

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP TRÍCH LY THU NHẬN CHLOROPHYLL TỪ RONG *Ceratophyllum submersum*

Lê Thị Hồng Ánh*, Trần Việt Hưng, Hoàng Thị Ngọc Nhơn

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: anhlt@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 14/4/2025; Ngày nhận bài sửa: 14/6/2025; Ngày chấp nhận đăng: 16/6/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu này hướng đến thu nhận hàm lượng chlorophyll tổng từ rong *Ceratophyllum submersum* L. bằng ba phương pháp chiết xuất, bao gồm chiết xuất ngâm tĩnh, chiết xuất có sự hỗ trợ của vi sóng và sóng siêu âm. Mục tiêu của nghiên cứu là so sánh ba phương pháp chiết xuất trong việc thu chlorophyll từ *C. submersum*. Đối với phương pháp ngâm tĩnh với dung môi ethanol có nồng độ 80% ở nhiệt độ 50 °C trong thời gian 4 giờ thu được hàm lượng chlorophyll là 0,176 mg/g_{ck}. Phương pháp chiết xuất có sự hỗ trợ của vi sóng với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1/30 w/v, công suất 360 W và thời gian 5 phút, hàm lượng chlorophyll thu được là 0,181 mg/g_{ck}. Phương pháp chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm với công suất 262,5 W trong 20 phút cho hàm lượng chlorophyll là 0,147 mg/g_{ck}. Như vậy, phương pháp chiết xuất bằng vi sóng hiệu quả cao so với hai phương pháp ngâm tĩnh và siêu âm.

Từ khóa: *Ceratophyllum submersum*, chlorophyll, ngâm tĩnh, siêu âm, vi sóng.

1. MỞ ĐẦU

Rong *Ceratophyllum submersum* L. hay còn gọi là rong đuôi chồn, là một loài thực vật thủy sinh thuộc chi *Ceratophyllum*, sống hoàn toàn chìm dưới mặt nước. Rong *C. submersum* có khả năng sinh trưởng nhanh, là một nguồn sinh khối bị loại bỏ ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, đây là nguồn nguyên liệu có giá trị tiềm năng khai thác và ứng dụng. Rong *C. submersum* là loài thực vật bậc thấp sống hoàn toàn dưới nước, nhờ vào đó mà rong chứa hàm lượng chlorophyll lớn, bao gồm chlorophyll a và chlorophyll b, giúp quá trình quang hợp hiệu quả cho dù sống ở nơi có cường độ ánh sáng thấp [1].

Chlorophyll (diệp lục tố, diệp lục) là sắc tố quang tổng hợp màu xanh lá cây có ở vi khuẩn lam cũng như ở lục lạp của tảo và thực vật [2]. Chlorophyll tồn tại dưới nhiều dạng khác nhau, trong đó phổ biến nhất là chlorophyll a và chlorophyll b, với tỷ lệ thường gặp là 3:1. Trong hai loại này, chlorophyll a có màu xanh lam và kém bền vững hơn so với chlorophyll b. Cả hai đều có cấu trúc chứa nhân porphyrin với ion magiê (Mg^{2+}) ở trung tâm, cấu trúc này đóng vai trò quan trọng trong việc hấp thụ và chuyển hóa ánh sáng trong quá trình quang hợp [3]. Một dẫn xuất của chlorophyll, chlorophyllin, được sử dụng làm phụ gia thực phẩm vì nó ổn định hơn và chống oxy hóa tốt hơn [4]. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng chlorophyll cùng với các dẫn xuất của nó có khả năng gắn kết với các chất gây ung thư, từ đó giúp giảm thiểu ảnh hưởng của độc tố và bảo vệ DNA trước sự tấn công của các gốc tự do. Điều này cho thấy vai trò tiềm năng của chlorophyll trong việc hỗ trợ phòng ngừa tổn thương tế bào [5]. Về mặt cấu trúc, chlorophyll có một khung porphyrin lớn - đây là một hệ vòng liên hợp gồm bốn vòng pyrrole kết nối với nhau thông qua các cầu nối chứa nguyên tử carbon. Mỗi vòng pyrrole bao gồm bốn nguyên tử carbon và một nguyên tử nitơ, trong đó bốn nguyên tử nitơ định hướng vào tâm phân tử để tạo thành một vị trí lý tưởng cho sự gắn kết với ion kim loại, thường là magiê (Mg^{2+}). Sự hiện diện của ion kim loại này đóng vai trò quan trọng trong việc hấp thụ ánh sáng và truyền năng lượng trong quá trình quang hợp [6]. Chlorophyll a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) có bước sóng 660-665 nm và có màu từ xanh da trời đến xanh lá cây. Đây là loại chlorophyll phổ biến nhất, có mặt trong tất cả các vi khuẩn lam và sinh vật nhân chuẩn quang hợp. Chlorophyll a chỉ hấp thụ tia xanh và đỏ, vì vậy nó phản xạ tia màu lục. Chlorophyll b hấp thụ bước sóng 642-652 nm và có màu từ vàng đến xanh lá cây. Cấu trúc của chlorophyll b và chlorophyll a tương tự nhau, chỉ khác ở vị trí C-7 của vòng pyrrole thứ hai (vòng B).

Chlorophyll a có nhóm methyl ($-CH_3$) trong khi chlorophyll b có nhóm formyl ($-CHO$), giúp hấp thụ tối đa các bước sóng ngắn hơn [7].

Phương pháp chiết xuất chlorophyll thường được áp dụng chủ yếu bao gồm phương pháp cơ học hay sử dụng dung môi bay hơi. Việc sử dụng các phương pháp hiện đại cho việc thu nhận được các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao như vi sóng và sóng siêu âm cho thấy mang lại hiệu quả cao. Khi lựa chọn phương pháp chiết xuất phù hợp thì phải dựa vào khả năng chiết xuất thu được hàm lượng chlorophyll cao và có hoạt tính sinh học. Attal và cộng sự (2022) nghiên cứu chiết xuất và hoạt tính sinh học của chlorophyll từ rong *Chlorella* spp. bằng phương pháp siêu âm [8]. Nguyen và cộng sự (2021) đã thực hiện chiết xuất chlorophyll và khả năng kháng oxy hóa từ *Pandanus amaryllifolius* Roxb. bằng phương pháp vi sóng. Vì thế, nghiên cứu này với mục tiêu so sánh hiệu quả thu hồi chlorophyll bằng phương pháp ngâm tĩnh, vi sóng và sóng siêu âm để định hướng ứng dụng có hiệu quả.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu: Rong *C. submersum* được thu hoạch vào tháng 5/2024 ở các ao nuôi tôm tại huyện Gò Công Đông, Tiền Giang. Rong được vận chuyển trong thùng xốp trong ngày đến Trung tâm Thí nghiệm thực hành Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh. Tiếp đó, nguyên liệu được sấy khô ở nhiệt độ 60 °C với tốc độ gió 1 m/giây trong 10 giờ sấy cho đến khi độ ẩm nguyên liệu chỉ còn khoảng 10%. Sau quá trình sấy, nguyên liệu được xay nhuyễn bằng máy xay cơ học và rây qua lưới có kích thước 80 mesh để đảm bảo sản phẩm đồng nhất. Mẫu được lưu trữ trong túi zipper dày, được lưu trữ ở điều kiện 5 °C để dùng trong suốt quá trình thử nghiệm.

Hóa chất: Ethanol (99,5%), methanol (99,5%), n-hexane (99,5%) và $MgCO_3$ là sản phẩm thương mại của Xilong Scientific Co., Ltd. (Trung Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng của dung môi đến quá trình trích ly thu nhận chlorophyll

Phương pháp dựa trên nghiên cứu của Lê Thị Hồng Ánh và cộng sự có hiệu chỉnh cho phù hợp. Cân 1 g bột nguyên liệu cho vào các cốc có thể tích 100 mL. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v) và bổ sung 0,5% $MgCO_3$, khuấy đều để bột nguyên liệu được trộn hoàn toàn trong dung môi. Các loại dung môi được khảo sát là ethanol, methanol và n-hexane với các nồng độ là 50, 60, 70, 80 và 90%. Nhiệt độ khảo sát ở các mốc là 30, 40, 50, 60 và 70 °C. Thời gian được khảo sát ở 1, 2, 3, 4 và 5 giờ. Các mẫu được giữ ổn nhiệt bằng thiết bị Memmert WNB10 (Đức). Hỗn hợp sau đó được ly tâm bằng máy Hermel Z206A (Mỹ) ở tốc độ 5.000 rpm trong 10 phút và lọc để thu phần dịch trong suốt. Mẫu dịch chiết được xác định bởi quang phổ nhằm xác định lượng chlorophyll tại bước sóng 663 nm và 645 nm [9]. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly chlorophyll có sự hỗ trợ của vi sóng

Phương pháp dựa trên nghiên cứu của Yang Tong và cộng sự có hiệu chỉnh cho phù hợp [10]. Cân 1 g bột nguyên liệu vào các cốc có thể tích 100 mL. Bổ sung dung môi ethanol ở nồng độ 30% và 0,5% $MgCO_3$, khuấy đều để bột nguyên liệu trộn hoàn toàn dung môi. Tiến hành khảo sát tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt là 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 và 1/50 (w/v). Công suất được khảo sát ở các mốc là 90, 180, 270, 360 và 450 W. Thời gian khảo sát ở 2, 3, 4, 5 và 6 phút. Thiết bị vi sóng máy Sharp 900VNS (Việt Nam). Tiếp theo, mẫu được giữ ở 45 °C trong 20 phút bằng thiết bị Memmert WNB10 (Đức). Hỗn hợp sau đó được ly tâm bằng máy Hermel Z206A (Mỹ) ở tốc độ 5.000 rpm trong 10 phút và lọc để thu phần dịch trong suốt. Mẫu dịch chiết được xác định bởi quang phổ nhằm xác định lượng chlorophyll tại bước sóng 663 nm và 645 nm [9]. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng của công suất và thời gian đến quá trình trích ly thu nhận chlorophyll có sự hỗ trợ của siêu âm

Phương pháp dựa trên nghiên cứu của Weibao và cộng sự có hiệu chỉnh cho phù hợp. Cân 1 g bột nguyên liệu cho vào các cốc có thể tích 100 mL. Bổ sung dung môi ethanol ở nồng độ 80% [11]. Với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v) và hàm lượng $MgCO_3$ là 0,5%, khuấy đều để bột nguyên liệu trộn hoàn toàn dung môi. Tiến hành khảo sát công suất siêu âm ở các mốc là 150, 187,5, 225, 262,5 và

300 W. Thời gian khảo sát ở các mốc 10, 15, 20, 25 và 30 phút. Thiết bị siêu âm được sử dụng là VC 750 Sonic (Mỹ). Tiếp theo, các mẫu được giữ ở 45 °C trong 20 phút bằng thiết bị Memmert WNB10 (Đức). Hỗn hợp sau đó được ly tâm bằng máy Hermel Z206A (Mỹ) với tốc độ 5.000 rpm trong 10 phút và lọc để thu phần dịch trong suốt. Mẫu dịch chiết được xác định bởi quang phổ nhằm xác định lượng chlorophyll tại bước sóng 663 nm và 645 nm [9]. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3. Phương pháp xác định hàm lượng chlorophyll bằng phương pháp quang phổ

Hàm lượng chất chlorophyll có trong dung dịch được biểu thị qua độ hấp thụ ở bước sóng 645 nm và 663 nm. Tại bước sóng này, chlorophyll có phổ hấp thụ cực đại. Rajalakshmi và cộng sự đã áp dụng đo độ hấp thụ và xác định hàm lượng chlorophyll [3]. Công thức tính lượng chlorophyll như sau:

$$\text{Lượng chlorophyll tổng } (\mu\text{g/mL}) = 20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663})$$

$$\text{Lượng chlorophyll a } (\mu\text{g/mL}) = 12,7 (A_{663}) + 2,69 (A_{645})$$

$$\text{Lượng chlorophyll b } (\mu\text{g/mL}) = 22,9 (A_{645}) + 4,68 (A_{663})$$

$$\text{Công thức quy đổi } \mu\text{g/mL sang mg/g}_{\text{ck}}: \text{mg/g}_{\text{ck}} = \frac{C (\mu\text{g/mL}) \times V (\text{mL})}{1.000 \times m (\text{g})}$$

Trong đó : C là nồng độ chlorophyll trong dịch chiết ($\mu\text{g/mL}$), V là thể tích dịch chiết thu được (mL), M là khối lượng mẫu ban đầu (g) và 1.000 là hệ số dùng để đổi từ microgam sang miligam.

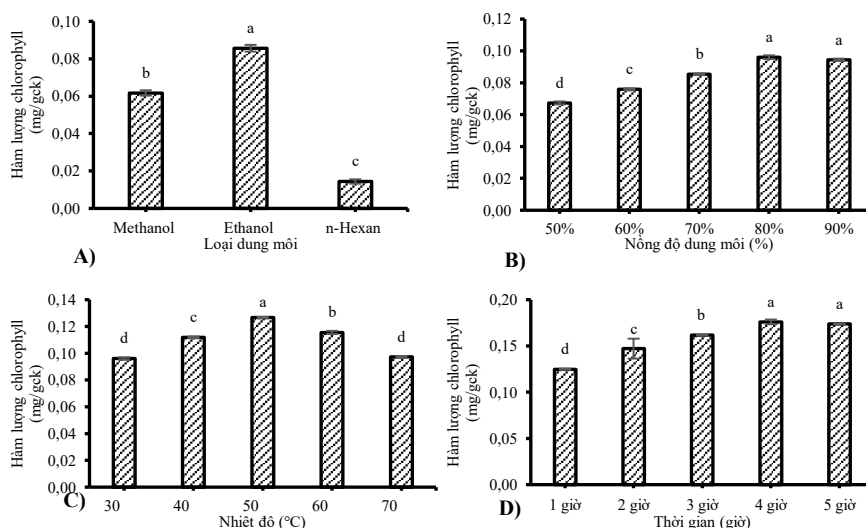
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần. Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 (Microsoft, Hoa Kỳ) và phương pháp thống kê ANOVA được xử lý bởi phần mềm Minitab 2019 (Minitab, Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của loại dung môi, nồng độ dung môi, nhiệt độ, thời gian trích ly đến quá trình trích ly thu nhận chlorophyll

Dung môi là yếu tố ảnh hưởng tới hàm lượng chlorophyll thu nhận, được dựa vào tính phân cực và không phân cực. Chlorophyll có bản chất kỵ nước do có chứa gốc phytol dài, nên nó tan tốt trong các dung môi hữu cơ ít phân cực và không phân cực như methanol, ethanol và n-hexan. Khi chiết xuất thu nhận chlorophyll, việc lựa chọn dung môi phù hợp với độ phân cực và sự hòa tan được hợp chất chlorophyll. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của loại dung môi, nồng độ, nhiệt độ và thời gian ảnh hưởng đến quá trình thu nhận chlorophyll được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của loại dung môi (A), nồng độ dung môi (B), nhiệt độ (C) và thời gian (D) đến hàm lượng chlorophyll

Trong từng yếu tố khảo sát, các chữ cái khác nhau trên thanh biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ được xác định thông qua phân tích ANOVA

Kết quả thể hiện nồng độ dung môi có tác động lớn đến hàm lượng chlorophyll thu được. Hình 1A thể hiện hàm lượng chlorophyll thu nhận đạt được hàm lượng cao nhất ở loại dung môi ethanol ($0,0856 \pm 0,002 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$), tiếp đến là methanol ($0,0617 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$) và cuối cùng là dung môi n-hexane ($0,0144 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$). Việc này có thể lý giải như sau, ethanol có độ phân cực trung bình hòa tan tốt với hợp chất chlorophyll, methanol có độ phân cực nhưng thấp hơn ethanol dẫn đến có hàm lượng chlorophyll thấp hơn ethanol, còn đối với n-hexan là dung môi không phân cực, nên ít phù hợp cho việc thu nhận hợp chất chlorophyll, do đó hàm lượng chlorophyll có hàm lượng thấp nhất trong ba loại dung môi. Stauffer và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của hai loại dung môi acetone và ethanol trên phương diện hiệu suất trích ly chlorophyll và đã đưa ra kết luận rằng dung môi acetone thì kém hơn so với dung môi ethanol. Tuy nhiên, hiệu suất trích ly này của các dung môi khác nhau còn phụ thuộc vào các hợp phần cấu tạo của các loại tảo khác nhau [12]. Methanol là một dung môi có tính độc hại nên thường ethanol được sử dụng thay cho methanol. Ethanol là dung môi có độ an toàn cao hơn methanol và n-hexane. Do đó, dung môi ethanol làm dung môi chiết xuất hợp chất chlorophyll để phù hợp vào trong sản xuất bột màu rất tiềm năng [13].

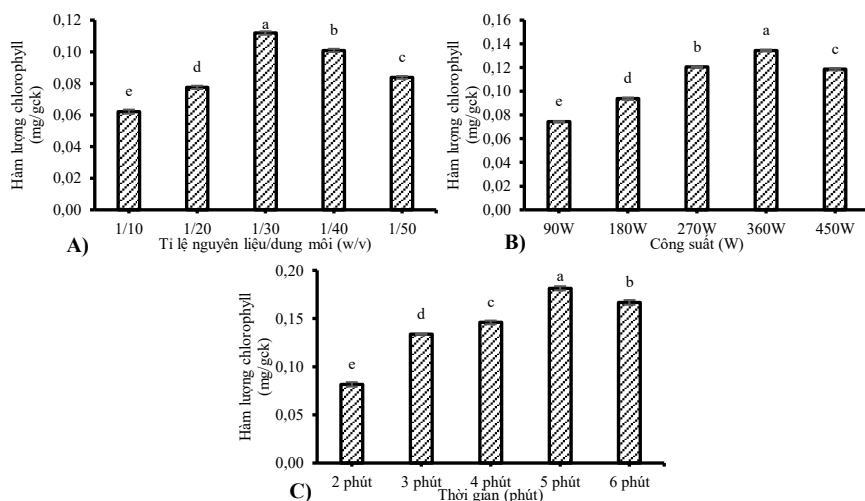
Nồng độ dung môi ethanol thích hợp sẽ thu được hàm lượng chlorophyll cao nhất và có độ bền màu khi chiết xuất. Kết quả thực nghiệm ở Hình 1B cho thấy khi nồng độ dung môi tăng từ 50% đến 70% thì hàm lượng chlorophyll có sự gia tăng (tăng từ $0,067 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$ đến $0,085 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$) và đạt được hàm lượng cao nhất ở nồng độ 80% ($0,096 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$), khi nồng độ dung môi ở 90% thì hàm lượng chlorophyll bắt đầu giảm xuống ($0,094 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$) nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nguyên nhân do ethanol có nồng độ thấp thì hàm lượng hợp chất chlorophyll sẽ thấp vì tỷ lệ nước trong dung môi trích ly sẽ nhiều hơn ethanol sẽ làm giảm đi sự khếch tán của chlorophyll vào trong dung môi ethanol, khi đó sẽ có số hợp chất protein, polysaccharide và các hợp chất vô cơ khác cũng chiết xuất ra khỏi nguyên liệu. Theo nghiên cứu của Lê Thị Hồng Ánh và cộng sự (2016), khi chiết xuất hợp chất chlorophyll cao nhất và được nồng độ dung môi thích hợp là 80% [7].

Ảnh hưởng của nhiệt độ cũng là một thông số quan trọng tác động lên hàm lượng chlorophyll thu được. Khi chiết xuất chlorophyll với nhiệt độ cao sẽ tác động mạnh lên hàm lượng chlorophyll chiết xuất. Kết quả thực nghiệm ở Hình 1C cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 30 °C đến 50 °C thì hàm lượng chlorophyll có xu hướng tăng dần (tăng dần từ $0,096 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$ đến $0,127 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$), tuy nhiên khi nhiệt độ tăng lên 60 °C và 70 °C thì hàm lượng chlorophyll có xu hướng giảm mạnh, chỉ còn $0,097 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$. Thực tế, nhiệt độ có ảnh hưởng trực tiếp lên quá trình thu nhận, nhiệt độ tăng cao thì các hợp chất khếch tán vào dung môi cũng tăng lên, tuy nhiên hợp chất màu chlorophyll không bền nhiệt nên khi ở nhiệt độ quá cao sẽ ảnh hưởng mạnh lên hàm lượng thu nhận hợp chất.

Trong quá trình thu nhận các hợp chất thời gian là yếu tố rất quan trọng, khi chiết xuất với thời gian phù hợp thì khả năng khếch tán chlorophyll ra ngoài dung môi nhiều hơn. Dựa vào kết quả thực nghiệm ở Hình 1D, có thể thấy rằng khi tăng thời gian từ 1 giờ đến 4 giờ thì hàm lượng chlorophyll có xu hướng tăng cao, hàm lượng chlorophyll cao nhất ở 4 giờ đạt được hàm lượng là $0,174 \pm 0,001 \text{ mg/g}_{\text{ck}}$. Tuy nhiên, khi tăng lên 5 giờ thì hàm lượng chlorophyll không có sự khác biệt khi xử lý số liệu ANOVA, từ đó chọn thời gian thấp hơn nhưng không ảnh hưởng đến hàm lượng thu được. Sự giảm này có thể hiểu được khi thời gian tăng lên trong quá trình chiết xuất, nồng độ bị chênh lệch không còn trong dung dịch đạt trạng thái bão hòa kết hợp với nhiệt độ cao sẽ làm cho chlorophyll bị biến đổi thành pheophytin gây giảm hàm lượng chlorophyll [14].

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, công suất vi sóng và thời gian vi sóng đến quá trình trích ly thu nhận chlorophyll

Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là một thông số tác động lên hàm lượng thu nhận chlorophyll. Song song với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi thì công suất và thời gian cũng tác động mạnh lên quá trình chiết xuất thu nhận. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của vi sóng được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu và dung môi (A), công suất vi sóng (B) và thời gian vi sóng (C) đến hàm lượng chlorophyll

Trong từng yếu tố khảo sát, các chữ cái khác nhau trên thanh biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$, được xác định thông qua phân tích ANOVA

Khi chiết xuất, tỷ lệ nguyên liệu dung môi càng cao thì hàm lượng thu nhận càng lớn. Tuy nhiên, khi với tỷ lệ quá cao thì sẽ làm tiêu tốn lượng dung môi và thời gian tách dung môi ra khỏi hợp chất quá lâu sẽ làm chất màu bị thoái hóa [15]. Do đó, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi khảo sát nhằm đem lại hiệu quả cho quá trình chiết xuất, đồng thời lượng dung môi sẽ không bị tiêu hao quá nhiều. Thực nghiệm khảo sát các tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1/10 - 1/50 (w/v) có bước nhảy 1/10 w/v để tìm ra tỷ lệ có hiệu quả chiết xuất thu nhận chlorophyll cao nhất. Dựa vào kết quả ở Hình 2A, hàm lượng chlorophyll tăng dần khi ở tỷ lệ 1/10 đến 1/30 (w/v), hàm lượng chlorophyll có sự thay đổi tăng từ $0,062 \pm 0,001$ mg/g_{ck} đến $0,112 \pm 0,001$ mg/g_{ck}. Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi tăng lên 1/40 và 1/50 (w/v) thì hợp chất chlorophyll giảm mạnh, chỉ còn $0,084 \pm 0,001$ mg/g_{ck}. Sự thay đổi là khi trên cùng khối nguyên liệu lượng dung môi quá ít, không đủ để chlorophyll thoát hết ra khỏi tế bào. Nguyên nhân có thể do dung môi quá ít không thấm đều vào nguyên liệu, làm giảm khả năng hòa tan chlorophyll. Khi tăng thể tích dung môi, chênh lệch nồng độ lớn hơn thúc đẩy chlorophyll khuếch tán hiệu quả hơn. Tuy nhiên, khi tăng lượng dung môi mà hợp chất trong nguyên liệu là cố định đòi hỏi phải cần công suất vi sóng cao hơn và thời gian lâu hơn để đạt được hàm lượng cao như với bước nhảy trước đó [16]. Ngoài ra, khi lượng dung môi tăng cũng sẽ dẫn đến sự hòa tan không mong muốn của các chất, làm giảm tính chọn lọc của dung môi đến hợp chất mong muốn đồng thời sẽ làm loãng dịch làm giảm hiệu quả kinh tế [17, 18].

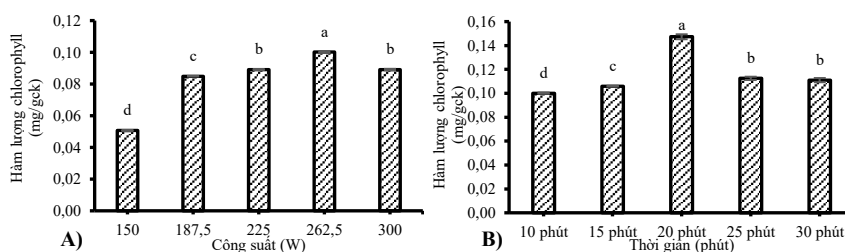
Kết quả ở Hình 2B cho thấy công suất vi sóng ảnh hưởng đến khả năng chiết xuất chlorophyll. Khi tăng công suất từ 90 W lên 360 W, hàm lượng chlorophyll thu được tăng dần từ $0,074$ mg/g_{ck} lên $0,093$ mg/g_{ck}, sau đó đạt $0,120$ mg/g_{ck} và cực đại ở $0,134$ mg/g_{ck} tại mức 360 W. Tuy nhiên, khi tăng công suất vi sóng, hợp chất chlorophyll thu nhận giảm mạnh, cho thấy sự phá hủy hoặc phân hủy chlorophyll có thể xảy ra do tác động nhiệt quá mức. Điều này lý giải khi tăng công suất sẽ làm nhiệt độ tăng mạnh dẫn đến tạo ra các dao động của các phân tử phân cực làm tăng áp suất nội bào và phá vỡ thành tế bào, giải phóng các chất ra ngoài tế bào một cách nhanh và triệt để hơn. Khi tăng công suất từ 360 W lên 450 W, hàm lượng chlorophyll giảm vì công suất cao sẽ làm biến tính phân hủy trong chlorophyll. Trong công nghiệp sản xuất, để làm giảm mức tiêu thụ năng lượng thì công suất vi sóng xấp xỉ 300 W thường được sử dụng [10]. Nguyễn Hồng Khôi Nguyên và cộng sự cũng cho thấy tại công suất 360 W, hàm lượng chlorophyll thu được ở mức cao nhất [19]. Do đó, mức công suất 360 W được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thời gian xử lý vi sóng ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng cơ chất thu được. Quá trình này không chỉ bao gồm tác động của vi sóng lên các phân tử và dung môi chiết xuất mà còn là thời gian để các hợp chất khuếch tán từ tế bào ra môi trường dung môi. Nếu thời gian xử lý quá ngắn, các chất tan chưa kịp khuếch tán hoàn toàn, dẫn đến hiệu suất chiết xuất thấp. Ngược lại, khi thời gian được tăng lên đến mức tối ưu, quá trình khuếch tán diễn ra nhanh chóng và đạt trạng thái cân bằng. Sau thời điểm này, việc thời gian xử lý dài không còn làm tăng đáng kể lượng chất thu được trong khoảng thời gian khảo sát. Thời gian tăng lên khi đạt trạng thái cân bằng, khoảng nhiệt độ và áp suất đó sẽ chèn ép lên cấu trúc của

chất tan làm cho một số loại chất tan bị vỡ ra nhiều hơn và nhiệt độ sẽ tiếp tục ảnh hưởng đến các hạt nhỏ đó làm cho chúng bị phân hủy đi trong môi trường dung môi [4]. Từ dữ liệu ở Hình 2C cho thấy kết quả khảo sát công suất 360 W trong thời gian 5 phút thu được hàm lượng chlorophyll 0,181 mg/g_{ck}. Tuy nhiên, khi ở thời gian 6 phút thì hàm lượng chlorophyll giảm xuống chỉ còn 0,167 mg/g_{ck}. Nguyễn Hồng Khôi Nguyên và cộng sự (2021) nghiên cứu trích ly chlorophyll trong tảo xoắn ở công suất 360 W trong 120 giây đã thu được hàm lượng 13,67 µg/mL [19].

3.3. Ảnh hưởng của công suất siêu âm, thời gian siêu âm đến quá trình trích ly thu nhận chlorophyll

Công suất siêu âm ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trích ly. Khi công suất siêu âm tăng, năng lượng siêu âm truyền vào dung môi và nguyên liệu cũng tăng, làm gia tăng hiệu ứng cavitation và hiệu ứng cơ học như va đập, phá vỡ cấu trúc tế bào thực vật giúp các hợp chất hoạt sinh học dễ dàng thoát ra ngoài [20]. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Hình 3.



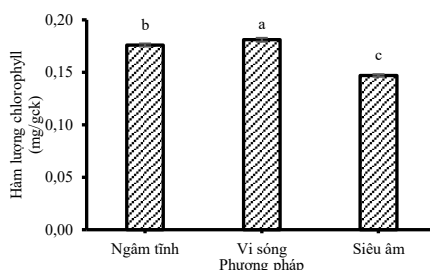
Hình 3. Ảnh hưởng công suất siêu âm (A) và thời gian siêu âm (B) đến hàm lượng chlorophyll. Trong từng yếu tố khảo sát, các chữ cái khác nhau trên thanh biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$, được xác định thông qua phân tích ANOVA

Công suất siêu âm có vai trò quan trọng trong nghiên cứu, ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất thu hồi và tốc độ biến đổi của hợp chất chlorophyll. Kết quả thực nghiệm ở Hình 3A cho thấy khi công suất tăng dần thì hàm lượng chlorophyll cũng tăng, đạt giá trị cao nhất ở công suất 262,5 W là $0,1 \pm 0,001$ mg/g_{ck}. Quá trình này lý giải rằng là khi công suất siêu âm tăng lên thì năng lượng cũng tăng theo thì quá trình thúc đẩy các hợp chất có trong nguyên liệu được chiết xuất nhanh hơn và hiệu quả hơn. Tuy nhiên, khi tăng công suất đến một ngưỡng cân bằng thì hàm lượng chlorophyll sẽ ổn định hoặc giảm dần xuống do sự tác động sinh nhiệt đến hợp chất chlorophyll. Nhiệt độ trong quá trình chiết xuất bắt đầu từ khoảng 20 °C và kết thúc ở khoảng 60 °C dẫn đến làm giảm hàm lượng chlorophyll vì ảnh hưởng của nhiệt dẫn đến sự phân hủy chlorophyll tạo thành pheophytin. Đặc biệt, phương pháp nhờ vào sóng siêu âm đã chứng minh được khả năng tăng cường quá trình chiết xuất nhờ cơ chế tạo ra vi bọt khí và dòng đối lưu mạnh, giúp thành tế bào bị vỡ hiệu quả hơn, từ đó cải thiện đáng kể lượng chlorophyll thu được. So với các phương pháp truyền thống, chiết xuất xanh giúp giảm thiểu lượng dung môi hữu cơ có hại, đồng thời duy trì độ tinh khiết và hoạt tính sinh học của chlorophyll [21].

Thời gian là yếu tố tác động đến mức độ thu hồi hàm lượng chlorophyll trong nghiên cứu này. Dữ liệu ở Hình 3B cho thấy hàm lượng chlorophyll ở giai đoạn đầu có sự khuếch tán mạnh vào dung môi nhưng khi đến mức độ bão hòa thì hàm lượng không còn hiệu quả như ban đầu. Thời gian tăng từ 10 phút đến 15 phút có xu hướng tăng lên, khi thời gian 20 phút thì hàm lượng chlorophyll đạt ở mức cực đại là $0,147 \pm 0,002$ mg/g_{ck}. Thời gian siêu âm kéo dài quá mức, hợp chất chlorophyll bị tác động bởi nhiệt độ hay các phản ứng phụ xảy ra, làm giảm đi hàm lượng chlorophyll thu được. Do đó, cần phải xác định được thời gian siêu âm phù hợp rất cần thiết để đảm bảo được hàm lượng chlorophyll. Rahmawati và cộng sự (2022) đã nghiên cứu thu nhận chlorophyll trong lá ca cao với thời gian trong khoảng 5 phút đến 25 phút [22]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy phù hợp với kết quả của Rahmawati và cộng sự.

3.4. So sánh ba phương pháp chiết xuất chlorophyll

Sự lựa chọn phương pháp chiết xuất ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng chlorophyll thu được từ nguyên liệu. Việc so sánh 3 phương pháp cho thấy hiệu quả trích ly và thu nhận hàm lượng chlorophyll được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Hàm lượng chlorophyll thu được từ ba phương pháp chiết xuất
Trong từng yếu tố khảo sát, các chữ cái khác nhau trên thanh biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$, được xác định thông qua phân tích ANOVA

Kết quả so sánh ở Hình 4 cho thấy hàm lượng chlorophyll thu được từ phương pháp vi sóng $0,181 \pm 0,002$ mg/g_{ck}, cao hơn 2 phương pháp ngâm tĩnh $0,176 \pm 0,001$ mg/g_{ck} và siêu âm $0,147 \pm 0,001$ mg/g_{ck}. Hàm lượng giữa phương pháp ngâm tĩnh và vi sóng gần như là tương đương nhau nhưng một trong các ưu điểm của vi sóng là làm giảm thời gian chiết xuất một cách đáng kể là do hiệu suất gia nhiệt tác động của bức xạ vi sóng làm nhiệt độ tăng nhanh phá vỡ màng tế bào thực vật [18]. Nồng độ dung môi ở 3 thí nghiệm là khác nhau nhưng ở phương pháp vi sóng với nồng độ ethanol được sử dụng là 30% thấp nhất trong ba phương pháp nhưng lại đạt hàm lượng chlorophyll cao nhất điều này cho thấy việc tiết kiệm được lượng dung môi và làm tăng hiệu quả kinh tế. Kết quả này tương tự với nghiên cứu trước đây của Philippe Christen, trong đó phương pháp trích ly có sự hỗ trợ của vi sóng hiệu quả hơn so với một số phương pháp khác [23].

4. KẾT LUẬN

Phương pháp chiết xuất có sự hỗ trợ của vi sóng cho thấy hiệu quả thu nhận hàm lượng chlorophyll từ *C. submersum* cao hơn so với phương pháp chiết xuất có sự hỗ trợ của siêu âm và phương pháp ngâm tĩnh. Phương pháp chiết xuất hỗ trợ vi sóng với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi 1/30 w/v, công suất vi sóng 360 W và thời gian chiết xuất trong 5 phút thu được hàm lượng chlorophyll là $0,181 \pm 0,001$ mg/g_{ck}. Kết quả đạt được ở trên là bước đầu mở ra bước phát triển đầu cho việc thu nhận chlorophyll từ rong *C. submersum* để sử dụng trong thực phẩm và thực phẩm chức năng. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm về hoạt tính, các dạng dẫn xuất làm cho tính chất của chlorophyll ổn định hơn cũng như dạng sản phẩm hướng đến là một số phụ gia ứng dụng vào trong thực phẩm hay chất chống oxy hóa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Wilmot-Dear *et al.*, Flora of tropical east africa-Ceratophyllaceae, CRC Press, 1985.
- [2] T. Muller *et al.*, "Colorless tetrapyrrolic chlorophyll catabolites found in ripening fruit are effective antioxidants", *Angewandte Chemie International Edition in England*, vol. 46, no. 45, pp. 8699-702, 2007, doi: 10.1002/anie.200703587.
- [3] A. M. Humphrey, "Chlorophyll as a color and functional ingredient", *Journal of Food Science*, vol. 69, no. 5, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x.
- [4] A. Tanaka *et al.*, "Chlorophyll degradation and its physiological function", *Plant Cell Physiology*, vol. 66, no. 2, pp. 139-152, Feb. 2025, doi: 10.1093/pcp/pcae093.
- [5] C.-Y. Hsu *et al.*, "The antioxidant and free radical scavenging activities of chlorophylls and pheophytins", *Food and Nutrition Sciences*, vol. 04, no. 08, pp. 1-8, 2013, doi: 10.4236/fns.2013.48A001.
- [6] H. Scheer, "Chlorophylls and carotenoids, chemistry of," in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 2008, pp. 1-11.
- [7] H. T. N. Nhon *et al.*, "Nghiên cứu thu nhận bột màu chlorophyll từ rong nước lợ *Cheatomorpha* sp. Đồng bằng sông Cửu Long", *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, vol. 10, 2016.
- [8] K. A. Attal F.-S. *et al.*, "Evaluation of ultrasound and pulsed electric field assisted extractions on the biological activities of *Chlorella* spp.", *Agrobiologia*, vol. 12, pp. 3138-3151, 2022.

- [9] Rajalakshmi.K *et al.*, "Extraction and estimation of chlorophyll from medicinal plants", *International Journal of Science and Research (IJSR)*, vol. 4, no. 11, pp. 209-212, 2015, doi: 10.21275/NOV151021.
- [10] Y. Tong *et al.*, "Microwave pretreatment-assisted ethanol extraction of chlorophylls from *Spirulina Platensis*", *Journal of Food Process Engineering*, vol. 35, no. 5, pp. 792-799, 2011, doi: 10.1111/j.1745-4530.2010.00629.x.
- [11] W. Kong *et al.*, "Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology", *J Food Sci Technol*, vol. 51, no. 9, pp. 2006-13, Sep. 2014, doi: 10.1007/s13197-012-0706-z.
- [12] R. E. Stauffer *et al.*, "Estimating chlorophyll extraction biases", *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 36, no. 2, pp. 152-157, 1979, doi: 10.1139/f79-024.
- [13] J. S., "Qualitative and quantitative HPLC analysis of SCOR reference algal cultures. Phytoplankton pigments in oceanography", pp. 343-360, 1996.
- [14] M. A. M. Jinasena *et al.*, "Extraction and degradation of chlorophyll a and b from *Alternanthera sessilis*", *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, vol. 44, no. 1, 2016, doi: 10.4038/jnsfsr.v44i1.7977.
- [15] T. Nhut Pham *et al.*, "Anthocyanins extraction from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam): the effect of pH values on natural color", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 542, no. 1, 2019, doi: 10.1088/1757-899x/542/1/012031.
- [16] E. Destandau *et al.*, "Microwave-assisted extraction," in *Natural Product Extraction*, 2022, pp. 144-201.
- [17] J. E. Cacace *et al.*, "Optimization of extraction of anthocyanins from black burrants with aqueous ethanol", *Journal of Food Science*, vol. 68, no. 1, pp. 240-248, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x.
- [18] I. Georgiopoulou *et al.*, "Process optimization of microwave-assisted extraction of chlorophyll, carotenoid and phenolic compounds from *Chlorella vulgaris* and comparison with conventional and supercritical fluid extraction", *Applied Sciences*, vol. 13, no. 4, 2023, doi: 10.3390/app13042740.
- [19] N. H. K. Nguyen *et al.*, "Microwave-assisted extraction of chlorophyll and polyphenol with antioxidant activity from *Pandanus amaryllifolius* Roxb. in Vietnam", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 1166, no. 1, 2021, doi: 10.1088/1757-899x/1166/1/012039.
- [20] L. Paniwnyk *et al.*, "The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*", *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 299-301, Jul. 2001, doi: 10.1016/s1350-4177(00)00075-4.
- [21] S. Hussain *et al.*, "Natural pigments (anthocyanins and chlorophyll) and antioxidants profiling of European red and green gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.) extracted using green techniques (UAE-citric acid-mediated extraction)", *Current Research in Food Science*, vol. 7, pp. 100629, 2023, doi: 10.1016/j.crf.2023.100629.
- [22] I. Rahmawati, "Effect of time variation on chlorophyll concentration in cocoa leaf extraction using the uae (ultrasonic assisted extraction) method", *Jurnal Kartika Kimia*, vol. 5, no. 1, 2022, doi: 10.26874/jkk.v5i1.97.
- [23] B. Kaufmann *et al.*, "Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction", *Phytochemical Analysis*, vol. 13, no. 2, pp. 105-13, Mar. 2002, doi: 10.1002/pca.631.

ABSTRACT

STUDY ON THE EFFECTS OF EXTRACTION METHODS ON CHLOROPHYLL RECOVERY FROM *Ceratophyllum submersum* ALGAE

Le Thi Hong Anh*, Tran Viet Hung, Hoang Thi Ngoc Nhon

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

*Email: anhlth@huit.edu.vn

This study aimed to obtain the total chlorophyll content from *Ceratophyllum submersum* L. using three extraction methods, including maceration (static soaking), microwave-assisted extraction (MAE), and ultrasound-assisted extraction (UAE). The purpose of the study was to evaluate the effectiveness of these three extraction methods in obtaining chlorophyll from *C. submersum*. The chlorophyll content of 0.176 mg/g dry weight was achieved by macerating using 80% ethanol as the solvent at 50 °C for 4 hours. The extraction was done using a microwave that assisted with a 1:30 (w/v) material-to-solvent ratio, 360 W, and a 5-minute extraction time, obtaining a chlorophyll content of 0.181 mg/g dry weight. The UAE method required a power of 262.5 W for 20 minutes, resulting in a chlorophyll content of 0.147 mg/g dry weight. According to the results, MAE was superior to both maceration and UAE in obtaining chlorophyll from *C. submersum*.

Keywords: *Ceratophyllum submersum*, chlorophyll, microwave, static maceration, ultrasound.