cacodylate 0,1M - 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Mẫu tiếp tục được rửa bằng dung dịch cacodylate 0,1M (5 phút/lần x2). Hút nước trong mẫu bằng cồn các nồng độ 50°, 70°, 80°, 90°, 100° (5 phút/lần x2). Chuẩn bị để gắn mẫu sử dụng giấy bạc. Hòa loãng mẫu với nồng độ thích hợp trong cồn tuyệt đối, nhỏ mẫu lên giấy bạc đã được cố định trên đế, sau đó để khô hoàn toàn. Tiếp theo, mẫu được phủ một lớp kim loại dẫn điện Pt. Các mẫu đã chuẩn bị được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét Hitachi S-4800 (Serial, HI-9022-0003, Nhật Bản) [59].

2.2.7. Phương pháp xác định đặc điểm của EPSs bằng thông qua đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR)

Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) được đo để xác định dao động của các liên kết trong cấu trúc EPSs theo phương pháp của Shepel và cộng sự (2015) [60] bằng cách trộn mẫu và bột KBr tỷ lệ 1/1000 (w/w) và ép hỗn hợp dưới áp suất cao trên thiết bị Fourier IR InfraLUM FT-08 (Lumex Instruments, Nga) tại Viện Khoa học Vật liệu, VAST.

2.2.8. Xác định hoạt tính chống ô xy hóa bằng trung hòa gốc tự do bằng DPPH

Hoạt tính chống ô xy hóa của EPSs được xác định bằng khả năng trung hòa gốc tự do với 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) theo công bố Xiao và cộng sự (2020) [61]. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 517 nm bằng máy đọc vi phiên (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Hiệu quả loại bỏ gốc tự do dựa trên sự ức chế DPPH được tính bằng phần trăm (%) theo phương trình:

$$\% SA = [(OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) \times 100] / OD_{\text{đối chứng}} (\%)$$

Trong đó: OD_{đối chứng}: Độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử; OD_{mẫu thử}: Độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử.

Giá trị IC_{50} (Half maximal Inhibitory Concentration) được tính dựa vào đường chuẩn $y = ax + b$. Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu càng cao thì giá trị IC_{50} loại bỏ gốc tự do càng nhỏ.

2.2.9. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào khác nhau

Hoạt tính gây độc tế bào của EPSs được đánh giá trên các dòng tế bào KB (ung thư biểu mô miệng ở người); HepG2 (ung thư biểu mô tế bào gan ở người); A549 (ung thư phổi ở người) và MCF7 (ung thư vú ở người) bằng xét nghiệm khả năng sống sót của tế bào bằng MTT theo Mosmann (1983) [62], thí nghiệm được phân tích tại Trung tâm nghiên cứu và phát triển thuốc, Viện Hóa học, VAST. Tế bào được nuôi trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) dưới dạng nuôi cấy đơn lớp, bổ sung huyết thanh bê thai (10%), l-glutamine (200 mM) (1%), hỗn hợp penicillin (100 IU/mL) (1%) và streptomycin (100 g/ml) và nuôi cấy trong môi trường có 5% CO_2 ở 37 °C. Tế bào được nuôi trên đĩa nuôi cấy 96 giếng ở mật độ 10^5 tế bào/giếng và được xử lý bằng nồng độ EPSs tăng dần (4 - 256 μ g/mL) trong 72 giờ ở 37 °C. Sau thời gian phản ứng, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng 200 μ L môi trường chứa 0,5 mg/mL MTT. Các đĩa lại được ủ trong 3 giờ ở 37 °C. Sau đó, môi trường được thay thế bằng 200 μ L HCl/isopropanol (0,04 M) để hòa tan thuốc nhuộm màu tím đã chuyển đổi trong các đĩa nuôi cấy. Độ hấp thụ được xác định ở bước sóng 545 nm bằng máy đọc đĩa quang phổ. Khả năng sống của tế bào được tính theo phương trình:

$$[(\text{tế bào được xử lý } OD_{545nm}/\text{tế bào đối chứng } OD_{545nm}) \times 100]$$

Giá trị IC_{50} được định nghĩa là nồng độ gây ra chết 50% số lượng tế bào.

2.3. Bố trí thí nghiệm

2.3.1. Lựa chọn môi trường và tối ưu hóa điều kiện môi trường nuôi thích hợp cho sinh trưởng và hàm lượng EPSs cao ở *C. sorokiniana* DDH

Thí nghiệm khảo sát lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho tích lũy EPSs của C. sorokiniana DDH

Ba môi trường thí nghiệm được sử dụng để sàng lọc môi trường thích hợp cho sinh trưởng của *C. sorokiniana* DDH bao gồm Endo, C và BG-11. Mỗi công thức lặp lại 3 lần trong bình tam giác 1.000 mL có chứa 450 mL môi trường nuôi, nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Lấy 15 mL mẫu 1 lần/ngày để xác định SKK và chụp ảnh tế bào. Các ngày 4, 5, 6 thu 300 mL dịch tảo, trong đó 25 mL được sử dụng để xác định SKK, chụp ảnh tế bào và

xác định carotenoid. Toàn bộ dịch tảo còn lại sau ly tâm 6.000 vòng/ phút trong 6 phút được dùng xác định để xác định hàm lượng EPSs. Sinh khối thu được sau ly tâm được sấy khô để xác định các thông số protein, lipid.

Thí nghiệm lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp trong môi trường Endo

Các yếu tố nguồn cacbon, nguồn nitơ, nhiệt độ và ánh sáng được lựa chọn khảo sát do đây là những nhân tố môi trường ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trao đổi chất, sinh trưởng và tích lũy các hợp chất sinh học của vi tảo *C. sorokiniana*. Cacbon là nguồn nguyên liệu chính tham gia tổng hợp carbohydrate, lipid và các hợp chất thứ cấp như polysaccharide; trong khi nitơ là thành phần thiết yếu của protein, axit nucleic, enzyme và sắc tố quang hợp. Sự thay đổi về nguồn cung cấp cacbon và nitơ có thể làm thay đổi đáng kể tốc độ sinh trưởng cũng như định hướng phân bố dòng cacbon vào quá trình tổng hợp protein, lipid hoặc carbohydrate trong tế bào [64, 67].

Nhiệt độ và ánh sáng là hai yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động quang hợp và các phản ứng enzyme nội bào. *C. sorokiniana* DDH là loài vi tảo có khả năng thích nghi tốt với nhiệt độ tương đối cao, tuy nhiên sự thay đổi nhiệt độ vẫn tác động đáng kể đến hiệu suất quang hợp, hô hấp và tích lũy sinh khối. Tương tự, ánh sáng cung cấp năng lượng cho quá trình cố định cacbon nhưng cường độ ánh sáng quá cao có thể gây hiện tượng quang ức chế làm giảm hiệu quả quang hợp [68, 69, 71].

Do đó, việc khảo sát các yếu tố này là cần thiết nhằm xác định điều kiện tối ưu cho sinh trưởng và tích lũy sinh khối của *C. sorokiniana* DDH. Chính vì vậy, đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cacbon khác nhau (glucose, sodium acetate, mantose, nồng độ 30 g/L), nguồn nitơ khác nhau (KNO_3 , NaNO_3 , urê và NH_4Cl), tỷ lệ C/N (6:1, 12:1, 18:1 và 24:1 với nồng độ glucose cố định là 30 g/L), nhiệt độ (25, 28, 30, 32 và 34 °C) và ánh sáng (0, 100, 250, 350 và 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) với quang chu kỳ sáng: tối là 12: 12 giờ lên sinh trưởng và tích lũy EPSs ở *C. sorokiniana* DDH đã được tiến hành nghiên cứu. Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 1.000 mL có chứa 450 mL môi trường nuôi, lắc 200 vòng/ phút bằng máy lắc ổn nhiệt. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hàng ngày lấy mẫu để xác định sinh trưởng bằng cách xác định SKK. Đến ngày nuôi trồng thứ 4, 5 và 6, tiến hành thu 300 mL dịch nuôi tảo. Trong đó, 25 mL được sử dụng để xác định SKK, chụp ảnh tế

bào và xác định carotenoid. Phần dịch còn lại được ly tâm 6.000 vòng/ phút trong 6 phút để thu sinh khối và dịch nuôi. Sinh khối sẽ được sấy khô để xác định các thông số hàm lượng protein, lipit còn dịch nuôi được sử dụng để xác định hàm lượng EPSs. Thí nghiệm sau kế thừa kết quả thông số tối ưu được lựa chọn của thí nghiệm trước.

2.4. Xử lý số liệu

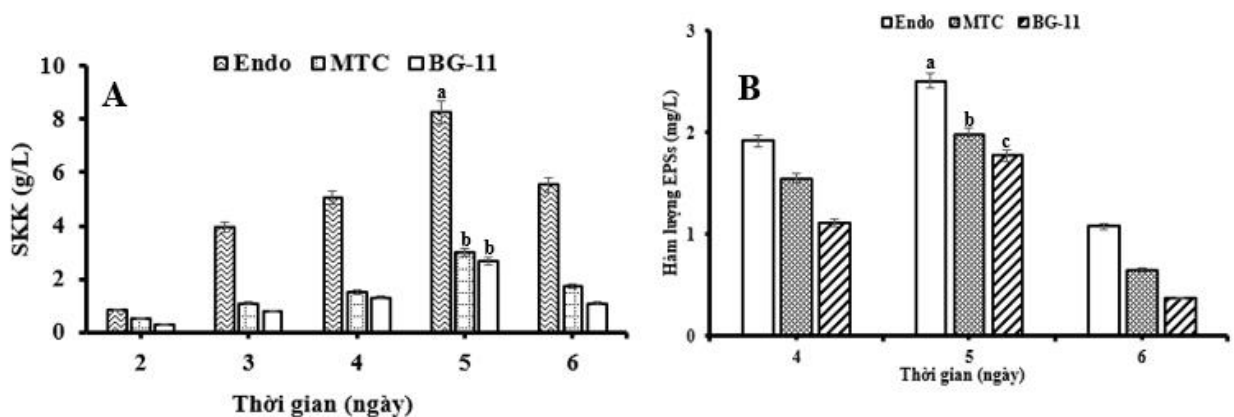
Mỗi thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp độc lập ($n = 3$). Kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (Mean \pm SD). Dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, đồng thời phân tích thống kê bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) trên phần mềm SPSS 16.0. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được xem là có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong chương này, các nội dung nghiên cứu chính của luận văn sẽ được trình bày và bao gồm: (1) ảnh hưởng của chủng giống, điều kiện nuôi cấy và dinh dưỡng đến sinh trưởng, tích lũy EPSs cao ở dịch nuôi vi tảo lục *C. sorokiniana*; (2) đặc điểm hình thái và cấu trúc bề mặt của EPSs tách chiết được từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH; (3) đánh giá hoạt tính sinh học của EPSs thu được nhằm định hướng ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

3.1. Lựa chọn môi trường nuôi và nghiên cứu điều kiện môi trường nuôi thích hợp cho sinh trưởng và tích lũy EPSs cao ở *C. sorokiniana* DDH

Chủng *C. sorokiniana* DDH đã lựa chọn được sàng lọc môi trường và điều kiện nuôi thích hợp cho tích lũy EPSs cao. Kết quả sự ảnh hưởng của 3 môi trường Endo, môi trường C (MTC) và BG-11 được thể hiện trên Hình 3.1.



Hình 3.1. Sinh trưởng (A) và hàm lượng EPSs (B) từ *C. sorokiniana* DDH nuôi trồng trong các môi trường khác nhau.

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

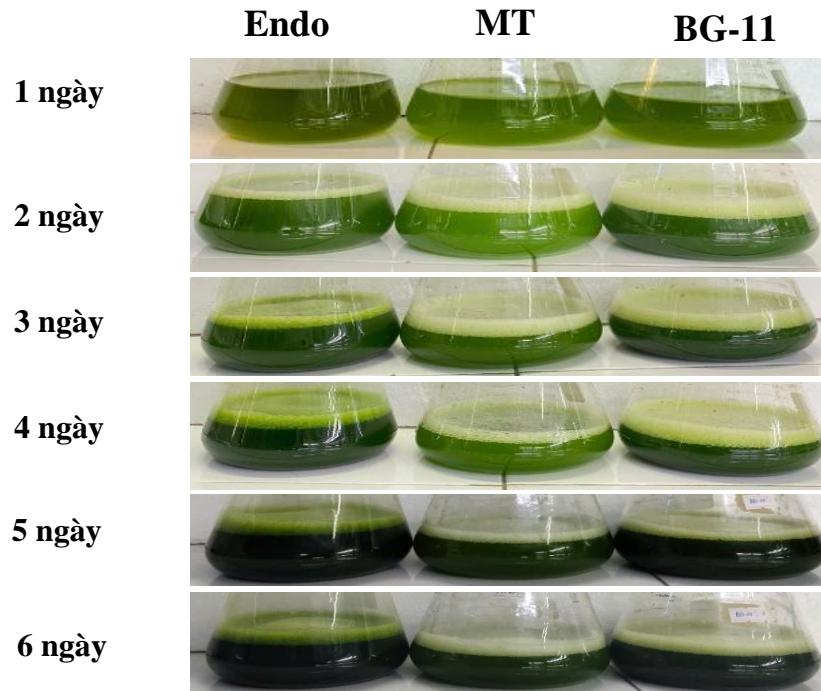
Kết quả được trình bày trong Hình 3.1 đã cho thấy chủng nghiên cứu có khả năng sinh trưởng trong cả ba môi trường nuôi cấy Endo, MTC và BG-11. Trong đó, môi trường Endo cho hiệu quả sinh trưởng và tích lũy EPSs cao nhất, đạt lần lượt $8,24 \pm 0,11$ g/L sinh khối và $2,51 \pm 0,06$ mg/L EPSs sau 5 ngày nuôi cấy, cao hơn đáng kể so với MTC và BG-11. Ở giai đoạn tiếp theo, cả sinh trưởng và hàm lượng EPSs đều có xu hướng giảm dần theo thời gian nuôi.

Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa môi trường Endo và hai môi trường còn lại có thể được giải thích bởi sự tối ưu về thành phần dinh dưỡng và sự cân bằng giữa các nguyên tố đa lượng và vi lượng. Môi trường

Endo có thể đã cung cấp điều kiện thuận lợi cho quá trình quang hợp, giúp tăng cường cố định cacbon thông qua chu trình Calvin, từ đó tạo ra nhiều tiền chất carbohydrate cho sinh tổng hợp polysaccharide [17,35]. Đồng thời, trong điều kiện dinh dưỡng phù hợp hoặc có xu hướng giới hạn nitơ tương đối, dòng cacbon trong tế bào có thể được chuyển hướng từ tổng hợp protein sang tích lũy carbohydrate, bao gồm EPSs [17,36]. Bên cạnh đó, sự hiện diện đầy đủ của các nguyên tố vi lượng như Fe, Mg hoặc Zn trong môi trường Endo có thể đóng vai trò cùng là các nhân tố tác động vào các enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa trung gian và tổng hợp nucleotide - tiền chất trực tiếp của EPSs [33]. Điều này thúc đẩy quá trình polymer hóa và bài tiết polysaccharide ra môi trường ngoại bào. Ngược lại, ở các môi trường C và BG-11, sự hạn chế về thành phần dinh dưỡng hoặc sự mất cân đối giữa các yếu tố môi trường có thể làm giảm hiệu suất quang hợp và chuyển hóa, dẫn đến giảm tích lũy sinh khối và [17]. Ngoài ra, sự suy giảm sinh trưởng và hàm lượng EPSs ở các ngày nuôi tiếp theo có thể liên quan đến việc cạn kiệt dinh dưỡng hoặc tích lũy các sản phẩm trao đổi chất ức chế, làm giảm hoạt động sinh lý của tế bào.

Từ những kết quả và phân tích nêu trên, môi trường Endo được xác định là môi trường nuôi cấy thích hợp và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm đạt được tốc độ sinh trưởng và tích lũy EPSs cao nhất.

Hình ảnh minh họa cho nhân nuôi *C. sorokiniana* DDH trong 3 môi trường gồm: Endo, MTC và BG-11 được chỉ ra trên Hình 3.2.

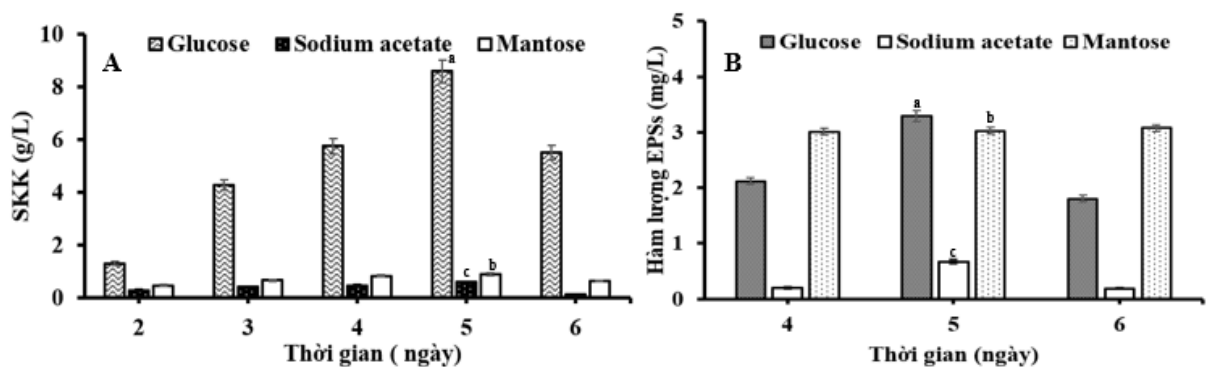


Hình 3.2. Ảnh minh họa nhân nuôi *C. sorokiniana* DDH trong 3 môi trường gồm: Endo, MTC và BG-11.

3.2. Lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp trong môi trường Endo

3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các nguồn cacbon khác nhau (glucose, maltose và sodium acetate) đến sinh trưởng và khả năng tích lũy EPSs của *C. sorokiniana* DDH được trình bày ở Hình 3.3.



Hình 3.3. Sinh trưởng (A) và hàm lượng EPSs (B) từ *C. sorokiniana* DDH nuôi trồng trong các nguồn cacbon khác nhau.

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

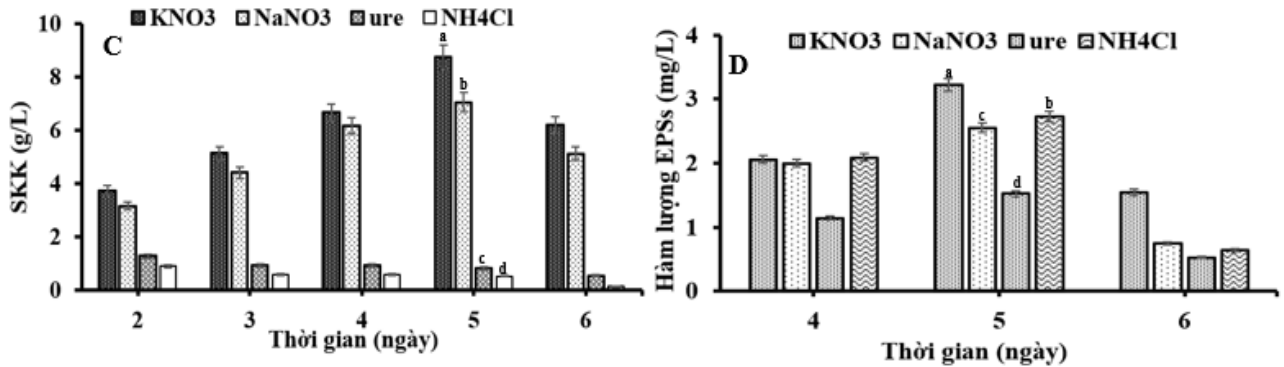
Từ các kết quả được chỉ ra ở Hình 3.3 đã cho thấy các nguồn cacbon khác nhau có ảnh hưởng đến sinh trưởng và tích lũy EPSs khác nhau. Trong đó, glucose là nguồn cacbon cho sinh trưởng và hàm lượng EPSs tốt nhất với SKK đạt $8,59 \pm 1,09$ g/L và hàm lượng EPS đạt $3,30 \pm 0,06$ mg/L sau 5 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, khi sử dụng maltose và sodium acetate, cả sinh trưởng và tích lũy EPSs đều thấp hơn đáng kể, với EPSs dao động từ 0,67 - 3,02 mg/L và sinh khối từ 0,48 - 0,91 g/L. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê giữa công thức nguồn cacbon là glucose với các công thức còn lại ($p < 0,05$). Hiệu quả vượt trội của glucose đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu về vi tảo, do glucose có thể được hấp thu trực tiếp và đi vào con đường đường phân (glycolysis), từ đó tạo ra các chất trung gian như glucose-6-phosphate và fructose-6-phosphate - các tiền chất đóng vai trò quan trọng cho sinh tổng hợp carbohydrate và polysaccharide. Theo Markou và Nerantzis (2013) [17], các nguồn cacbon dễ đồng hóa như glucose giúp tăng cường tích lũy các hợp chất giàu cacbon ở vi tảo thông qua việc thúc đẩy dòng chuyển hóa carbohydrate.

Ngược lại, sodium acetate được chuyển hóa thông qua acetyl-CoA và đi vào chu trình acid tricarboxylic, con đường chủ yếu liên quan đến sản xuất năng lượng hơn là tổng hợp carbohydrate [63]. Theo Chen và Johns (1991) [64], khi sử dụng acetate làm nguồn cacbon, dòng chuyển hóa cacbon ở vi tảo có xu hướng ưu tiên cho hô hấp và sinh năng lượng thay vì tích lũy carbohydrate. Điều này có thể giải thích cho việc hàm lượng EPSs thu được thấp hơn so với khi sử dụng glucose. Đối với maltose, mặc dù có thể cung cấp nguồn cacbon cho tế bào, nhưng cần trải qua quá trình thủy phân thành glucose trước khi tham gia vào các con đường chuyển hóa trung tâm, làm giảm hiệu quả sử dụng cacbon [64]. Bên cạnh đó, kết quả cho thấy mặc dù maltose cho hàm lượng EPSs tương đối cao ($3,03 \pm 0,18$ mg/L) nhưng sinh khối lại đạt thấp ($0,91 \pm 0,09$ g/L) đã cho thấy sự phân bổ cacbon chưa tối ưu cho tăng trưởng tế bào.

Ngoài yếu tố sinh học, yếu tố kinh tế cũng cần được xem xét trong định hướng ứng dụng. Maltose có giá thành cao hơn đáng kể so với glucose (cao gấp khoảng 14 lần), do đó không phù hợp cho sản xuất quy mô lớn. Vì vậy, xét trên cả hiệu quả sinh học và hiệu quả kinh tế, glucose được lựa chọn là nguồn cacbon phù hợp cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm nâng cao năng suất sinh khối và tích lũy EPSs.

3.2.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Kết quả nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau (KNO_3 , NaNO_3 , urê và NH_4Cl) đến sinh trưởng và khả năng tích lũy EPSs của *C. sorokiniana* được trình bày ở Hình 3.4.



Hình 3.4. Sinh trưởng (C) và hàm lượng EPSs (D) từ *C. sorokiniana* DDH nuôi trồng trong các nguồn nitơ khác nhau.

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

Kết quả nghiên cứu được chỉ ra trên Hình 3.4 đã cho thấy môi trường bổ sung KNO_3 cho hiệu quả sinh trưởng cao nhất, với sinh khối đạt $8,75 \pm 0,09$ g/L và hàm lượng EPSs đạt $3,23 \pm 0,09$ mg/L sau 5 ngày nuôi cấy. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nguồn nitơ khác, đặc biệt là urê và NH_4Cl . Theo giải thích của tác giả Taiz và cộng sự (2015) [65] đã cho thấy trong môi trường nuôi cấy vi tảo, KNO_3 cung cấp nitơ ở dạng nitrat (NO_3^-) là dạng nitơ phổ biến và ổn định được nhiều loài vi tảo sử dụng thông qua hệ enzyme nitrate reductase và nitrite reductase để đồng hóa vào sinh tổng hợp amino axit và protein [65]. Đồng thời, KNO_3 còn cung cấp ion K^+ - một nguyên tố thiết yếu tham gia điều hòa áp suất thẩm thấu, duy trì cân bằng ion và hoạt hóa nhiều enzyme liên quan đến quang hợp và chuyển hóa nội bào, từ đó thúc đẩy sinh trưởng tế bào [5].

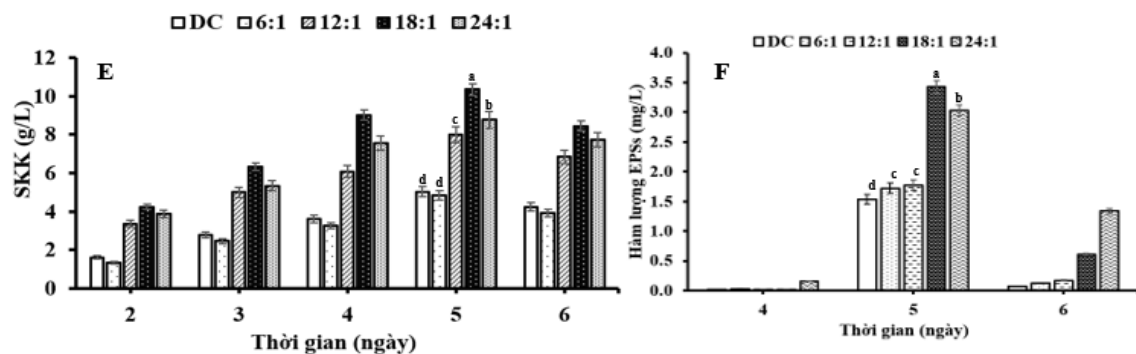
Hàm lượng EPSs cũng được ghi nhận tương đối tốt ở môi trường chứa NH_4Cl là $3,14 \pm 0,03$ mg/L. Điều này có thể liên quan đến đặc điểm chuyển hóa của nitơ dạng ammonium (NH_4^+), vốn có thể được tế bào hấp thu trực tiếp mà không cần qua quá trình khử như NO_3^- , từ đó tiết kiệm năng lượng cho tế bào và có thể thúc đẩy tích lũy các hợp chất thứ cấp trong một số điều kiện nhất định [65]. Tuy nhiên, việc sử dụng NH_4^+ cũng có thể gây ức chế sinh trưởng, do ảnh hưởng đến pH nội bào và cân bằng ion. Đối với urê, mặc dù vi tảo có

thể được sử dụng như nguồn nitơ hữu cơ, nhưng nguồn nitơ này cần được thủy phân thành NH_4^+ thông qua enzyme urease trước khi tham gia vào quá trình đồng hóa, làm giảm hiệu quả sử dụng nitơ so với dạng nitrat [17]. Bên cạnh đó, theo tác giả Li và cộng sự (2020) [66] quá trình sản xuất EPSs ở vi tảo đạt hiệu quả cao nhất khi điều kiện sinh trưởng được duy trì ổn định và tối ưu [66]. Kết quả thực nghiệm của chúng tôi đã cho thấy cả urê và NH_4Cl đều làm giảm đáng kể sinh trưởng của tảo với SKK chỉ đạt lần lượt $0,83 \pm 0,02$ và $0,54 \pm 0,02$ g/L sau 5 ngày nuôi.

Do đó, mặc dù NH_4Cl cho hàm lượng EPSs tương đối cao nhưng đã có sự suy giảm sinh trưởng xảy ra có thể đã làm giảm tổng sản lượng EPSs thu được. Vì vậy, xét trên cả hai yếu tố sinh trưởng và tích lũy EPSs, KNO_3 (4,8 g/L) được lựa chọn là nguồn nitơ phù hợp cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N

Tỷ lệ cacbon/nitơ (C/N) được xem là một trong những yếu tố then chốt điều chỉnh quá trình chuyển hóa trong tế bào vi tảo và quyết định sự phân bố cacbon giữa sinh trưởng và tích lũy các hợp chất thứ cấp như polysaccharide [67,68]. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các tỷ lệ C/N khác nhau (6:1, 12:1, 18:1 và 24:1) đến sinh trưởng và khả năng tích lũy EPSs của *C. sorokiniana* DDH (với nồng độ glucose cố định 30 g/L) được trình bày ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Sinh trưởng (E) và hàm lượng EPSs (F) từ *C. sorokiniana* DDH nuôi trong các tỷ lệ C/N khác nhau.

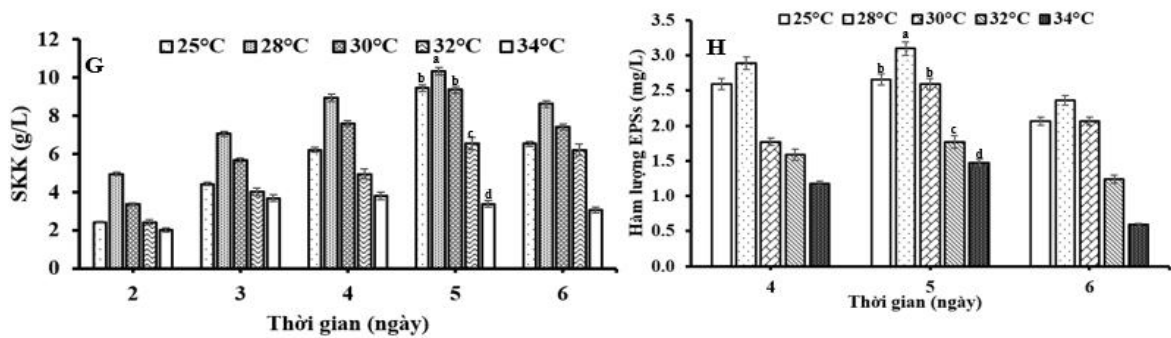
Các chữ số a, b, c, d tại cùng một thời điểm chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả được chỉ ra trên Hình 3.5 đã cho thấy vi tảo có khả năng sinh trưởng ở tất cả các tỷ lệ C/N đã được khảo sát, tuy nhiên, hiệu quả tối ưu đạt được tại tỷ lệ C/N = 18:1 với SKK cao nhất đạt $10,34 \pm 0,23$ g/L và hàm lượng

EPSs đạt $3,42 \pm 0,03$ mg/L sau 5 ngày nuôi cấy. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$) so với các tỉ lệ C/N còn lại. Khi tăng tỷ lệ C/N lên 24:1, mặc dù hàm lượng EPSs vẫn duy trì ở mức tương đối cao (đạt $3,03 \pm 0,09$ mg/L) nhưng sinh khối lại bị giảm xuống còn $8,78 \pm 0,01$ g/L đã cho thấy đã có sự hạn chế về sinh trưởng khi nguồn dinh dưỡng nitơ trở nên thiếu hụt. Ngược lại, ở các tỷ lệ C/N thấp (6:1 và 12:1), hàm lượng EPSs giảm đáng kể, chỉ đạt lần lượt $1,72 \pm 0,11$ mg/L và $1,78 \pm 0,04$ mg/L, phản ánh xu hướng ưu tiên tổng hợp protein và sinh trưởng tế bào khi nguồn dinh dưỡng nitơ dồi dào. Xu hướng này có thể được giải thích bởi cơ chế phân bổ dòng cacbon trong tế bào. Khi tỷ lệ C/N tăng, hoạt động tổng hợp protein bị hạn chế, dẫn đến việc cacbon dư thừa được chuyển hướng sang tích lũy carbohydrate, bao gồm polysaccharide [67]. Tuy nhiên, nếu mức thiếu hụt nitơ quá cao (như C/N = 24:1), quá trình sinh trưởng bị ức chế, làm giảm sinh trưởng và gián tiếp ảnh hưởng đến năng suất EPSs [68]. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với các công bố trước đây. Theo tác giả Li và cộng sự (2020) [66], việc tăng tỷ lệ C/N có thể làm tăng tích lũy carbohydrate ở vi tảo do chuyển hướng dòng cacbon từ sinh tổng hợp protein sang dự trữ năng lượng. Tương tự, Ma và cộng sự (2020) [67] cũng đã ghi nhận rằng ở điều kiện hạn chế nitơ, hàm lượng polysaccharide trong vi tảo có thể tăng đáng kể, mặc dù sinh trưởng bị giảm nếu mức thiếu hụt quá cao. Theo các tác giả Markou và cộng sự (2012) [17], đã nghiên cứu trên *C. vulgaris* cho thấy hàm lượng carbohydrate có thể tăng lên đáng kể ở điều kiện thiếu nitơ, trong khi sinh khối giảm, cho thấy xu hướng tương tự với kết quả thu được trong nghiên cứu của chúng tôi. Chính vì vậy, tỷ lệ C/N = 18:1 được xác định là điều kiện thích hợp và được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm đảm bảo sự cân bằng giữa sinh trưởng và tích lũy EPSs trong dịch nuôi cấy.

3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố môi trường quan trọng chi phối hoạt động enzyme và tốc độ các quá trình chuyển hóa trong tế bào vi tảo, từ đó tác động trực tiếp đến sinh trưởng và khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp như EPSs [69]. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các mức nhiệt độ khác nhau (25, 28, 30, 32 và 34°C) đến sinh trưởng và khả năng tích lũy EPSs của *C. sorokiniana* DDH được chỉ ra trên Hình 3.6.



Hình 3.6. Sinh trưởng (G) và hàm lượng EPSs (H) từ *C. sorokiniana* DDH nuôi trồng trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau.

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

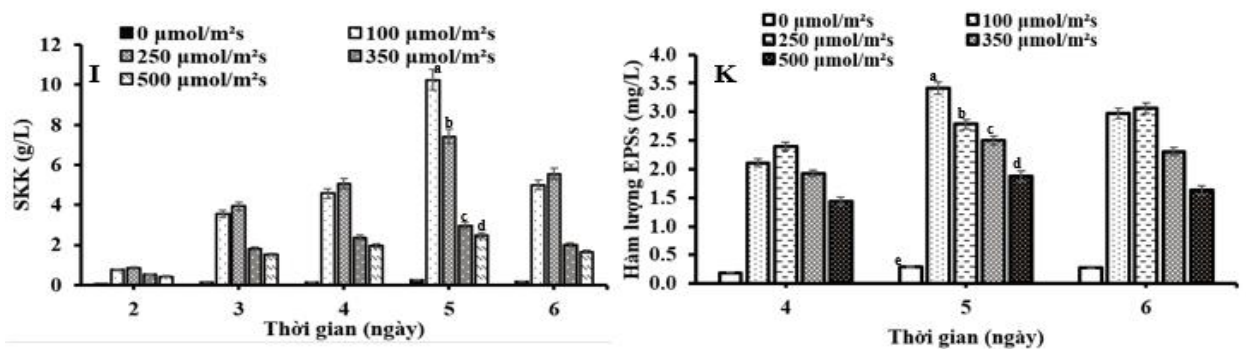
Kết quả nghiên cứu thu được được trình bày ở Hình 3.6 đã cho thấy *C. sorokiniana* DDH đạt sinh trưởng cao nhất tại 28°C, với SKK đạt $10,32 \pm 0,03$ g/L và hàm lượng EPSs đạt $3,10 \pm 0,01$ mg/L. Ở 30°C, sinh trưởng và tích lũy EPSs vẫn duy trì ở mức cao ($9,43 \pm 0,11$ g/L và $2,60 \pm 0,03$ mg/L), tuy nhiên thấp hơn so với 28°C. Khi nhiệt độ tăng lên 32-34°C, cả sinh khối và hàm lượng EPSs đều giảm rõ rệt, trong đó mức thấp nhất ghi nhận ở 34°C sau 6 ngày nuôi cấy. Xu hướng nêu trên có thể được giải thích dựa trên ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme và tính ổn định của hệ thống quang hợp. Ở khoảng nhiệt độ tối ưu (28 - 30°C) có thể các enzyme tham gia vào quá trình quang hợp, đường phân và sinh tổng hợp polysaccharide hoạt động có hiệu quả, góp phần tăng cường cố định cacbon và tích lũy carbohydrate [70]. Ngược lại, khi nhiệt độ vượt quá ngưỡng tối ưu, cấu trúc protein và enzyme có thể bị biến tính hoặc giảm hoạt tính, đồng thời làm suy giảm hiệu suất quang hợp do ảnh hưởng đến hệ sắc tố và màng thylakoid. Điều này dẫn đến giảm tốc độ sinh trưởng và khả năng tích lũy EPSs.

Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với các báo cáo trước đây của Kumar và cộng sự (2018), Ras và cộng sự (2013). Theo tác giả Kumar và cộng sự (2018) [70] đã ghi nhận các loài thuộc chi *Chlorella* có sinh trưởng và tích lũy polysaccharide tốt nhất trong khoảng 28 - 30°C, trong khi hiệu suất giảm đáng kể khi nhiệt độ tăng lên khoảng 35°C hoặc giảm xuống dưới 25°C. Tương tự, theo tác giả Ras và cộng sự (2013) [69] đã cho thấy nhiệt độ tối ưu cho sinh

trưởng của nhiều loài vi tảo lục thường nằm trong khoảng 25 - 30°C, vượt quá khoảng này sẽ làm giảm hiệu quả quang hợp và tích lũy sinh khối. Do đó, khoảng nhiệt độ 28 - 30°C được xác định là thích hợp nhất cho sinh trưởng và sản xuất EPSs của *C. sorokiniana* DDH.

3.2.5. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng

Ánh sáng là yếu tố môi trường ảnh hưởng đến hoạt động quang hợp, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và các quá trình chuyển hóa nội bào của vi tảo [68]. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các cường độ ánh sáng khác nhau (0, 100, 250, 350 và 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) đến sinh trưởng và khả năng tích lũy EPSs của *C. sorokiniana* DDH trình bày ở Hình 3.7.



Hình 3.7. Sinh trưởng (I) và hàm lượng EPSs (K) từ *C. sorokiniana* DDH nuôi trồng trong các điều kiện cường độ ánh sáng khác nhau.

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

Sau 6 ngày nuôi cấy, vi tảo đạt sinh trưởng tốt nhất tại cường độ ánh sáng 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, với SKK đạt $10,24 \pm 0,15$ g/L và hàm lượng EPS đạt $3,43 \pm 0,06$ mg/L (Hình 3.7). Khi tăng cường độ ánh sáng lên 250 - 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, cả sinh trưởng và tích lũy EPSs đều giảm dần, cho thấy sự ức chế sinh lý dưới điều kiện ánh sáng cao. Kết quả này phù hợp với các công bố trước đây của Chang và cộng sự (2017), Aro và cộng sự (1993), Murata và cộng sự (2007), Takahashi và Murata (2008), Ras và cộng sự (2013) và Richmond (2004) [68, 71, 72, 73, 69, 11]. Ở mức ánh sáng trung bình (khoảng 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), hệ sắc tố quang hợp và chuỗi vận chuyển electron hoạt động hiệu quả, tối ưu hóa quá trình cố định CO_2 và cung cấp tiền chất cho sinh tổng hợp carbohydrate, bao gồm EPSs [68]. Ngược lại, khi cường độ ánh sáng vượt quá ngưỡng tối ưu, hiện tượng quang ức chế có thể xảy ra. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, ánh sáng cường độ cao có thể dẫn đến sự hình thành các ROS (Reactive Oxygen Species) gây

tổn thương lên cấu trúc của bộ máy quang hợp, đặc biệt là lên protein D1 của photosystem II (PSII), từ đó làm suy giảm quá trình vận chuyển electron và hiệu suất quang hợp [71,72,73]. Theo Ras và cộng sự (2013) [69], nhiều loài vi tảo lục đạt sinh trưởng tối ưu ở cường độ ánh sáng trung bình (khoảng 50 - 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), trong khi cường độ cao hơn có thể gây quang ức chế và làm giảm hiệu suất quang hợp. Ngoài ra, Richmond (2004) [11] cho thấy sinh trưởng của vi tảo tăng theo cường độ ánh sáng đến một ngưỡng bão hòa, sau đó giảm khi xảy ra hiện tượng quang ức chế, các loài thuộc chi *Chlorella* thường nằm trong khoảng 100 - 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Chính vì vậy, cường độ ánh sáng 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ được xác định là điều kiện ánh sáng thích hợp nhất cho sinh trưởng và tích lũy EPSs của *C. sorokiniana* DDH và được lựa chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tóm lại, từ các thí nghiệm lựa chọn điều kiện môi trường thích hợp trên cho thấy điều kiện nuôi cấy phù hợp cho sự tích lũy cao EPSs ở dịch nuôi cấy C. sorokiniana DDH được xác định dựa trên sự phối hợp đồng thời của các yếu tố dinh dưỡng và môi trường. Cụ thể, môi trường Endo bổ sung glucose (30 g/L) làm nguồn cacbon, KNO₃ (4,8 g/L) làm nguồn nitơ, với tỷ lệ C/N là 18:1, kết hợp với nhiệt độ nuôi 28°C và cường độ chiếu sáng 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ đã tạo ra điều kiện thuận lợi cho cả sinh trưởng và tích lũy EPSs ở C. sorokiniana.



Hình 3.8. Hình ảnh minh họa một số quá trình thí nghiệm khảo sát các điều kiện nuôi *C. sorokiniana* DDH.

Ghi chú: a: Khử trùng môi trường; b: vào giống; c, d, e: Thí nghiệm các điều kiện khác nhau; f, g, h: xác định sinh khối tươi; i: tách chiết protein; k: tách chiết EPSs

3.3. Nhân nuôi và xác định thành phần dinh dưỡng của *C. sorokiniana* DDH

Dưới các điều kiện thích hợp nêu trên, *C. sorokiniana* DDH được nuôi cấy trong bình tam giác 1.000 mL nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng ở quy mô thí nghiệm. Sau 5 ngày nuôi, sinh khối tảo được thu nhận để phân tích thành phần dinh dưỡng, đồng thời dịch nuôi được sử dụng để xác định hàm lượng EPSs nhằm làm cơ sở đánh giá hiệu quả của các điều kiện đã lựa chọn ở trên. Kết quả thu được được trình bày ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Sinh trưởng và thành phần dinh dưỡng trong sinh khối và dịch nuôi của *C. sorokiniana* DDH nuôi trồng được sau 5 ngày nuôi cấy

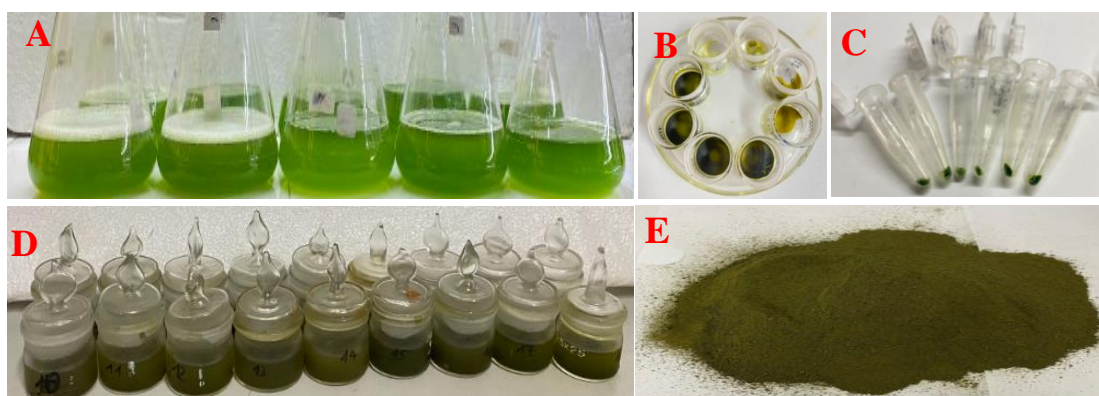
Loài	SKK (g/L)	Hàm lượng protein (% SKK)	Hàm lượng lipit (% SKK)	Hàm lượng EPSs (mg/L)	Hàm lượng carotenoid ($\mu\text{g/g}$ SKK)
<i>C. sorokiniana</i> DDH	$10,35 \pm 0,11$	$16,32 \pm 0,21$	$21,53 \pm 0,90$	$3,65 \pm 1,19$	$71,00 \pm 1,90$

Kết quả trình bày trong Bảng 3.1 cho thấy SKK, thành phần dinh dưỡng (protein, lipit, carotenoit) của *C. sorokiniana* DDH cùng với hàm lượng EPSs trong dịch nuôi cấy đạt lần lượt là $10,35 \pm 0,11$ g/L; $16,32 \pm 0,21$ %SKK; $21,53 \pm 0,90$ %SKK; $71,00 \pm 1,90$ μ g/g SKK và $3,65 \pm 1,19$ mg/L, tương ứng.

Các kết quả này cho thấy dưới điều kiện nuôi cấy thích hợp đã được lựa chọn *C. sorokiniana* DDH không chỉ duy trì sinh trưởng ổn định mà còn tạo sinh khối có giá trị dinh dưỡng đáng kể, đặc biệt về hàm lượng protein và lipit. So với các nghiên cứu trước đây, hàm lượng protein của *Chlorella* thường dao động trong khoảng 10 - 50% SKK, trong khi lipit nằm trong khoảng 10 - 30% SKK tùy theo điều kiện nuôi cấy [17,74], cho thấy các giá trị ghi nhận trong nghiên cứu này phù hợp với các công bố nêu trên.

Bên cạnh đó, hàm lượng carotenoit ghi nhận được cũng phản ánh tiềm năng chống oxy hóa của sinh khối vi tảo, góp phần gia tăng giá trị ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng. Đồng thời, việc thu nhận EPSs trong dịch nuôi với hàm lượng ổn định cho thấy khả năng khai thác song song cả sinh khối và dịch nuôi, mở ra hướng tiếp cận tích hợp trong khai thác vi tảo. Một kết quả quan trọng của nghiên cứu là khả năng tách chiết EPSs trực tiếp từ dịch nuôi cấy vi tảo *C. sorokiniana* DDH. Trong các hệ thống sản xuất vi tảo thông thường, dịch nuôi tảo sau thu sinh khối thường bị thải bỏ, gây lãng phí và tăng chi phí xử lý. Việc thu hồi EPSs từ dịch nuôi cấy này giúp tận dụng toàn bộ sản phẩm tạo ra, gia tăng đáng kể giá trị kinh tế, giảm tải xử lý nước thải và tích hợp vào mô hình sinh học tuần hoàn, nơi sinh khối, lipit, sắc tố và EPSs đều được thu hồi trong một quy trình duy nhất. Điều này củng cố cho vị thế của *C. sorokiniana* DDH được xem là một ứng viên hàng đầu sản xuất EPSs ở quy mô công nghiệp.

Chính vì vậy, *C. sorokiniana* DDH được đánh giá là đối tượng tiềm năng cho sản xuất sinh khối giàu dinh dưỡng phục vụ thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, đồng thời là nguồn nguyên liệu khả thi cho thu nhận polysaccharide ngoại bào định hướng ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.



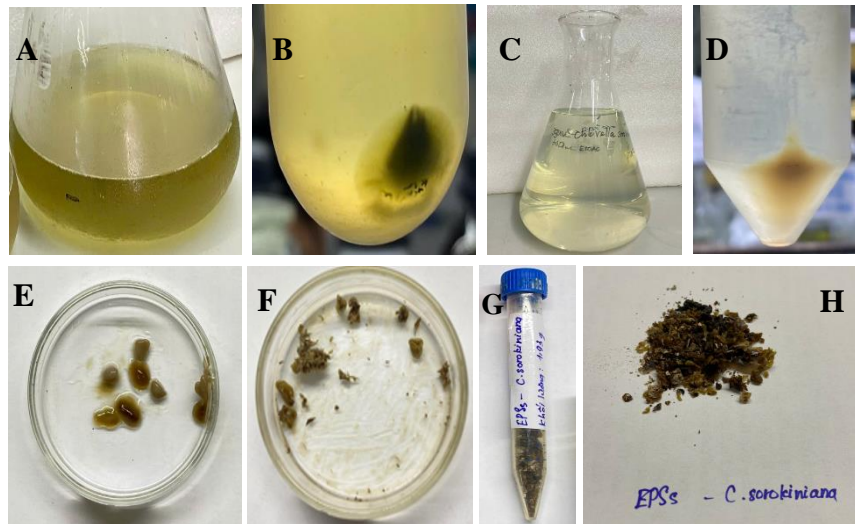
Hình 3.9. Một số hình ảnh minh họa một số quá trình thí nghiệm khảo sát các điều kiện nuôi *C. sorokiniana* DDH.

Ghi chú: A: Các bình nhân nuôi C. sorokiniana DDH; B, C, D: Xác định sinh khối khô tế bào; E: SKK C. sorokiniana DDH thu được

3.4. Tách chiết EPSs từ dịch nuôi loài *C. sorokiniana* DDH

Dựa trên các điều kiện nuôi cấy đã được thích hợp bao gồm môi trường Endo bổ sung glucose (30 g/L) làm nguồn cacbon, KNO_3 (4,8 g/L) làm nguồn nitơ, tỷ lệ C/N = 18:1, nhiệt độ 28°C và cường độ ánh sáng 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, *C. sorokiniana* DDH được nuôi cấy trong bình tam giác thể tích 1.000 mL nhằm thu nhận dịch nuôi giàu polysaccharide ngoại bào (EPSs).

Sau thời gian nuôi cấy, dịch nuôi được xử lý theo phương pháp đã được công bố của Koçer và đồng tác giả (2021) [30], với bước loại protein bằng acid trichloroacetic (TCA) 12% (w/v) nhằm loại bỏ các tạp chất protein hòa tan, qua đó tăng độ tinh sạch của EPSs trong dịch nổi. Tiếp theo, polysaccharide được kết tủa bằng ethanol lạnh 96% theo tỷ lệ 1:2 (dịch nổi: ethanol), dựa trên nguyên lý giảm độ hòa tan của polymer trong dung môi hữu cơ, từ đó thu hồi EPSs hiệu quả. Phần kết tủa sau đó được thu nhận, sấy khô ở 45°C và bảo quản ở 4°C để hạn chế biến đổi cấu trúc. Mẫu EPSs thu được được sử dụng cho các phân tích tiếp theo nhằm khảo sát đặc điểm hình thái và cấu trúc bề mặt, làm cơ sở cho việc xác định tiềm năng ứng dụng của hợp chất này.

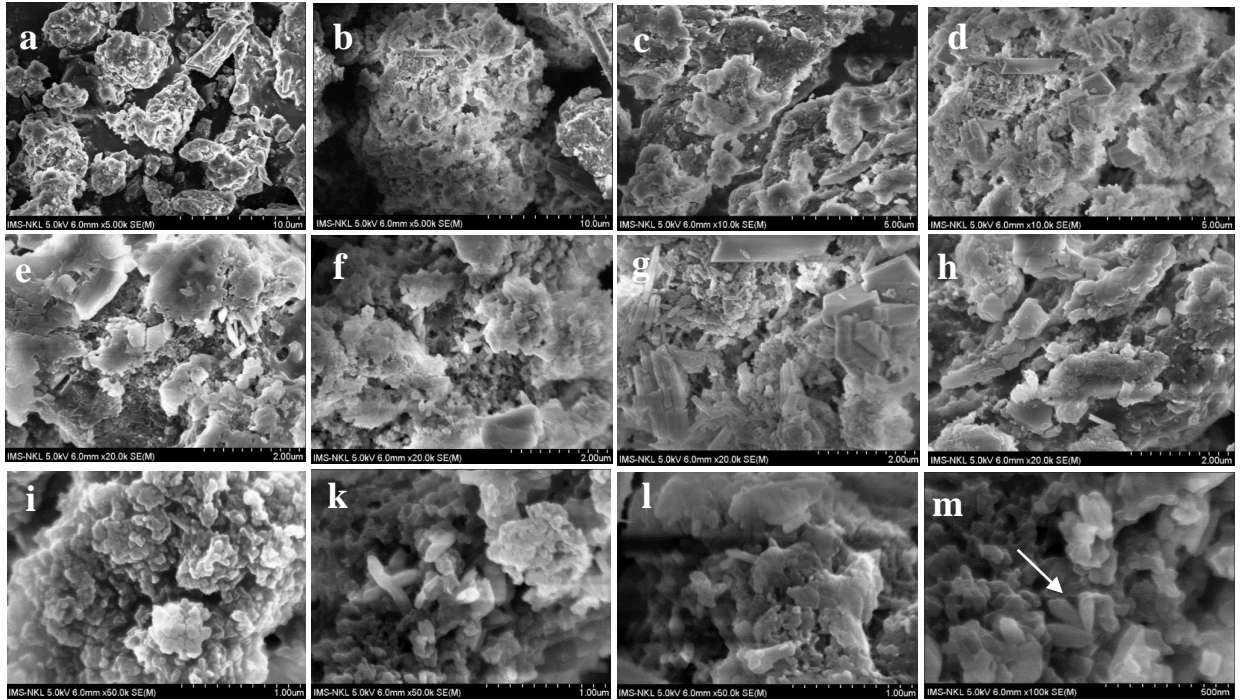


Hình 3.10. Hình ảnh minh họa cho quá trình tách chiết EPSs từ dịch nuôi cấy vi tảo lục *C. sorokiniana* DDH.

Ghi chú: (A) Dịch nuôi sau bổ sung TCA nồng độ 12% (w/v); (B) Ly tâm loại protein; (C) Bổ sung cồn vào mẫu theo tỷ lệ 2:1 (v/v); (D) Ly tâm thu EPS (E) EPSs sau ly tâm; (F, G, H) EPSs sau sấy.

3.5. Quan sát hình thái và cấu trúc bề mặt của EPSs tách chiết được bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM - Scanning Electron Microscopy)

Quan sát hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét SEM của EPSs (Hình 3.11) đã có thể thấy bề mặt mẫu EPSs là dạng vô định hình, không hoàn toàn trơn láng; có thể quan sát thấy có các vùng gồ ghề hoặc hạt nhỏ li ti với hình dạng không đều. Ảnh chụp SEM có thể thấy vùng mờ bao quanh đây là đặc trưng của lớp màng nhầy polysaccharide. Lớp này không có đường viền rõ rệt như thành tế bào mà xuất hiện dạng màng mỏng hoặc lớp phủ trên bề mặt và đôi khi kéo dài thành các sợi mảnh nối giữa các tế bào. Điều này có thể chứng minh vai trò tiềm năng trong kết dính và hình thành biofilm của EPSs. Kết quả trong nghiên cứu thu được ở đây của chúng tôi đã có sự tương đồng với công bố của Sirin and Aslim (2020) [74] về đặc điểm của EPSs có nguồn gốc từ vi khuẩn *Lactobacillus* có đặc điểm thô ráp và xốp. Chúng có cấu trúc sắp xếp liên kết yếu hoặc vô định hình (tinh thể yếu). Như vậy, hình ảnh SEM của EPSs cung cấp thêm bằng chứng rằng EPSs được tiết ra môi trường nuôi, vừa bao bọc tế bào vừa tham gia tương tác ngoại bào.



Hình 3.11. Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) của EPSs được tách chiết từ dịch nuôi của loài *C. sorokiniana* DDH sau 5 ngày nuôi trồng.

Ghi chú: các độ phóng đại lần lượt là 5X (a, b); 10X (c, d); 20X (e, f, g, h), 50X (i, k, l) và 100X (m), thanh thước đo được hiển thị trên hình.

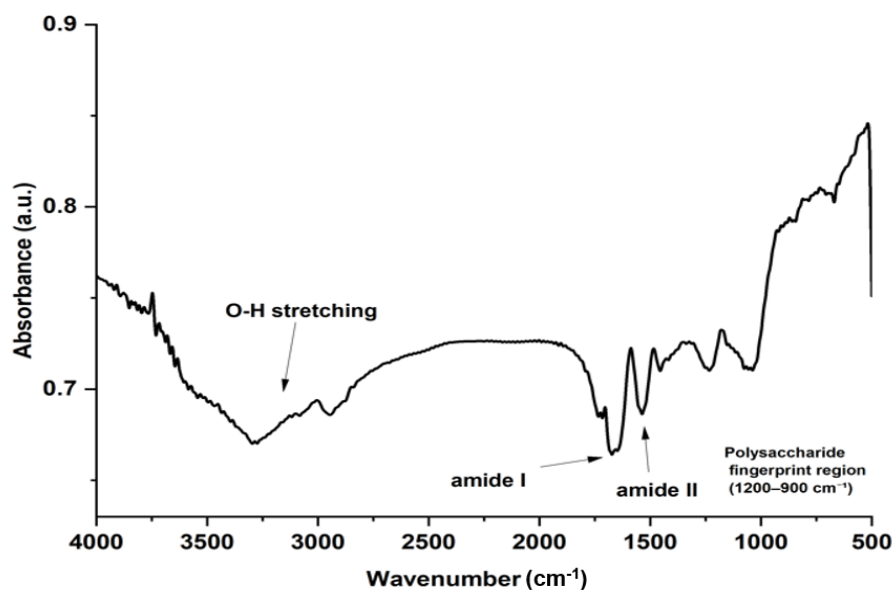
Cấu trúc bề mặt không đồng nhất và dạng mạng lưới của EPSs có ý nghĩa quan trọng trong các quá trình tương tác ngoại bào. Theo De Philippis và Vincenzini (1998) [34], EPSs từ vi tảo và vi khuẩn có vai trò như một “ma trận ngoại bào”, giúp tăng khả năng kết dính giữa các tế bào và bề mặt, từ đó thúc đẩy hình thành biofilm. Các cấu trúc dạng sợi và lớp màng quan sát được trong nghiên cứu này có thể tạo điều kiện cho việc giữ nước, giữ chất dinh dưỡng và bảo vệ tế bào khỏi các tác động bất lợi từ môi trường.

Ngoài ra, khi kết hợp với kết quả phân tích bằng phổ hồng ngoại biến đổi (FTIR) đã cung cấp thêm cơ sở khoa học có thể xác định sự hiện diện của các nhóm chức như hydroxyl và carboxyl trong EPSs không chỉ góp phần vào hoạt tính chống oxy hóa mà còn tăng khả năng tạo liên kết hydro giữa các phân tử, từ đó hình thành cấu trúc mạng lưới bền vững nhưng linh hoạt. Chính đặc điểm này giúp EPSs vừa đóng vai trò bảo vệ tế bào, vừa tham gia vào các tương tác sinh học ở môi trường ngoại bào.

Như vậy, hình ảnh SEM không chỉ cung cấp bằng chứng trực quan về sự hiện diện của EPSs trong môi trường nuôi mà còn góp phần làm rõ mối liên hệ giữa cấu trúc hình thái và chức năng sinh học của hợp chất này. Sự kết hợp giữa cấu trúc vô định hình, khả năng tạo mạng lưới là cơ sở quan trọng giải thích các đặc tính sinh học như khả năng chống oxy hóa, kết dính và bảo vệ tế bào của EPSs từ *C. sorokiniana* DDH.

3.6. Đặc điểm của EPSs thu được từ *C. sorokiniana* DDH thông qua phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Phổ FTIR thu được (Hình 3.12) đã cho thấy một dải tần số rộng ở khoảng $\sim 3300-3000\text{ cm}^{-1}$, tương ứng với dao động kéo giãn O-H của nhóm hydroxyl và nước hấp phụ, phản ánh mạng lưới liên kết hydro đặc trưng của polysaccharide sinh học [75]. Hai dải hấp thụ nổi bật ở khoảng 1650 cm^{-1} (amide I) và 1540 cm^{-1} (amide II) lần lượt đại diện cho dao động kéo giãn C=O và dao động uốn N-H/kéo giãn C-N, phù hợp với mô tả về EPSs của Wingender và cộng sự (1999) [76]. Vùng giữa $1200 - 900\text{ cm}^{-1}$ thể hiện nhiều dao động liên tục tương ứng với vùng chỉ điểm/vân tay của polysaccharide, cho thấy liên kết glycosidic C-O-C và dao động kéo giãn C-O trong cấu trúc vòng pyranose; đây là những đặc điểm rất đặc trưng của polysaccharide mạch dài. Đáng chú ý, phân bố đỉnh và cường độ trong vùng này tương tự với phổ EPSs của vi tảo đã được báo cáo bởi Koçer và cộng sự (2021) [30] đã công bố với các dải tần số mạnh ở $1150-1020\text{ cm}^{-1}$ được xác định là các dấu hiệu cấu trúc đặc trưng cho EPSs của tảo. Ngoài ra, một số tần số dao động yếu được quan sát thấy trong vùng $\sim 650-500\text{ cm}^{-1}$, tương ứng với biến dạng mặt phẳng ngoài và dao động khung của vòng pyranose, thường được tìm thấy trong các polysaccharide có cấu trúc vòng đã được Synytsya & Novák (2014) [77] đã công bố và ở phổ EPSs của vi tảo do Koçer và cộng sự (2021) [30] đã công bố. Sự hiện diện của các tần xuất dao động này đã cung cấp thêm bằng chứng hỗ trợ bản chất polysaccharide thu được từ môi trường nuôi *C. sorokiniana* DDH.



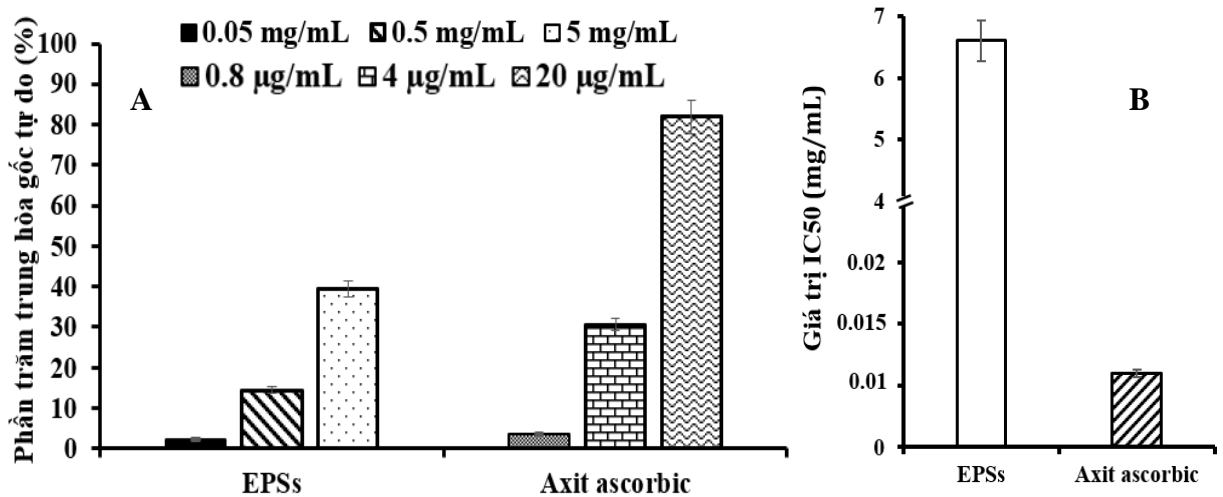
Hình 3.12. Hình ảnh phổ FTIR của EPSs thu được ở *C. sorokiniana* DDH

Từ các đặc điểm cấu trúc này, có thể thấy sự hiện diện dày đặc của các nhóm hydroxyl (-OH) đóng vai trò quan trọng trong khả năng chống oxy hóa của EPSs, thông qua cơ chế cho hydrogen hoặc electron để trung hòa các gốc tự do như DPPH [27]. Đồng thời, các nhóm carboxyl và axit uronic có thể tham gia vào quá trình tạo phức với ion kim loại, góp phần hạn chế sự hình thành ROS trong hệ thống sinh học. Ngược lại, mức độ sulfate hóa thấp và cấu trúc chủ yếu gồm các đường trung tính khiến EPSs ít có khả năng tương tác mạnh với màng tế bào hoặc các thụ thể sinh học, từ đó không kích hoạt các cơ chế gây chết tế bào như apoptosis. So sánh với các nghiên cứu trước đây, nhiều tác giả đã chỉ ra rằng polysaccharide có mức độ sulfate hóa cao hoặc cấu trúc phân nhánh phức tạp thường thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh hơn, trong khi các polysaccharide trung tính lại thiên về hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ tế bào [75,78].

Từ kết quả thu được được trình bày ở trên, có thể khẳng định rằng cấu trúc hóa học của EPSs thu từ dịch nuôi vi tảo lục *C. sorokiniana* DDH có đặc trưng bởi sự hiện diện của các nhóm hydroxyl, liên kết glycosidic và hàm lượng sulfate hóa thấp là yếu tố quyết định định hướng hoạt tính sinh học theo hướng chống oxy hóa và bảo vệ tế bào, phù hợp với định hướng ứng dụng thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

3.7. Hoạt tính chống oxy hóa của EPSs thu được từ dịch nuôi cấy *C. sorokiniana* DDH

Khảo sát đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của EPSs từ *C. sorokiniana* DDH thông qua phép thử DPPH được trình bày ở Hình 3.13.



Hình 3.13. Phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH (%) (A) và giá trị IC₅₀ (mg/mL) (B) của EPSs thu được từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH.

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

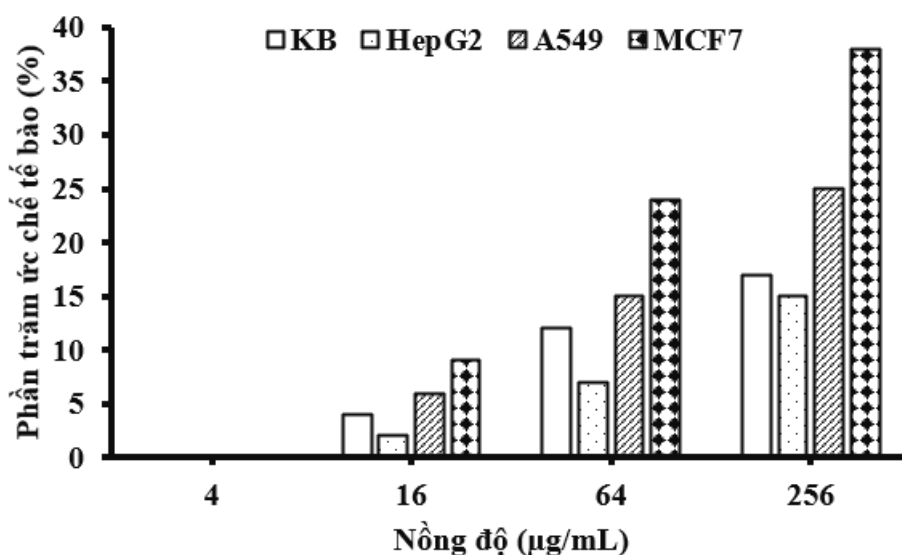
Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Hình 3.13 đã cho thấy EPSs thu nhận từ *C. sorokiniana* DDH có khả năng kháng oxy hóa phụ thuộc nồng độ, thể hiện qua khả năng trung hòa gốc tự do DPPH tăng dần từ 2,32% ở 0,05 mg/mL lên 14,45% ở 0,5 mg/mL và đạt 39,41% tại 5 mg/mL. Giá trị IC₅₀ xác định được là $6,60 \pm 0,91$ mg/mL, cho thấy hiệu quả chống oxy hóa ở mức trung bình. Trong khi đó, chất đối chứng dương là axit ascorbic thể hiện hoạt tính mạnh hơn đáng kể với IC₅₀ đạt 0,012 mg/mL. So sánh với các nghiên cứu của tác giả Zhang và cộng sự (2019) [79] đã công bố EPSs từ dịch nuôi cấy *C. zofingiensis* và *C. vulgaris* có khả năng trung hòa DPPH lần lượt đạt 71,5% và 59,6% tại nồng độ 3 mg/mL, với giá trị IC₅₀ tương ứng là 1,57 và 1,86 mg/mL. Như vậy, EPSs trong nghiên cứu của chúng tôi có hoạt tính chống oxy hóa thấp hơn đáng kể, thể hiện qua giá trị IC₅₀ cao hơn. Sự khác biệt này có thể được lý giải bởi nhiều yếu tố liên quan đến sự khác nhau về loài *Chlorella* được sử dụng (*C. sorokiniana* DDH so với *C. zofingiensis* và *C. vulgaris*) và đặc điểm cấu trúc của EPS. Theo De Philippis và Vincenzini (1998) [34], hoạt tính sinh học

của polysaccharide phụ thuộc mạnh vào thành phần monosaccharide, khối lượng phân tử và sự hiện diện của các nhóm chức như sulfate hoặc axit uronic. Ngoài ra, phương pháp tách chiết và điều kiện nuôi cấy cũng có thể ảnh hưởng đến cấu trúc và độ tinh sạch của EPSs, từ đó tác động đến hoạt tính chống oxy hóa. Bên cạnh đó, sự khác biệt về loài và điều kiện sinh trưởng cũng được xem là yếu tố quan trọng quyết định đặc tính sinh học của polysaccharide từ vi tảo [75].

Mặc dù, hoạt tính chống oxy hóa của EPSs thu được trong nghiên cứu này chưa cao so với một số báo cáo trước đây, kết quả nghiên cứu thu được của chúng tôi vẫn cho thấy tiềm năng khai thác EPSs từ dịch nuôi trồng *C. sorokiniana* như một nguồn hợp chất sinh học tự nhiên có hoạt tính chống ô xy hóa trung bình trong điều kiện của phòng thí nghiệm.

3.8. Hoạt tính gây độc tế bào của EPSs thu từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH trên các dòng tế bào khác nhau

Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào của EPSs thu từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH trên các dòng tế bào khác nhau (KB, HepG2, A549 và MCF7) được trình bày ở Hình 3.14.



Hình 3.14. Phần trăm ức chế tế bào (%) của EPSs thu được từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH trên các dòng tế bào khác nhau.

Kết quả nghiên cứu thu được về phần trăm ức chế các dòng tế bào của EPSs từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH (Hình 3.14) không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh, mức ức chế tối đa chỉ đạt 38% trên dòng MCF7 tại nồng

độ cao nhất (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), trong khi các dòng tế bào khác như A549, KB và HepG2 lần lượt đạt khoảng 25%, 17% và 15%. Ở các nồng độ thấp hơn (4 - 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), hoạt tính ức chế ghi nhận rất thấp hoặc không đáng kể. Ngoài ra, không có giá trị nào đạt ngưỡng 50% ức chế, do đó IC_{50} không xác định được trong khoảng nồng độ khảo sát ($\text{IC}_{50} \leq 256 \mu\text{g}/\text{mL}$). Kết quả này có thể được giải thích dựa trên đặc điểm cấu trúc của polysaccharide. Nhìn chung, hoạt tính sinh học của EPSs phụ thuộc chặt chẽ vào các yếu tố cấu trúc như thành phần monosaccharide, khối lượng phân tử, mức độ phân nhánh và sự hiện diện của các nhóm chức (ví dụ: sulfate, axit uronic hoặc protein liên kết) [27].

Trong trường hợp của EPSs thu được từ vi tảo lục, thành phần thường giàu các đường trung tính như glucose, galactose và mannose với mức độ sulfate hóa thấp. Các polysaccharide dạng này thường không mang điện tích mạnh và ít tương tác trực tiếp với màng tế bào, do đó không gây phá hủy cấu trúc tế bào hoặc kích hoạt các cơ chế gây chết tế bào như apoptosis hay necrosis [75]. Điều này lý giải vì sao EPSs trong nghiên cứu này không đạt ngưỡng gây độc tế bào ($\text{IC}_{50} \leq 256 \mu\text{g}/\text{mL}$). Ngược lại, các đặc điểm cấu trúc này lại thuận lợi cho hoạt tính chống oxy hóa. Các nhóm hydroxyl (-OH) dồi dào trong cấu trúc polysaccharide có khả năng cho electron hoặc hydrogen để trung hòa các gốc tự do, từ đó làm giảm stress oxy hóa trong tế bào. Ngoài ra, nếu EPSs có chứa một lượng nhỏ nhóm axit uronic hoặc protein liên kết, khả năng tạo phức với ion kim loại (metal chelation) cũng có thể góp phần hạn chế quá trình tạo ROS thông qua phản ứng Fenton [27,80].

So sánh với các polysaccharide có hoạt tính gây độc tế bào mạnh hơn, nhiều nghiên cứu đã cho thấy các EPSs có hàm lượng sulfate cao hoặc cấu trúc phân nhánh phức tạp thường có khả năng tương tác với màng tế bào hoặc thụ thể bề mặt, từ đó kích hoạt các con đường tín hiệu dẫn đến gây chết tế bào theo chu trình (apoptois) [78]. Do đó, sự khác biệt về hoạt tính giữa các nghiên cứu có thể bắt nguồn không chỉ từ sự khác biệt về cấu trúc hóa học của EPSs mà còn chịu ảnh hưởng bởi các loài vi tảo và điều kiện nuôi cấy. Kết quả thu được trong nghiên cứu này phù hợp với một số báo cáo trước đây về độc tính của vi tảo. Cụ thể, Prueser và cộng sự (2024) [81] ghi nhận rằng nhiều chiết xuất vi tảo không đạt ngưỡng gây độc tế bào đáng kể trong khoảng nồng độ khảo sát, với giá trị IC_{50} không thể xác định hoặc lớn hơn giới hạn thử nghiệm.

Từ các kết quả thu được ở trên, có thể nhận định rằng EPSs từ dịch nuôi cấy *C. sorokiniana* DDH trong nghiên cứu này có cấu trúc phù hợp với xu hướng hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ tế bào, thay vì gây độc tế bào trực tiếp. Điều này củng cố định hướng ứng dụng EPSs như một hợp chất sinh học an toàn, có tiềm năng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng hoặc hỗ trợ sức khỏe cho người.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu thu được được trình bày nêu trên, chúng tôi xin rút ra một số kết quả chính như sau:

1. Đã lựa chọn được điều kiện thích hợp cho nuôi trồng *C. sorokiniana* DDH là môi trường Endo với nguồn cacbon là glucose 30 g/L, nguồn nitơ là KNO_3 (có nồng độ 4,8 g/L), tỷ lệ C/N là 18:1, nhiệt độ 28 °C và cường độ ánh sáng là 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ với sinh khối khô, hàm lượng protein, lipit, carotenoid và EPSs cao nhất đạt lần lượt là $10,35 \pm 0,11$ g/L; $16,32 \pm 0,21$ %SKK; $21,53 \pm 0,90$ %SKK; $71,00 \pm 1,90$ $\mu\text{g}/\text{g}$ SKK và $3,65 \pm 1,19$ mg/L, sau 5 ngày nuôi.

2. EPSs tách chiết được từ dịch nuôi cấy *C. sorokiniana* DDH có nguồn gốc tự nhiên, có thành phần chủ yếu là các đường trung tính, mức độ sulfate hóa thấp và sự hiện diện của các nhóm hydroxyl. Phân tích ảnh SEM của EPSs đã cho thấy bề mặt có hình thái xốp, không đều và đặc điểm sinh học này góp phần quyết định đến hoạt tính sinh học của EPSs. Phổ FTIR của EPSs đo được cho thấy có các tần xuất dao động được phát hiện chủ yếu là do các liên kết hydroxyl và glycosidic đặc trưng cho các polysaccharide trung tính.

3. EPSs tách chiết được có hoạt tính chống oxy hóa trung bình tăng dần từ 2,32% lên 14,45% và đạt 39,41% tại nồng độ 0,05; 0,5; 5 mg/mL với giá trị IC_{50} đạt $6,60 \pm 0,91$ mg/mL so với đối chứng dương là axit ascorbic (với giá trị IC_{50} đạt 0,012 mg/mL).

4. Kết quả phần trăm ức chế các dòng tế bào ung thư của EPSs được tách chiết từ dịch nuôi cấy *C. sorokiniana* DDH không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh, thể hiện qua mức ức chế tối đa chỉ đạt 38% trên dòng MCF7 (ung thư vú) tại nồng độ cao nhất (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), trong khi các dòng A549 (ung thư phổi), KB (ung thư biểu mô miệng ở người) và HepG2 (ung thư biểu mô tế bào gan ở người) lần lượt chỉ đạt khoảng 25%, 17% và 15%. Không có mẫu nào đạt ngưỡng 50% ức chế, do đó đã không xác định được giá trị IC_{50} trong khoảng nồng độ khảo sát ($\text{IC}_{50} \leq 256$ $\mu\text{g}/\text{mL}$).

EPSs tách chiết được có hoạt tính sinh học như chống oxy hóa và điều hòa sinh lý, không gây độc tế bào trực tiếp nên có thể sử dụng làm thực phẩm cho người và động vật nuôi theo mô hình kinh tế tuần hoàn và bền vững.

KIẾN NGHỊ

Một số công việc nghiên cứu cần được tiếp tục nghiên cứu như sau:

1. Khảo sát thành phần monosaccharide trong EPSs, phân bố trọng lượng phân tử của EPSs, những yếu tố ảnh hưởng chính đến hoạt tính sinh học cũng như tiềm năng ứng dụng của EPSs.
2. Cần tiếp tục nghiên cứu tác dụng sinh học khác như tác dụng điều hòa miễn dịch, probiotic, ... của EPSs theo định hướng sử dụng nó trong thực phẩm cho người và thức ăn chăn nuôi.
3. Cần đánh giá về giá thành của EPSs tách chiết được từ dịch nuôi trồng *C. sorokiniana* DDH so với các EPSs đi từ nguồn nguyên liệu khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Penloglou G, Pavlou A, Kiparissides C, 2024, Recent advancements in photobioreactors for microalgae cultivation: A brief overview, *Processes*, 12(6), 1104.
2. Razzak SA, Bahar K, Islam KO, Haniffa AK, Faruque MO, Hossain SZ, Hossain MM, 2024, Microalgae cultivation in photobioreactors: Sustainable solutions for a greener future, *Green Chemical Engineering*, 5(4), 418-439.
3. Khan MI, Shin JH, Kim JD, 2018, The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry, *Microbial Cell Factories*, 17(1), 36.
4. Udayan A, Pandey AK, Sirohi R, Sreekumar N, Sang BI, Sim SJ, Pandey A, 2022, Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals, *Phytochemistry Reviews*, 22(4), 833-860.
5. Sathasivam R, Radhakrishnan R, Hashem A, Abd Allah EF, 2019, Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 709-722.
6. Barkia I, Saari N, Manning SR, 2019, Microalgae for high-value products towards human health and nutrition, *Marine Drugs*, 17(5), 304.
7. Đặng Diễm Hồng, 2017, Nhiên liệu sinh học từ vi tảo biển và một số ứng dụng ở Việt Nam, *Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ*, Hà Nội, 484 trang.
8. Ammar EE, Rady HA, Khattab AM, Amer MH, Mohamed SA, Elodamy NI, Al-Farga A, Aioub AAA, 2023, A comprehensive overview of eco-friendly bio-fertilizers extracted from living organisms, *Environmental Science and Pollution Research*, 30(53), 113119–113137.
9. Renuka N, Prasanna R, Sood A, Ahluwalia AS, Bansal R, Babu S, Singh R, Shivay YS, Nain L, 2016, Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat, *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 6608-6620.
10. Wijffels RH, Kruse O, Hellingwerf KJ, 2013, Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae, *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 405-413.
11. Richmond A, 2004, Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, Blackwell Publishing, Oxford.

12. Đặng Diễm Hồng, 2019, Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và vật nuôi ở Việt Nam, *Nhà xuất bản Khoa học và Công nghệ*, Hà Nội, 750 trang.
13. Thiagarasaiyar K, Goh BH, Jeon YJ, Yow YY, 2020, Algae metabolites in cosmeceutical: An overview of current applications and challenges, *Marine Drugs*, 18(6), 323.
14. Grobbelaar JU, 2004, Algal nutrition: Mineral nutrition, Handbook of microalgal culture, *Biotechnology and applied phycology*, 97-115.
15. Mata TM, Martins AA, Caetano NS, 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
16. Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C, 2014, Morphology, composition, production, processing and applications of microalgae, *Biotechnology Advances*, 32(8), 1603-1618.
17. Markou G, Nerantzis E, 2013, Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions, *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532-1542.
18. Nguyễn Tiên Cư, Đặng Đình Kim, Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Bảo, Dương Thị Thủy, 1997, Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng tảo *Chlorella* spp. PD97, *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*, 413-420.
19. Đặng Đình Kim, Đặng Hoàng Phước Hiền, 1999, Công nghệ sinh học vi tảo, *Nhà xuất bản Nông nghiệp*, Hà Nội.
20. Đặng Xuyên Như và cộng sự, 1998, Báo cáo đề tài cấp Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường: Sử dụng một số biện pháp sinh học để làm sạch môi trường đất và nước, Hà Nội.
21. Đoàn Thị Thái Yên, 2012, Báo cáo tổng kết đề tài cấp Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội: Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất sinh khối vi tảo làm nguyên liệu sản xuất diesel sinh học kết hợp với xử lý nước thải chăn nuôi, Hà Nội.
22. Đinh Thị Ngọc Mai, Lê Thị Thơm, Bùi Đình Lãm, Đoàn Lan Phương, Đặng Diễm Hồng, 2011, Sản xuất diesel sinh học từ vi tảo *Chlorella* sp. bằng phương pháp chuyển ester tại chỗ, *Tạp chí Sinh học*, 33(4), 66-71.
23. Nguyễn Minh Châu, Lê Thị Thơm, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Anh Huy, Nguyễn Mạnh Đạt, Ngô Thị Hoài Thu, Nguyễn Thị Thu Trang, Trần Thị Liên, Vũ Thị

- Thu Hà, Đặng Diễm Hồng, 2024, Nghiên cứu lựa chọn điều kiện nuôi trồng thích hợp để nâng cao hàm lượng lipid của vi tảo lục *Chlorella sorokiniana* cho định hướng ứng dụng sản xuất nhiên liệu sinh học, *Báo cáo toàn văn Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Huế, 562-567.
24. Nguyen Minh Chau, Le Thi Thom, Nguyen Cam Ha, Le Anh Huy, Nguyen Manh Dat, Ngo Thi Hoai Thu, Trinh Trong Nghia, Vu Thi Thu Ha, and Dang Diem Hong (2026) Optimization of culture conditions for growth and enhanced lipid accumulation in green microalgae *Chlorella sorokiniana* using two sate cultivation process for biodiesel production. *J of the Japan Institute of Energy*, 105, 1-18
 25. Nelson DL, Cox MM, 2017, Lehninger principles of biochemistry, W H Freeman, New York.
 26. Stephen AM, Phillips GO, Williams PA, 2006, Food polysaccharides and their applications, CRC Press, Boca Raton.
 27. Raposo, M. F. J., de Moraes, R. M. S. C., & de Moraes, A. M. M. B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233–252.
 28. Flemming HC, Wingender J, 2010, The biofilm matrix, *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
 29. Babiak W, Krzemińska I, 2021, Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes, *Energies*, 14(13), 4007.
 30. Koçer AT, Irnan B, Kaptan Usul S, Özçimen D, Yılmaz MT, Işıldak İ, 2021, Exopolysaccharides from microalgae: Production, characterization, optimization, and techno-economic assessment, *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1779-1790.
 31. Liang S, Wang X, Li C, Liu L, 2024, Biological activity of lactic acid bacteria exopolysaccharides and their applications in the food and pharmaceutical industries, *Foods*, 13(11), 1621.
 32. Stoica RM, Moscovici M, Lakatos ES, Cioca LI, 2023, Exopolysaccharides of fungal origin: Properties and pharmaceutical applications, *Processes*, 11(2), 335.
 33. Rossi F, De Philippis R, 2015, Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and their industrial applications, *FEMS Microbiology Reviews*, 39(4), 568-590.

34. De Philippis, R., & Vincenzini, M. (1998). *Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications*. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(3), 151–175.
35. Richmond, A., & Hu, Q. (Eds.). (2013). *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
36. Sutherland, I. W. (2001). *Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework*. *Microbiology*, 147(1), 3–9.
37. Pereira S, Zille A, Micheletti E, Moradas-Ferreira P, De Philippis R, Tamagnini P, 2009, Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly, *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 917-941.
38. Krzemińska I, Pawlik-Skowrońska B, Trzcińska M, Tys J, 2014, Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(4), 735-741.
39. Gris B, Sforza E, Morosinotto T, Bertucco A, La Rocca N, 2017, Effects of light and temperature on growth and high-value molecule production in *Cyanobacterium aponinum*, *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 1781-1790.
40. Moreno J, Vargas MA, Olivares H, Rivas J, Guerrero MG, 1998, Exopolysaccharide production by cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture, *Journal of Biotechnology*, 60(3), 175-182.
41. Chentir I, Hamdi M, Doumandji A, Hadsadok A, Ouada HB, Nasri M, Jridi M, 2017, Enhancement of extracellular polymeric substances (EPS) production in *Arthrospira* sp. by two-step culture process and partial characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1412-1420.
42. Bechet Q, Laviale M, Arsapin N, Bonnefond H, Bernard O, 2017, Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity, *Biotechnology for Biofuels*, 10, 136.
43. Sharma AK, Jaryal S, Sharma S, Dhyani A, Tewari BS, Mahato N, 2025, Biofuels from microalgae: A review on microalgae cultivation, biodiesel production techniques and storage stability, *Processes*, 13(2), 488.
44. Almousa MA, 2025, Impact of light intensity and leaf temperature on photosynthesis in *Zea mays*, *Egyptian Journal of Botany*, 65(1), 241-249.
45. Mezhoud N, Zili F, Bouzidi N, Helaoui F, Ammar J, Ouada HB, 2014, Effects of temperature and light intensity on growth, reproduction and EPS synthesis of

- a thermophilic strain related to the genus *Graesiella*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 2271-2280.
46. Juneja A, Ceballos RM, Murthy GS, 2013, Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review, *Energies*, 6(9), 4607-4638.
 47. Daliry S, Hallajisani A, Mohammadi R, Nasernejad B, Ghasemi Y, 2017, Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth, *Global Journal of Environmental Science and Management*, 3(2), 217-230.
 48. Ryu KH, Kim B, Lee JH, 2019, Model-based optimization of microalgal cultivation strategies for lipid production under photoautotrophic condition, *Computers and Chemical Engineering*, 121, 57-66.
 49. Roostaei J, Zhang Y, Gopalakrishnan K, Ochocki AJ, 2018, Mixotrophic microalgae biofilm: A novel algae cultivation strategy for improved productivity and cost-efficiency of biofuel feedstock production, *Scientific Reports*, 8, 12528.
 50. Yun HS, Kim YS, Yoon HS, 2021, Effect of different cultivation modes on the growth and biochemical composition of *Chlorella* sp., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 774143.
 51. Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, 31(7), 1043-1049.
 52. Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H., & Li, P. (2010). Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International journal of biological macromolecules*, 46(1), 6-12.
 53. De Jesus Raposo MF, de Moraes AMMB, de Moraes RMSC, 2013, Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae, *Marine Drugs*, 11(1), 233–252.
 54. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P, 2002, Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: An overview, *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171.
 55. Lê Thị Thúy Hằng, Trần Đặng Mỹ Ngân, Nguyễn Thị Kim Hậu, Nguyễn Thành Sơn, Đinh Minh Hiệp, Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Thị Kim Oanh, 2017, Khảo sát ảnh hưởng thành phần môi trường nuôi cấy *Cordyceps sinensis* thu nhận

- polysaccharide ngoại bào (EPS) có hoạt tính kháng oxy hóa, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, 5(114-1), 99–04.
56. Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917. DOI: 10.1139/o59-099.
 57. Lichtenthal H. K. (1994). Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic. *Methods Enzymol*, 148,350-382.
 58. 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
 59. Nguyen, T.T.; Huy, T.Q.; Nga, P.T.; Morita, K.; Dunia, I.; Benedetti, L. A new nidovirus (NamDinh virus NDiV): Its ultrastructural characterization in the C6/36 mosquito cell line. *J. Virol.* 2013, 444, 337-342
 60. Shepel D, Goreacioc T, Lupascu T, Filippov M, Rusu M, 2015, Method of infrared spectra registration of activated carbons in potassium bromide pellets, *Chemistry Journal of Moldova*, 10(1), 113-115.
 61. Xiao F, Xu T, Lu B, Liu R, 2020, Guidelines for antioxidant assays for food components, *Food Frontiers*, 1, 60-69.
 62. Mosmann T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
 63. Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y, 2011, Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products, *Water Research*, 45(1), 11-36.
 64. Chen F, Johns MR, 1991, Effect of carbon source on the growth and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris*, *Journal of Applied Phycology*, 3, 45-49.
 65. Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A, 2015, Plant physiology and development, *Sinauer Associates, Sunderland*.
 66. Li T, Zheng Y, Yu L, Chen S, 2020, Mixotrophic cultivation of microalgae for biomass production: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 120, 109599.
 67. Ma X, Chen X, Yang X, et al, 2020, Nitrogen limitation enhances carbohydrate accumulation in microalgae: A review, *Bioresource Technology*, 313, 123692.

68. Chang JS, Show PL, Ling TC, et al, 2017, Effects of temperature on microalgal growth and biochemical composition, *Bioresource Technology*, 244, 1405-1413.
69. Ras M, Steyer JP, Bernard O, 2013, Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production, *Biotechnology Advances*, 31(8), 1648-1661.
70. Kumar K, Dasgupta CN, Nayak B, Lindblad P, Das D, 2018, Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration using green algae and cyanobacteria, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1137-1152.
71. Aro EM, Virgin I, Andersson B, 1993, Photoinhibition of photosystem II: Protein damage and turnover, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143(2), 113-134.
72. Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, 2007, Photoinhibition of photosystem II under environmental stress, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767(6), 414-421.
73. Takahashi S, Murata N, 2008, How do environmental stresses accelerate photoinhibition, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 1-23.
74. Sirin S, Aslim B, 2020, Characterization of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides as a defined neuroprotective agent against amyloid beta1–42-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Scientific Reports*, 10, 8124.
75. Stuart B, 2004, Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications, John Wiley & Sons, Chichester.
76. Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H. C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function* (pp. 1-19). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
77. Synytsya, A., & Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 792-809.
78. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, et al, 2008, Sulfated polysaccharides and their biological activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2), 127-131.
79. Zhang J, et al, 2019, Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris*, *Carbohydrate Polymers*, 223, 115-123.
80. Li S, Shah NP, 2014, Antioxidant potential of polysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, 102, 365-372.

81. Prueser TF, Braun PG, Griehl C, Wiacek C, 2024, In vitro toxicity of microalgae species of the phyla Chlorophyta and Ochrophyta in CHO-K1 and HepG2 cells for potential use in human nutrition, *Journal of Food, Nutrition and Diet Science*, 2(1), 143-151.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1

Bảng 4.1. Thành phần môi trường Endo

Thành phần	Khối lượng (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,105
Glucose	30
KNO ₃	4,8
KH ₂ PO ₄	1,2
Na ₃ C ₆ H ₅ O.2H ₂ O	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,016
Na ₂ EDTA	2,1
Dung dịch A5	1 mL

Bảng 4.2. Thành phần môi trường BG-11

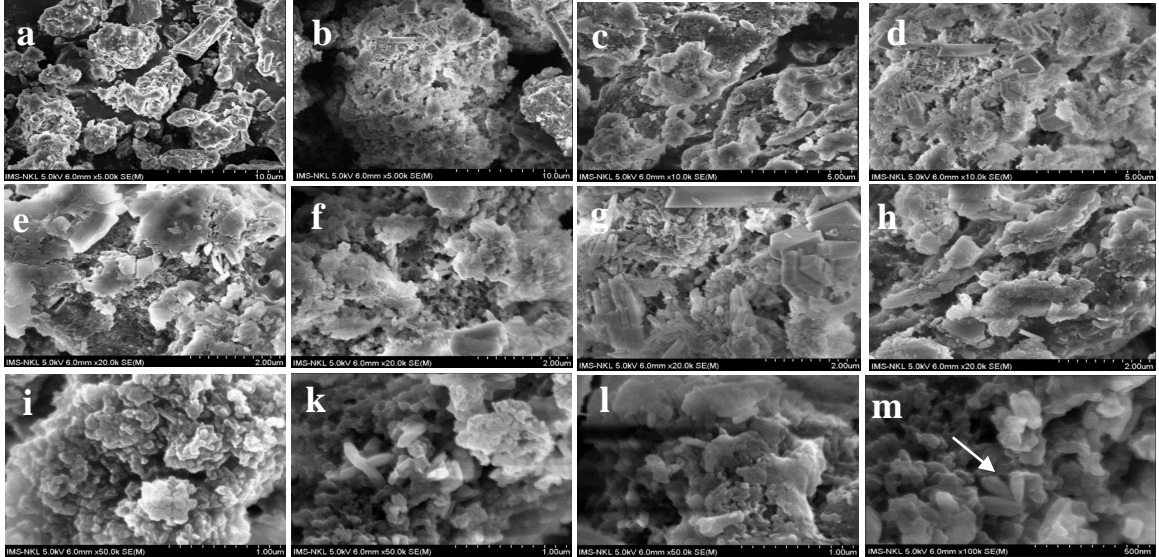
Thành phần	Khối lượng (g/L)
NaNO ₃	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,041
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
Citric acid	0,006
Ferric amoniumcitrate	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Glucose	30
A5	1 mL

Bảng 4.3. Thành phần vi lượng

	Thành phần	Khối lượng (mg/L)
PIV	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,07
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,021
A5	H ₃ BO ₃	2,85
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
	MoO ₃	0,015
	Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,044

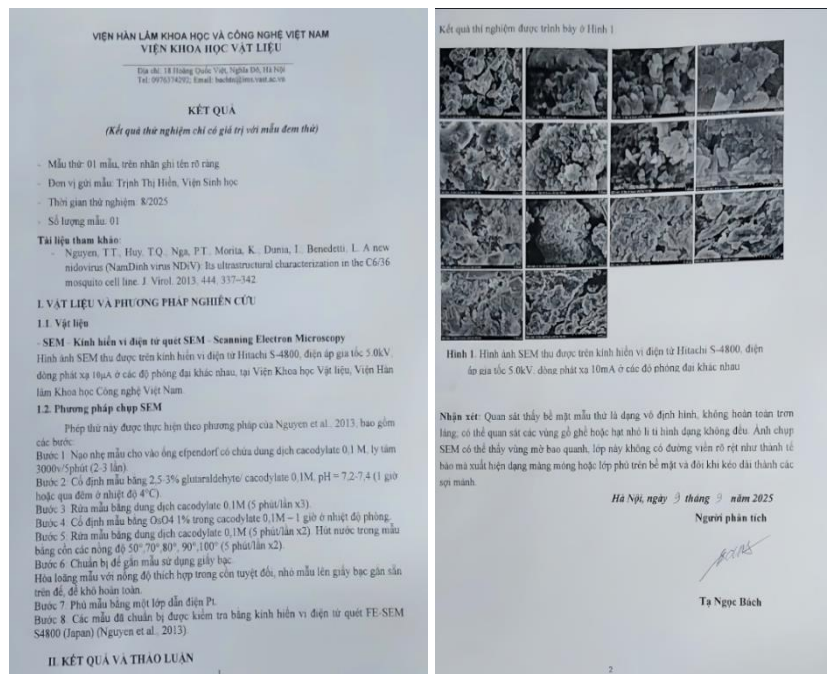
Phụ lục 2

2.1. Kết quả quan sát hình thái và cấu trúc bề mặt của EPSs tách chiết được bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM - Scanning Electron Microscopy)



Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) của EPSs được tách chiết từ dịch nuôi của loài *C. sorokiniana* DDH sau 5 ngày nuôi trồng.

Ghi chú: các độ phóng đại lần lượt là 5X (a, b); 10X (c, d); 20X (e, f, g, h), 50X (i, k, l) và 100X (m), thanh thước đo được hiển thị trên hình.

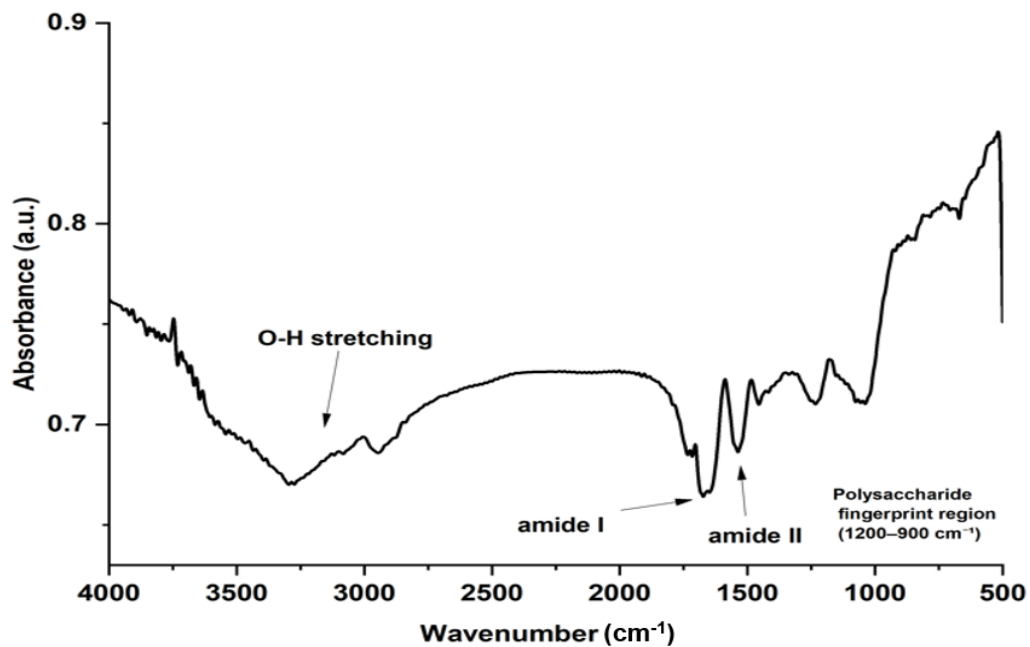


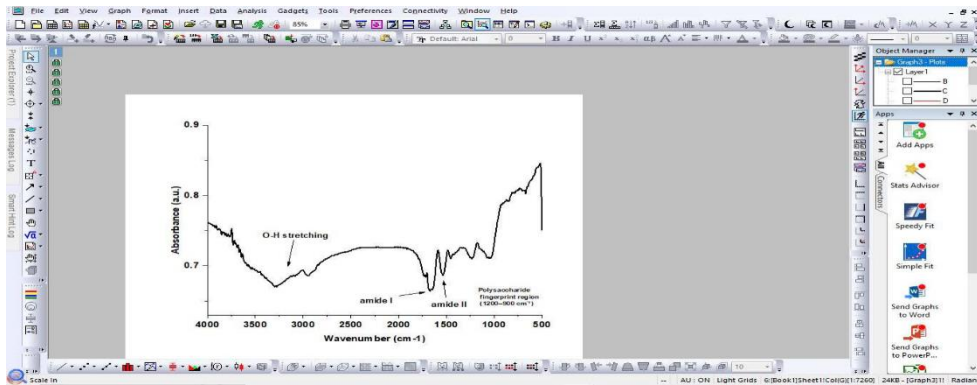
Hình 4.1. Hình ảnh báo cáo kết quả SEM thu được trên kính hiển vi điện tử Hitachi S-4800, Nhật Bản, điện áp gia tốc 5.0kV, dòng phát xạ 10µA ở các độ phóng đại khác nhau, tại Viện Khoa học Vật liệu, VAST.



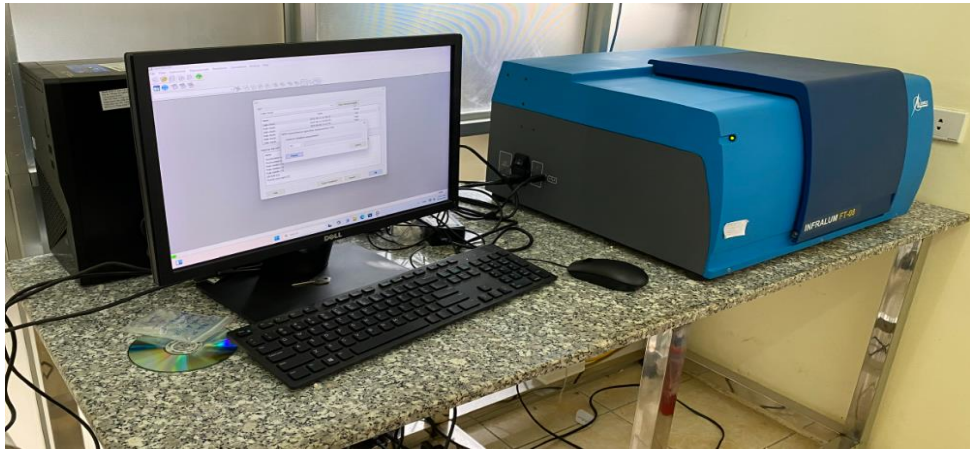
Hình 4.2. Hình ảnh kính hiển vi điện tử Hitachi S-4800, Nhật Bản, tại Viện Khoa học Vật liệu, VAST.

2.2. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy) của EPSs thu được từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH






Hình 4.3. Hình ảnh phổ FTIR của EPSs từ *C. sorokiniana* DDH được vẽ bằng phần mềm *OriginPro 2024*.



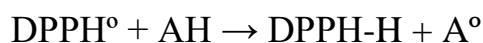
Hình 4.4. Hình ảnh thiết bị Fourier IR InfraLUM FT-08 (Lumex Instruments, Nga) tại Viện Khoa học Vật liệu, VAST.

Dưới đây là báo cáo phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy) được thực hiện tại Phòng Công nghệ Plasma, Viện Khoa học Vật liệu, VAST.

VIỆN KHOA HỌC VẬT LIÊU (INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE) PHÒNG CÔNG NGHỆ PLASMA LABORATORY OF PLASMA TECHNOLOGY		Địa chỉ (Address): Số 18 Hoàng Quốc Việt, Phường Nghĩa Đô, TP Hà Nội	
BÁO CÁO PHÂN TÍCH/KIỂM TRA TEST/ANALYSIS REPORT			
Trang/Page: 1/1			
1. Người yêu cầu (Applicant):	Trịnh Thị Hiền	4. Số lượng mẫu (Quantity):	01
2. Địa chỉ (Address):	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam	6. Ngày nhận mẫu (Date of request):	05/01/2016
3. Tên mẫu (Sample's name):	Mẫu C	8. Ngày trả kết quả (Date of issue):	24/01/2016
5. Phương pháp (Method):	FTIR	10. Ngày thực hiện (Tested date):	20/01/2016
7. Thiết bị (Equipment):	InfraLUM FT-08		
9. Địa điểm thực hiện (Performance location):	Phòng Công nghệ Plasma		
<p>Phương pháp này được thực hiện theo phương pháp của Shepel et al. (2015) bằng cách trộn mẫu và bột KBr theo tỷ lệ 1:1000 theo khối lượng và ép dưới áp suất cao để tạo thành viên trong suốt.</p> <p>Kết quả phân tích của mẫu trên được trình bày dưới đây.</p>			
<p>Hình 1 Hình ảnh phổ FTIR của mẫu C.</p>			
<p>Nhận xét: Phổ FTIR thu được cho thấy một dải rộng ở khoảng 3300-3000 cm⁻¹ tương ứng với dao động kéo giãn O-H của nhóm hydroxyl và nước hấp phụ, phân ánh mạng lưới liên kết hydro đặc trưng của polysaccharide sinh học. Hai dải hấp thụ nổi bật ở khoảng 1650 cm⁻¹ (amide I) và 1540 cm⁻¹ (amide II) lần lượt đại diện cho dao động kéo giãn C=O và dao động uốn N-H kéo giãn C-N. Vùng giữa 1200 - 900 cm⁻¹ thể hiện nhiều dao động liên tục tương ứng với vòng chỉ định vân tay của polysaccharide, cho thấy liên kết glycosidic C-O-C và dao động kéo giãn C-O trong cấu trúc vòng pyranose. Đây là những đặc điểm rất đặc trưng của polysaccharide mạch dài. Ngoài ra, một số liên kết dao động yếu được quan sát thấy trong vùng 650-500 cm⁻¹ tương ứng với biến dạng mặt phẳng ngoài và dao động ngang của vòng pyranose, thường được tìm thấy trong các polysaccharide có cấu trúc vòng.</p>			
<p>Tài liệu tham khảo:</p> <p>Shepel, D. N., et al. (2015). Method of Infrared Spectra Registration of Activated Carbons in Potassium Bromide Pellets. <i>Chemistry Journal of Moldova</i>, 10(1), 112-115.</p>			
		<p>Người làm báo cáo/ Reported by</p>  <p>Nguyễn Hoàng Tùng</p>	
<p>Từ chối in ấn: 1. Phiếu kết quả này chỉ có giá trị trên mẫu đã phân tích kiểm tra. The above results are valid exclusively for tested/analysed samples. 2. Không được sao chép một phần kết quả này. Partial copy/extract of the results on testing/analysis report is prohibited.</p>			

2.3. Kết quả thử nghiệm xác định hoạt tính chống ô xy hóa bằng trung hòa gốc tự do DPPH

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) là gốc tự do có màu tím đậm đặc trưng, khi có mặt chất chống oxy hóa sẽ bị khử thành dạng không còn gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) có màu vàng nhạt hoặc không màu. Đo độ giảm độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm để xác định khả năng khử gốc DPPH của chất chống oxy hóa. Chất đối chứng dương được sử dụng là ascorbic acid. Dưới đây là cơ chế phản ứng của phương pháp:



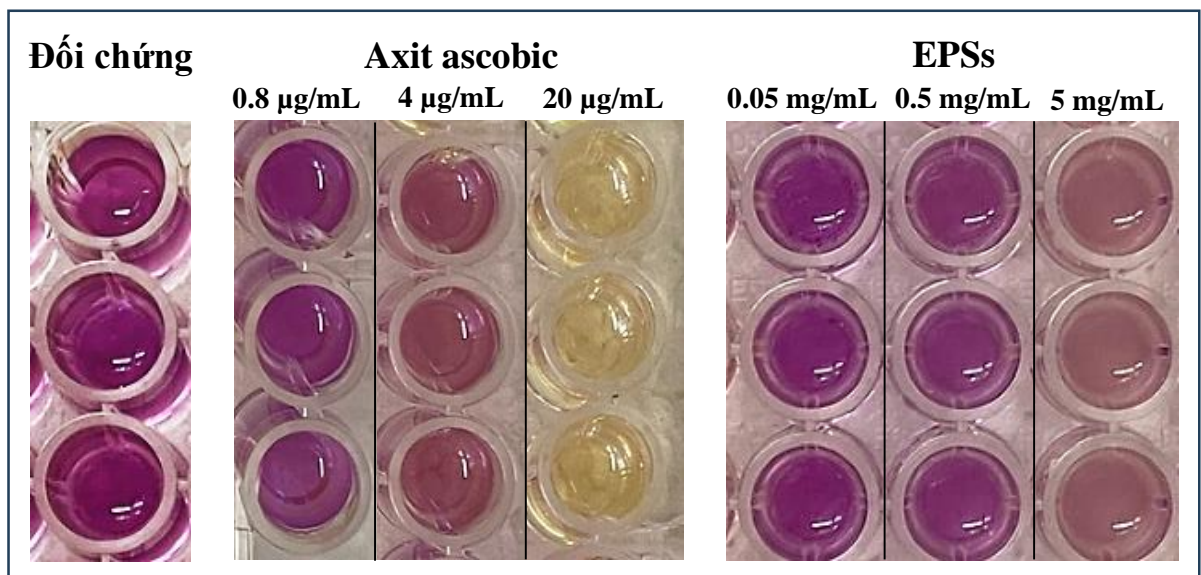
Trong đó: AH là chất chống oxy hóa



Tiến hành thí nghiệm: Chuẩn bị đĩa Elisa 96 giếng để làm phản ứng. Hút lần lượt 100 μL mẫu EPSs có các nồng độ khác nhau (0,05; 0,5; 5 mg/mL) vào mỗi giếng (với mẫu đối chứng âm, sử dụng 100 μL nước cất). Tiếp theo, thêm 100 μL DPPH với nồng độ 0,2 μM đã chuẩn bị vào các giếng. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm trên máy đo quang phổ để xác định khả năng khử gốc DPPH. Đối với mẫu đối chứng dương của thí nghiệm sẽ sử dụng axit ascorbic ở các nồng độ khác nhau là 0,8; 4; 20 $\mu\text{g/mL}$.



Hình 4.5. Hình ảnh minh họa thử nghiệm xác định hoạt tính chống ô xy hóa bằng trung hòa gốc tự do DPPH. (A) Chuẩn bị DPPH nồng độ 0,2 μM ; (B) Hút lần lượt hỗn hợp phản ứng vào đĩa 96 giếng; (C) Đo $\text{OD}_{517\text{nm}}$



Hình 4.6. Hình ảnh kết quả thử nghiệm hoạt tính chống ô xy hóa bằng trung hòa gốc tự do DPPH của EPSs từ dịch nuôi *C. sorokiniana* DDH

2.4. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào khác nhau

Dưới đây là báo cáo kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào khác nhau, thí nghiệm được phân tích tại Trung tâm nghiên cứu và phát triển thuốc, Viện Hóa học, VAST.



VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN HÓA HỌC
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN THUỐC
Tel: (+84) 024. 37914586
Phòng 601. Nhà A18. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội



KẾT QUẢ THỬ HOẠT TÍNH ĐỘC TẾ BÀO

Người gửi mẫu: Trịnh Thị Hiền, Viện Sinh học

Ngày gửi mẫu: 10/2025

Số lượng mẫu: 02 mẫu

TT	Tên mẫu	Nồng độ (µg/ml)	Phần trăm ức chế dòng tế bào			
			KB	HepG2	A549	MCF7
1	1	256	17	15	25	38
		64	12	7	15	24
		16	4	0	6	9
		4	0	0	0	0
		IC ₅₀	>256	>256	>256	>256
2	2	256	29	19	31	32
		64	21	10	19	20
		16	7	0	4	7
		4	0	0	0	0
		IC ₅₀	>256	>256	>256	>256
	Ellipticine	IC ₅₀	0.45±0.02	0.47±0.02	0.46±0.02	0.47±0.02

Nhận xét: các mẫu thử không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào khi thử tới nồng độ 256 µg/ml

Ngày 27 tháng 10 năm 2025

Viện Hóa học xác nhận bà Nguyễn Thị Thu Hà là PGĐ Trung tâm NC&PT thuốc

PGĐ Trung tâm NC&PT thuốc

Người trả kết quả



TL. VIỆN TRƯỞNG
KT. TRƯỞNG PHÒNG QLTH
PHÓ TRƯỞNG PHÒNG
Vương Thị Thu Quyên

Nguyễn Thị Thu Hà

Nguyễn Thanh Trà