

## Impact of cultivation conditions on biomass yield and lipid content of *Scenedesmus obliquus*

Huong T. G. Thach, Hong T. Tran, Anh T. V. Nguyen, & Khang V. Huynh\*

Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: June 14, 2023

Revised: July 07, 2023

Accepted: July 17, 2023

#### Keywords

Culture conditions

Lipids

Nitrogen

Phosphorus

*Scenedesmus obliquus*

#### \*Corresponding author

Huynh Vinh Khang

Email: khanghv@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

Microalgae have currently been considered as a promising feedstock for biodiesel production. The accumulation of microalgal lipids is species-specific and largely dependent upon cultivation conditions. The present study aimed to investigate the biomass productivity and lipid content of *Scenedesmus obliquus* cultivated under nitrogen (N)- and phosphorus (P)-depleted conditions. The highest microalgal density was  $38.0 \pm 3.5 \times 10^6$  cell/mL after 12 days of cultivation in the standard Bold's Basal Medium (BBM) and significantly decreased with decreasing N concentrations in the media, with the density of  $1.4 \pm 0.5 \times 10^6$ ,  $21.5 \pm 1.4 \times 10^6$ ,  $25.7 \pm 4.9 \times 10^6$ , and  $33.5 \pm 1.2 \times 10^6$  cell/mL in the nutrient solutions containing 0, 25, 50, and 75% N, respectively. Conversely, the P concentrations showed negligible effects on the growth of *S. obliquus* across all treatments. Overall, the lipid accumulation of *S. obliquus* increased with decreasing N and P concentrations. The results revealed that N-starvation yielded the highest microalgal lipid content of  $184.1 \pm 17.4$  mg/g d.w., whereas that under N-sufficient condition was only  $80.0 \pm 9.8$  mg/g d.w. Likewise, the lipid content was almost double when *S. obliquus* was grown in the modified BBM containing half of P concentration of the standard medium. Taken together, this study demonstrates that alteration of the nutrients is an effective approach for enhancing lipid accumulation in *S. obliquus*.

**Cited as:** Thach, H. T. G., Tran, H. T., Nguyen, A. T. V., & Huynh, K. V. (2023). Impact of cultivation conditions on biomass yield and lipid content of *Scenedesmus obliquus*. *The Journal of Agriculture and Development* 22(5), 57-67.

## Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và tích lũy lipid của vi tảo *Scenedesmus obliquus*

Thạch Thị Giang Hương, Trần Thị Hồng, Nguyễn Thị Vân Anh & Huỳnh Vĩnh Khang\*

Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 14/06/2023

Ngày chỉnh sửa: 07/07/2023

Ngày chấp nhận: 17/07/2023

#### Từ khóa

Điều kiện nuôi cấy

Lipid

Nitơ

Photpho

*Scenedesmus obliquus*

#### \*Tác giả liên hệ

Huỳnh Vĩnh Khang

Email: khanghv@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Hiện nay, vi tảo được xem là nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn để sản xuất nhiên liệu sinh học. Sự tích lũy lipid tùy thuộc vào từng loài vi tảo cũng như điều kiện nuôi cấy. Nghiên cứu này nhằm khảo sát ảnh hưởng của nitơ (N) và photpho (P) đến khả năng sinh trưởng và tích lũy lipid của vi tảo *Scenedesmus obliquus*. Mật độ vi tảo ghi nhận cao nhất là  $38,0 \pm 3,5 \times 10^6$  tế bào/mL sau 12 ngày nuôi cấy trong môi trường Bold's Basal Medium (BBM) gốc và giảm rõ rệt khi nồng độ N giảm dần, với mật độ lần lượt là  $1,4 \pm 0,5 \times 10^6$ ;  $21,5 \pm 1,4 \times 10^6$ ;  $25,7 \pm 4,9 \times 10^6$ ; và  $33,5 \pm 1,2 \times 10^6$  tế bào/mL tương ứng với 0, 25, 50, và 75% N. Ngược lại, nồng độ P không có ảnh hưởng đáng kể đến sinh khối vi tảo ở tất cả các nghiệm thức. Nhìn chung, sự tích lũy lipid của *S. obliquus* tăng khi nồng độ N và P trong môi trường nuôi cấy giảm. Kết quả cho thấy hàm lượng lipid đạt cao nhất ( $184,1 \pm 17,4$  mg/g sinh khối khô) khi nuôi cấy vi tảo trong môi trường cạn kiệt N; trong khi đó, hàm lượng lipid chỉ đạt  $80,0 \pm 9,8$  mg/g sinh khối khô khi cung cấp đầy đủ N. Tương tự, hàm lượng lipid cũng tăng gấp đôi khi vi tảo được nuôi cấy trong môi trường chỉ chứa 50% P so với môi trường BBM gốc. Nghiên cứu này chứng minh rằng điều chỉnh môi trường dinh dưỡng là một hướng đi hiệu quả để gia tăng sự tích lũy lipid của vi tảo *S. obliquus*.

### 1. Đặt Vấn Đề

Vi tảo là nguồn nguyên liệu phù hợp để sản xuất nhiên liệu sinh học (biodiesel) vì có khả năng quang hợp cao, tốc độ sinh trưởng nhanh, và sinh khối thu được chứa hàm lượng lipid cao, có tiềm năng thay thế dầu mỏ và thân thiện với môi trường (Gouveia & Oliveira, 2009). Khai thác vi tảo để sản xuất nhiên liệu sinh học không gây ảnh hưởng đến việc sản xuất lương thực thực phẩm, thức ăn gia súc, và không cạnh tranh đất canh tác với các loại cây trồng khác (Chisti, 2007).

Mặt khác, vi tảo còn sử dụng khí CO<sub>2</sub> trong quá trình quang hợp, góp phần làm giảm hiệu ứng nhà kính (Putt & ctv., 2011). Vi tảo *Scenedesmus obliquus* có khả năng sinh trưởng và phát triển bằng quang tự dưỡng và quang dị dưỡng, có khả năng cố định CO<sub>2</sub>, tạo nhiều sinh khối, và tích lũy lipid ở mức cao. Các nghiên cứu hiện tại về vi tảo *Scenedesmus* sp. chủ yếu tập trung vào việc xử lý nước thải và tăng sản lượng sinh khối chứ chưa chú trọng nhiều đến khai thác khả năng tích lũy lipid phục vụ sản xuất nhiên liệu sinh học.

Quá trình sinh trưởng và tích lũy lipid của vi tảo chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như ánh sáng, nhiệt độ, pH và thành phần môi trường dinh dưỡng; trong đó nitơ (N) và photpho (P) có ảnh hưởng lớn nhất đến hàm lượng cũng như thành phần lipid trong tế bào vi tảo (Brindhadevi & ctv., 2021; Yaakob & ctv., 2021). Thiếu hụt N/P tác động đến các quá trình sinh hóa bên trong tế bào; khi đó, dòng carbon dùng cho quang hợp và tổng hợp protein sẽ dịch chuyển sang sinh tổng hợp các hợp chất cao phân tử giàu năng lượng (chủ yếu là lipids). Shen & ctv. (2015) nhận thấy vi tảo *Chlorella vulgaris* tích lũy lipid cao gấp khoảng 3 lần khi được nuôi cấy trong môi trường không chứa N. Mặt khác, dưới điều kiện cường độ ánh sáng cao và thiếu N/P, các tế bào vi tảo tăng cường tích lũy một lượng lớn lipid ở dạng triacylglycerol (TAG) (Chisti, 2007; Hu & ctv., 2008). Dạng TAG được xem là một nguồn nguyên liệu rất phù hợp để sản xuất nhiên liệu sinh học.

Do đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy, gồm N và P, đến khả năng sinh trưởng và tích lũy lipid của vi tảo *S. obliquus*, làm tiền đề cho việc sản xuất nhiên liệu sinh học có nguồn gốc từ vi tảo.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật Liệu

Vi tảo *Scenedesmus obliquus* được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản II (TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam). Sau đó, vi tảo được nhân giống trong các bình thủy tinh chứa 500 mL môi trường Bold's Basal Medium (BBM) (Bảng 1), ở điều kiện nhiệt độ phòng  $29 \pm 2^\circ\text{C}$ , sục khí liên tục (2,7 L/phút), và chiếu sáng liên tục bằng bóng đèn LED 18W ở cường độ khoảng 3.500 lux.

**Bảng 1.** Thành phần môi trường Bold's Basal Medium

Thành phần	Nồng độ (g/L)
$\text{NaNO}_3$	0,250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,075
$\text{NaCl}$	0,025
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,075
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,175
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{KOH}$	0,025
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,050
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,049
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,86
$\text{H}_2\text{SO}_4$	1 mL

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Ảnh hưởng của N đến sinh trưởng và tích lũy lipid của *S. obliquus*

Vi tảo được nuôi cấy trong các môi trường có nồng độ N được điều chỉnh tương ứng với 0, 25, 50, 75, 100% nồng độ N (dưới dạng  $\text{NaNO}_3$ ) so với môi trường BBM gốc (Bảng 1). Nghiệm thức 100% nồng độ N (chứa 0,250 g  $\text{NaNO}_3$ /L) được dùng làm đối chứng. Khoảng 50 mL vi tảo sau nhân giống (mật độ  $4,9 \times 10^3$  tế bào/mL) được cho vào 3.900 mL môi trường dinh dưỡng tương ứng với từng nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần và được nuôi cấy ở điều kiện tương tự mục 2.1. Sau mỗi 4 ngày, môi trường dinh dưỡng tương ứng với các nghiệm thức được thêm vào các bình nuôi cấy để bù vào lượng nước thất thoát do bay hơi. Sự sinh trưởng của vi tảo được đánh giá 4 ngày/lần thông qua giá trị độ hấp thụ của dung dịch tảo ở bước sóng 680 nm ( $\text{OD}_{680}$ , Jenway 6850, Anh). Sau đó, mật độ tế bào vi tảo được tính toán dựa theo phương trình đường chuẩn  $y = 0,05x + 0,06$  ( $R^2 = 0,997$ ) được xây dựng bởi nhóm nghiên cứu; trong đó x và y lần lượt là mật độ tế bào ( $\times 10^6$  tế bào/mL) và mật độ quang ( $\text{OD}_{680}$ ).

Sinh khối vi tảo được thu sau 12 ngày nuôi cấy bằng cách lọc qua giấy lọc định tính 102 (Newstar, Trung Quốc) và sấy ở 70°C đến khối lượng không đổi trước khi tách chiết lipid.

### 2.2.2. Ảnh hưởng của P đến sinh trưởng và tích lũy lipid của *S. obliquus*

Vi tảo được nuôi cấy trong các môi trường có nồng độ P được điều chỉnh tương ứng với 0, 25, 50, 75 và 100% nồng độ P (dưới dạng  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) so với môi trường BBM gốc (Bảng 1). Nghiệm thức 100% nồng độ P (chứa 0,075 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ /L và 0,175 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /L) được dùng làm đối chứng. Khoảng 50 mL vi tảo sau nhân giống (mật độ  $4,9 \times 10^3$  tế bào/mL) được cho vào 3.900 mL môi trường dinh dưỡng

tương ứng với từng nghiệm thức. Các điều kiện thí nghiệm tương tự như mục 2.2.1.

### 2.2.3. Tách chiết lipid từ vi tảo

#### 2.2.3.1. Phương pháp 1: Phương pháp chiết xuất Soxhlet

Cân  $1 \pm 0,0001$  g sinh khối tảo khô vào cốc thủy tinh, thêm 50 mL hexane, đánh sóng siêu âm (công suất 500 W) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, và ngâm qua đêm. Sau đó, mẫu được chiết với thiết bị Soxhlet trong 6 giờ. Hỗn hợp dịch chiết được chứa trong bình cầu, cô quay chân không để loại dung môi và sấy ở 50 - 60°C trong 8 giờ (VS, 2009). Bình cầu chứa lipid sau khi sấy được lấy ra để nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng, cân và ghi nhận khối lượng. Hàm lượng lipid của vi tảo được tính toán theo công thức:  $X = (m_1 \times 100)/m$ , trong đó X (%) là hàm lượng lipid;  $m_1$  (g) là khối lượng lipid thu được sau cô quay; và m (g) là khối lượng tảo khô dùng chiết lipid.

#### 2.2.3.2. Phương pháp 2: Dung môi hexane:methanol (1:1), chloroform:methanol (2:1), và hexane có hỗ trợ sóng siêu âm

Cân  $1 \pm 0,0001$  g sinh khối tảo khô và gói bằng giấy lọc, cho vào cốc thủy tinh và thêm vào 50 mL lần lượt từng hệ dung môi, gồm hexane:methanol (1:1), chloroform:methanol (2:1), và hexane (Malekzadeh & ctv., 2016; Shin & ctv., 2018; Zarrinmehr & ctv., 2022). Mẫu được đánh sóng siêu âm (công suất 500 W) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và ngâm qua đêm. Sau đó lọc lấy dịch chiết, thêm dung môi và lặp lại các bước ly trích như trên cho đến khi dịch chiết không còn tạo vết mờ trên giấy thấm dầu (Whatman, Anh) (cho 3 - 5 giọt dung dịch lên giấy, đợi dung môi bay hơi hết và quan sát bề mặt). Gộp dịch chiết từ các lần trích, cô quay chân không để loại dung môi và tính toán tương tự như mục 2.2.3.1.

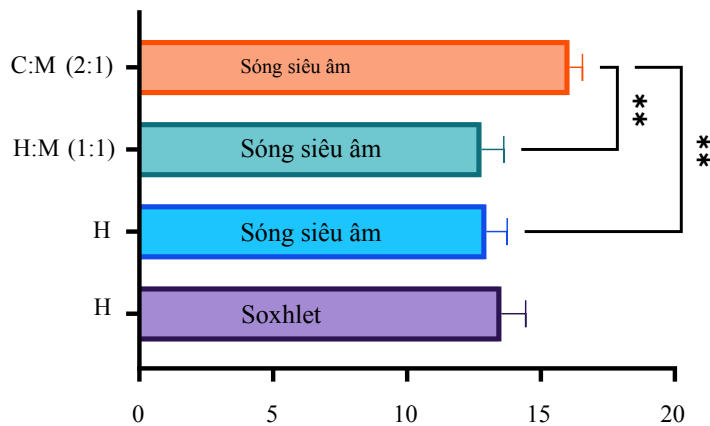
**2.2.4. Phân tích thống kê**

Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại. Phân tích phương sai ANOVA và hậu kiểm Tukey’s HSD hoặc Dunnett bằng phần mềm GraphPad Prism 9.5 được sử dụng để nhận biết sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ( $P < 0,05$ ).

**3. Kết Quả và Thảo Luận**

**3.1. Hiệu suất chiết xuất lipid từ vi tảo *S. obliquus***

Hiệu suất chiết xuất lipid từ sinh khối vi tảo *S. obliquus* được thể hiện ở Hình 1. Khi có hỗ trợ của sóng siêu âm, hệ dung môi chloroform:methanol (2:1) cho hiệu suất lipid cao nhất ( $16,1 \pm 0,5\%$ ), cao hơn đáng kể so với dung môi hexane ( $13,0 \pm 0,8\%$ ;  $P = 0,004$ ) và hệ dung môi hexane:methanol (1:1) ( $12,8 \pm 0,8\%$ ;  $P = 0,003$ ). Sử dụng dung môi hexane, hiệu suất lipid khi ly trích bằng phương pháp Soxhlet truyền thống đạt  $13,5 \pm 0,9\%$  và không khác biệt có ý nghĩa so với phương pháp sóng siêu âm ( $P > 0,05$ ).



**Hình 1.** Hàm lượng lipid từ *S. obliquus* (%) được ly trích bằng cách phương pháp khác nhau. C: chloroform, H: hexane, M: methanol. \*\*:  $P < 0,01$ .

Các nghiên cứu trước đây cho thấy chloroform:methanol (2:1) và hexane:methanol (1:1) là hai hệ dung môi phù hợp cho quá trình ly trích lipid từ các loài vi tảo (Abomohra & ctv., 2016; Shin & ctv., 2018; Zarrinmehr & ctv., 2022). Theo Ellison & ctv. (2019), hexane (dung môi không phân cực) chỉ ly trích được nhóm lipid trung tính từ tế bào vi tảo. Trong khi đó, hệ dung môi chloroform:methanol (2:1) có khả năng ly trích cả các nhóm lipid khác liên kết trên màng tế bào, dẫn đến hiệu suất ly trích lipid cao hơn so với hexane. Theo Abomohra & ctv. (2016), khi sử dụng đồng thời hỗn hợp dung môi có độ phân

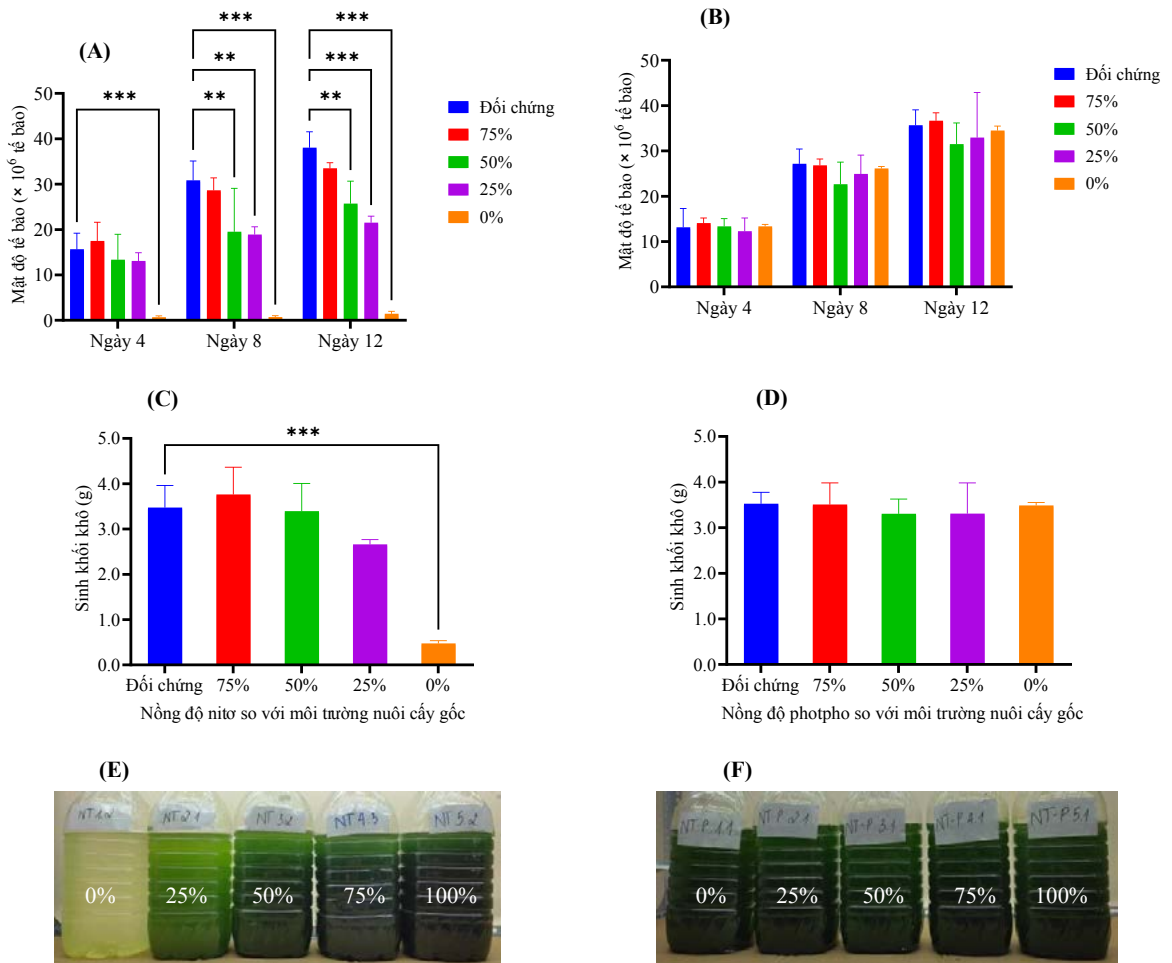
cực khác nhau, lipid từ phức hợp lipid-protein sẽ được ly trích bởi dung môi phân cực và sau đó sẽ hòa tan vào dung môi không phân cực. Hiệu suất ly trích lipid từ vi tảo cũng phụ thuộc vào bản chất của từng loại dung môi (Abomohra & ctv., 2016). Ly trích lipid là một bước quan trọng trong quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học. Hai phương pháp Folch và Bligh & Dyer, sử dụng hệ dung môi chloroform và methanol, được sử dụng rộng rãi và cho hiệu quả chiết xuất lipid cao nhất (Mansour & ctv., 2019). Tuy nhiên, dung môi chloroform có độc tính cao, gây ra nhiều ảnh hưởng tiêu cực tới môi trường và sức khỏe con

người (Zhou & ctv., 2022). Kết quả cũng cho thấy hiệu suất chiết lipid từ tế bào vi tảo bằng dung môi hữu cơ có hỗ trợ sóng siêu âm cao hơn hoặc tương đồng so với phương pháp Soxhlet truyền thống, giúp tiết kiệm thời gian và năng lượng sử dụng trong quá trình chiết xuất. Do đó, hệ dung môi hexane:methanol (1:1) đã được chọn để ly trích lipid từ vi tảo *S. obliquus* ở những thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2. Ảnh hưởng của N và P đến sinh trưởng của vi tảo *S. obliquus*

Ảnh hưởng của N và P đến khả năng sinh trưởng của *S. obliquus* được trình bày ở Hình 2. Ở tất cả các nghiệm thức, mật độ tế bào vi tảo tăng đáng kể liên tục trong suốt thời gian nuôi cấy ( $P < 0,001$ ) và đạt giá trị cao nhất vào ngày thứ 12. Tuy nhiên, tốc độ phát triển của vi tảo tại từng thời điểm thu mẫu thay đổi phụ thuộc vào nồng độ N và P có trong môi trường nuôi cấy (Hình 2A-B). Vi tảo được nuôi trong môi trường không bổ sung N phát triển chậm nhất, chỉ đạt

$1,4 \pm 0,5 \times 10^6$  tế bào/mL sau 12 ngày nuôi cấy. Mặt khác, mật độ tế bào cao nhất quan sát được ở nghiệm thức đối chứng (môi trường BBM gốc), đạt  $38,0 \pm 3,5 \times 10^6$  tế bào/mL. Kết quả cũng cho thấy mật độ tế bào ở nghiệm thức chứa 75% N không khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ( $P = 0,428$ ); tuy nhiên, khi môi trường nuôi cấy chỉ chứa 50 và 25% N so với môi trường BBM gốc, mật độ tế bào vi tảo đã giảm đáng kể (lần lượt  $P = 0,002$  và  $P < 0,001$ ). Thiếu N gây bất lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của các loài vi tảo do quá trình sinh tổng hợp chlorophyll và protein bị ức chế (Nagappan & ctv., 2020). Đối với P, mật độ tế bào vi tảo cũng tăng lên đáng kể ( $P < 0,001$ ) trong suốt thời gian nuôi cấy, đạt giá trị cao nhất vào ngày thứ 12 ở tất cả các nghiệm thức. Mật độ tế bào cao nhất quan sát được ở nghiệm thức chứa 75% P, đạt  $36,6 \pm 1,8 \times 10^6$  tế bào/mL và thấp nhất ở nghiệm thức chứa 50% P ( $31,5 \pm 4,7 \times 10^6$  tế bào/mL). Kết quả cho thấy mật độ tế bào vi tảo thay đổi không đáng kể ở tất cả các nghiệm thức trong các lần thu mẫu ( $P > 0,05$ ).



**Hình 2.** Ảnh hưởng của N và P đến mật độ tế bào (A và B) và sinh khối khô (C và D) của vi tảo *S. obliquus*. Các hình E (thí nghiệm N) và F (thí nghiệm P) được chụp khi thu mẫu sau 12 ngày nuôi cấy. \*\*:  $P < 0,01$  và \*\*\*:  $P < 0,001$ .

Sinh khối khô (SKK) của vi tảo *S. obliquus* sau 12 ngày nuôi cấy được thể hiện ở Hình 2C-D. Khi không được cung cấp N, quá trình sinh trưởng của vi tảo bị ức chế, với khối lượng SKK chỉ đạt  $0,47 \pm 0,06$  g/bình; trong khi đó ở thí nghiệm đối chứng, SKK của vi tảo là  $3,47 \pm 0,49$  g/bình ( $P < 0,001$ ). Ở các nồng độ N khác, sinh trưởng của vi tảo không có thay đổi đáng kể so với đối chứng ( $P > 0,05$ ). Điều này chứng minh rằng vi tảo *S. obliquus* vẫn có thể sinh trưởng và phát triển tốt ở môi trường có nồng độ N thấp hơn khoảng hai lần so với môi trường BBM gốc; qua đó, có thể

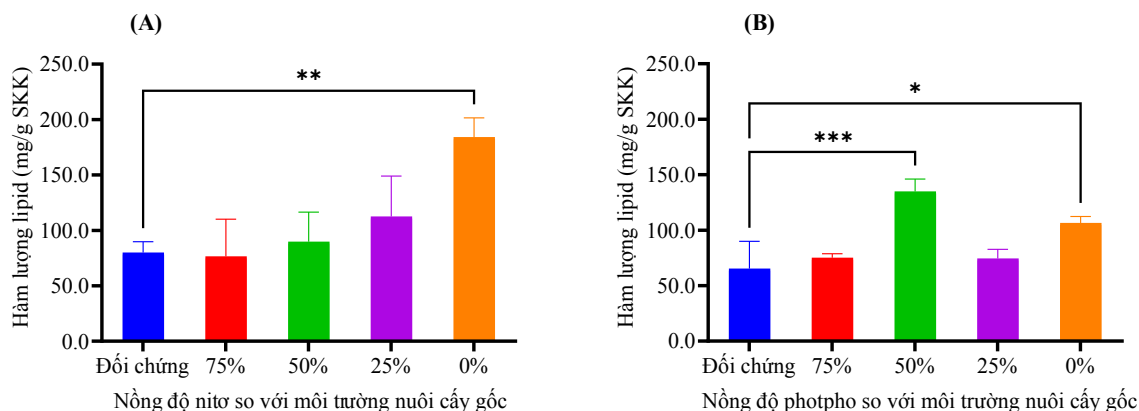
giúp giảm chi phí sản xuất ở quy mô lớn. Đối với P, khối lượng SKK thu được không khác biệt giữa các thí nghiệm ( $P > 0,05$ ) (Hình 2D). Thậm chí, ở thí nghiệm không bổ sung P, vi tảo vẫn phát triển tốt và không quan sát thấy hiện tượng ức chế sinh trưởng như ở thí nghiệm không bổ sung N (Hình 2E-F). Điều này có thể do lượng P còn lại trong dung dịch tảo sau tăng sinh (50 mL) cho vào môi trường nuôi cấy, cũng như lượng P nội bào, vẫn đủ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng P tối thiểu của *S. obliquus* trong 12 ngày nuôi cấy. Mặt khác, việc loại bỏ P cũng ít tác động đến khả

năng sinh trưởng của vi tảo so với N (Mao & ctv., 2018). Theo nghiên cứu của Goldberg & Cohen (2006), vi tảo *Monodus subterraneus* vẫn có khả năng nhân đôi mật số tế bào sau 4 ngày nuôi cấy trong môi trường không chứa P nhờ lượng P nội bào. Tương tự, việc thiếu hụt P cũng không gây ảnh hưởng đáng kể nào đến sự phát triển của vi tảo *Dunaliella tertiolecta* sau 7 ngày (Chen & ctv., 2011). Qua đó, kết quả này cũng cho thấy hàm lượng P trong môi trường BBM gốc có thể được giảm đáng kể mà không ảnh hưởng nhiều đến sự phát triển của vi tảo *S. obliquus*.

### 3.3. Ảnh hưởng của N và P đến tích lũy lipid của vi tảo *S. obliquus*

Hình 3A cho thấy sự tích lũy lipid trong tế bào vi tảo thay đổi phụ thuộc vào nồng độ N trong môi trường nuôi cấy. Hàm lượng lipid thu được ở nghiệm thức đối chứng là  $80,0 \pm 9,8$  mg/g SKK, và tăng dần khi nồng độ N giảm; cụ thể đạt  $76,5 \pm 33,7$ ;  $89,8 \pm 26,6$ ;  $112,5 \pm 36,5$ ; và  $184,1 \pm 17,4$  mg/g SKK ở các nghiệm thức chứa 75, 50, 25, và 0% N so với môi trường BBM gốc. So với nghiệm thức đối chứng, hàm lượng lipid thu được từ sinh khối vi tảo nuôi trong môi trường không bổ sung N cao hơn khoảng 2,4 lần ( $P = 0,003$ ). Sự gia tăng tích lũy lipid ở một số loài vi tảo trong điều kiện thiếu N đã được chứng minh trong các

nghiên cứu trước đây. Theo Anand & Arumugam (2015), hàm lượng lipid của vi tảo *Scenedesmus quadricauda* tăng 2,27 lần khi môi trường nuôi cấy không chứa N. Tương tự, vi tảo *Chlorella vulgaris* cũng tích lũy lipid cao gấp khoảng 3 lần (Shen & ctv., 2015) trong môi trường không chứa N. Khi dinh dưỡng N bị cạn kiệt, sự phân chia tế bào vi tảo giảm, dòng carbon chuyển từ sinh tổng hợp protein sang lipid (Goncalves & ctv., 2016). Ngoài ra, quá trình sinh tổng hợp lipid cũng chuyển sang hướng tích lũy nhiều lipid trung tính (chủ yếu là triacylglycerides) hơn các dạng lipid liên kết trên màng tế bào (Ren & ctv., 2013; Song & ctv., 2022). Mặt khác, sự thiếu hụt N ức chế quá trình tổng hợp chlorophyll làm giảm tốc độ quang hợp của vi tảo; khi đó, lượng nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) tích lũy trong tế bào sẽ ức chế men citrate synthase, ngăn cản các phân tử acetyl-CoA đi vào chu trình tricarboxylic acid (Praveenkumar & ctv., 2012). Nồng độ acetyl-CoA trong tế bào tăng kích hoạt men acetyl-CoA carboxylase chuyển hóa acetyl-CoA thành malonyl-CoA (Rivas & ctv., 2020), dẫn đến sự gia tăng khả năng tích lũy lipid trong tế bào vi tảo (Song & ctv., 2020). Hiệu quả tích lũy lipid của *S. obliquus* trong điều kiện thiếu N có thể được ứng dụng trong thực tế để thu nhận hàm lượng dầu cao phục vụ sản xuất nhiên liệu sinh học.



**Hình 3.** Ảnh hưởng của N (A) và P (B) đến sự tích lũy lipid của *S. obliquus* sau 12 ngày nuôi cấy. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; và \*\*\*:  $P < 0,001$ .



Tương tự, sự tích lũy lipid trong tế bào vi tảo *S. obliquus* cũng phụ thuộc vào nồng độ P trong môi trường nuôi cấy (Hình 3B). So với nghiệm thức đối chứng, hàm lượng lipid thu được ở nghiệm thức chứa 50% P tăng lên khoảng 2 lần ( $P < 0,001$ ):  $134,9 \pm 11,2$  so với  $65,4 \pm 24,7$  mg/g SKK. Ở nghiệm thức không bổ sung P, hàm lượng lipid đạt  $106,5 \pm 5,8$  mg/g SKK, cao hơn khoảng 1,6 lần so với đối chứng ( $P = 0,01$ ). Nghiên cứu của Shen & ctv. (2015) cũng cho thấy vi tảo *Chlorella vulgaris* tích lũy lipid cao gấp khoảng 1,8 lần khi được nuôi cấy trong môi trường không chứa P. Photpho là một nguyên tố đa lượng quan trọng, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp phospholipids, nucleotides, nucleic acids, ATP, và NADP trong tế bào. Theo Song & ctv. (2022), sự thiếu hụt P dẫn đến ức chế quá trình quang hợp của vi tảo; khi đó, dòng carbon dùng cho quang hợp sẽ dịch chuyển sang sinh tổng hợp các hợp chất cao phân tử giàu năng lượng (chủ yếu là lipids). Mặc dù phương pháp gây stress bằng môi trường thiếu N và P là một trong những cách hiệu quả để gia tăng sự tích lũy lipid trong tế bào vi tảo, sự sụt giảm sinh khối trong quá trình nuôi cấy là một nhược điểm ảnh hưởng lớn đến hiệu suất tạo lipid. Do đó, các nghiên cứu trong tương lai cần tập trung khắc phục nhược điểm này.

#### 4. Kết Luận

Ly trích lipid từ tế bào vi tảo bằng hệ dung môi hexane:methanol (1:1) sẽ giúp tiết kiệm được dung môi, thời gian so với phương pháp Soxhlet truyền thống, an toàn cho người thực hiện và môi trường sinh thái. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy quá trình sinh trưởng và tích lũy lipid của vi tảo *S. obliquus* chịu ảnh hưởng của nồng độ N và ít bị tác động bởi nồng độ P trong môi trường nuôi cấy. Hàm lượng lipid cao nhất ghi nhận được là  $184,1 \pm 17,4$  mg/g SKK (không bổ sung N) và  $134,9 \pm 11,2$  mg/g SKK (50% P so với môi trường gốc). Ngoài ra, đây cũng là tiền đề cho các nghiên cứu về khảo sát

đánh giá tác động kết hợp các yếu tố môi trường và dinh dưỡng khác nhau đến khả năng sinh trưởng và tích lũy lipid của vi tảo *S. obliquus*.

#### Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

#### Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ nguồn đề tài sinh viên mã số CS-SV21-KHSH-08 của Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

Các tác giả chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho nhóm nghiên cứu sử dụng thiết bị quang phổ UV-Vis Jenway 6850.

#### Tài liệu tham khảo (References)

- Abomohra, A. E. F., Jin, W., & Sheekh, M. E. (2016). Enhancement of lipid extraction for improved biodiesel recovery from the biodiesel promising microalga *Scenedesmus obliquus*. *Energy Conversion and Management* 108, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.11.007>.
- Anand, J., & Arumugam, M. (2015). Enhanced lipid accumulation and biomass yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Bioresource Technology* 188, 190-194. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.097>.
- Brindhadevi, K., Mathimani, T., Rene, E. R., Shanmugam, S., Nguyen, C. T. L., & Pugazhendhi, A. (2021). Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel. *Fuel* 284, 119058. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119058>.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. Y. S., & Salley, S. O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae

- Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102(2), 1649-1655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- Ellison, C. R., Overa, S., & Boldor, D. (2019). Central composite design parameterization of microalgae/cyanobacteria co-culture pretreatment for enhanced lipid extraction using an external clamp-on ultrasonic transducer. *Ultrasonics Sonochemistry* 51, 496-503. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2018.05.006>.
- Goldberg, I. K., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus Subterraneus*. *Phytochemistry* 67(7), 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>.
- Goncalves, E. C., Wilkie, A. C., Kirst, M., & Rathinasabapathi, B. (2016). Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield. *Plant Biotechnology Journal* 14(8), 1649-1660. <https://doi.org/10.1111/pbi.12523>.
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(2), 269-274. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495-6>.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54(4), 621-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>.
- Malekzadeh, M., Najafabadi, H. A., Hakim, M., Feilizadeh, M., Vossoughi, M., & Rashtchian, D. (2016). Experimental study and thermodynamic modeling for determining the effect of non-polar solvent (hexane)/polar solvent (methanol) ratio and moisture content on the lipid extraction efficiency from *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 201, 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.066>.
- Mansour, E. A., Enin, S. A. A. E., Hamouda, A. S., & Mahmoud, H. M. (2019). Efficacy of extraction techniques and solvent polarity on lipid recovery from domestic wastewater microalgae. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 12, 100271. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2019.100271>.
- Mao, X., Wu, T., Sun, D., Zhang, Z., & Chen, F. (2018). Differential responses of the green microalga *Chlorella zofingiensis* to the starvation of various nutrients for oil and astaxanthin production. *Bioresource Technology* 249, 791-798. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.090>.
- Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P. C., Jayaraman, H., Alagarsamy, V., Pugazhendhi, A., & Ponnusamy, V. K. (2020). Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: Evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae. *Process Biochemistry* 91, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.027>.
- Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M. A., & Thajuddin, N. (2012). Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy* 37, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.035>.
- Putt, R., Singh, M., Chinnasamy, S., & Das, K. (2011). An efficient system for carbonation of high-rate algae pond water to enhance CO<sub>2</sub> mass transfer. *Bioresource Technology* 102(3), 3240-3245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.029>.
- Ren, H. Y., Liu, B. F., Ma, C., Zhao, L., & Ren, N. Q. (2013). A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for Biofuels* 6(1), 143. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-143>.

- Rivas, J. K. S., Altamirano, R. H., Cervantes, V. Y. M., Gómez, E. J. B., & Chairez, I. (2020). Biodiesel production, through intensification and profitable distribution of fatty acid methyl esters by a microalgae-yeast co-culture, isolated from wastewater as a function of the nutrients' composition of the culture media. *Fuel* 280, 118633. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118633>.
- Shen, X. F., Chu, F. F., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2015). Biosynthesis of high yield fatty acids from *Chlorella vulgaris* NIES-227 under nitrogen starvation stress during heterotrophic cultivation. *Water Research* 81, 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.003>.
- Shin, H. Y., Shim, S. H., Ryu, Y. J., Yang, J. H., Lim, S. M., & Lee, C. G. (2018). Lipid extraction from *Tetraselmis* sp. microalgae for biodiesel production using hexane-based solvent mixtures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 23, 16-22. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0392-9>.
- Song, X., Liu, B. F., Kong, F., Ren, N. Q., & Ren, H. Y. (2022). Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: Application, mechanisms and challenges. *Resources, Conservation and Recycling* 183, 106355. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106355>.
- Song, X., Zhao, Y., Han, B., Li, T., Zhao, P., Xu, J. W., & Yu, X. (2020). Strigolactone mediates jasmonic acid-induced lipid production in microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 under nitrogen deficiency conditions. *Bioresource Technology* 306, 123107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123107>.
- VS (Vietnam Standards). (2009). Fish and fishery products - Determination of fat content (TCVN 3703:2009). Retrieved July 05, 2023, from <https://luatvietnam.vn/nong-nghiep/tieu-chuan-viet-nam-tcvn-3703-2009-223173-d3.html>.
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Gheethi, A. A., Gokare, R. A., & Ambati, R. R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells* 10(2), 393. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>.
- Zarrinmehr, M. J., Daneshvar, E., Nigam, S., Gopinath, K. P., Biswas, J. K., Kwon, E. E., Wang, H., Farhadian, O., & Bhatnagar, A. (2022). The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. *Bioresource Technology* 344B, 126303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126303>.
- Zhou, J., Wang, M., Saraiva, J. A., Martins, A. P., Pinto, C. A., Prieto, M. A., Gandara, J. S., Cao, H., Xiao, J., & Barba, F. J. (2022). Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry* 384, 132236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132236>.