

THU NHẬN PROTEIN TỪ VI TẢO *Chlorella vulgaris* BẰNG CÔNG NGHỆ KẾT HỢP ENZYME THỦY PHÂN KẾT HỢP VÀ SIÊU ÂM

Trần Hoàng Quyên¹, Nguyễn Minh Châu^{1, *},
Phạm Linh Khoa¹, Lê Văn Bắc¹, Vũ Đức Mạnh¹,
Bùi Thị Thúy Hà¹, Bùi Thị Hồng Phương¹

¹Viện Công nghiệp Thực phẩm

*Email: minhchau@firi@gmail.com

TÓM TẮT

Với nhiều ưu điểm như: Hiệu quả, thân thiện với môi trường, có khả năng ứng dụng ở quy mô công nghiệp, siêu âm và enzyme là những công nghệ tiềm năng, được chú ý nghiên cứu và ứng dụng trong sản xuất protein từ thực vật, bao gồm từ vi tảo. Mục tiêu của nghiên cứu này là nghiên cứu phối hợp công nghệ siêu âm và enzyme thương phẩm (viscozyme và flavourzyme) trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris*, một trong những nguồn cung cấp protein và peptide chức năng dồi dào cho công nghiệp thực phẩm. Các công đoạn được nghiên cứu và tối ưu hóa gồm: Phá vỡ tế bào bằng siêu âm, hỗ trợ trích ly protein bằng viscozyme và trích ly protein bằng flavourzyme. Điều kiện siêu âm phá vỡ tế bào sau nghiên cứu tối ưu là pH 8, nhiệt độ 50°C, thời gian siêu âm 40 phút và tỷ lệ vi tảo/nước 100 g/L. Phương pháp bề mặt đáp ứng và mô hình I-optimal được áp dụng để tối ưu hóa điều kiện thủy phân, phá vỡ tế bào bằng viscozyme và trích ly protein bằng flavourzyme. Điều kiện tối ưu cho thủy phân phá vỡ tế bào và hỗ trợ trích ly protein bằng viscozyme là: pH 6, nhiệt độ 50°C, thời gian 90 phút và nồng độ enzyme 0,75%. Điều kiện tối ưu cho trích ly protein bằng flavourzyme là: pH 6,8, nhiệt độ 50°C, thời gian 2,5 giờ, tốc độ khuấy 380 vòng/phút và nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 2,8%. Tỷ lệ tế bào bị phá vỡ sau quá trình xử lý bằng siêu âm và viscozyme đạt 73,45%. Hiệu suất trích ly protein từ *Chlorella vulgaris* Việt Nam sử dụng flavourzyme đạt 76%, với mức độ thủy phân DH là 37,53%. Kết quả của nghiên cứu khả thi, có khả năng ứng dụng ở quy mô công nghiệp và làm nguyên liệu sản xuất sản phẩm chức năng từ protein vi tảo *Chlorella vulgaris*.

Từ khóa: *Chlorella*, flavourzyme, phương pháp bề mặt đáp ứng, siêu âm, trích ly protein, viscozyme.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chlorella vulgaris thuộc nhóm tảo lục (Chlorophyta), họ Chlorellaceae, là vi tảo đơn bào có khả năng quang hợp, tốc độ sinh trưởng nhanh và có thể phát triển cả trên môi trường nước ngọt và nước lợ. *Chlorella* chứa khoảng 50 - 60% protein, hơn 10% lipid, chất xơ, carbohydrate và các loại vitamin khác: C, D, E, H; vitamin nhóm B như: Thiamin, riboflavin, niacin, pantothenic axit, pyridoxine, folic axit, cobalamin...; giàu khoáng chất: Mg, K, I, Zn, Se, Fe, Mn, Cu, P, Na, N, Co, Mo, S, Ca...; nhiều hoạt chất sinh học như: Beta carotene, chlorophyll, omega 3, axit béo... Đây là một trong những loại thực phẩm, thực phẩm chức năng tự nhiên giúp bổ sung dinh dưỡng, cải

thiện khả năng đề kháng của cơ thể, tăng cường nguồn hoạt chất sinh học chống oxy hóa, chống viêm, chống u bướu hiệu quả và là nguồn nguyên liệu tiềm năng trong sản xuất các peptide chức năng có hoạt tính sinh học cao, có tiềm năng ứng dụng như: Nguyên liệu sản xuất thức ăn chăn nuôi, thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm phục vụ cho đời sống con người [1, 2].

Theo Mordor Intelligence (2024) [3], thị trường toàn cầu của *Chlorella* giai đoạn năm 2018 - 2029 dự kiến sẽ đạt giá trị 1,92 tỷ USD vào năm 2024, tốc độ tăng trưởng 4,9% năm; ước đạt giá trị 2,45 tỷ USD vào năm 2029, với khu vực phát triển nhanh nhất là châu Á - Thái Bình Dương. Thị trường vi tảo Việt Nam với hai nguyên liệu chủ yếu là Spirulina và *Chlorella* có

giá trị khoảng 52 triệu USD, sản lượng khoảng 10.000 tấn/năm, tốc độ tăng trưởng 11,2% giai đoạn từ năm 2021 – 2027. Các số liệu thống kê này phản ánh nhu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng đối với các sản phẩm từ vi tảo, đặc biệt là *Chlorella*.

Protein từ *Chlorella vulgaris* có tỷ lệ các axit amin thiết yếu cao, cân đối, đặc biệt là isoleucine, leucine, phenylalanine, valine... Theo Becker (2007) [4], đây là nguồn protein thực vật được đánh giá có chất lượng dinh dưỡng và sự cân bằng tốt tương đương hoặc hơn khi so sánh với thành phần axit amin của protein thực phẩm phổ biến như trứng, đậu tương. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh protein chiết xuất từ *Chlorella*, với thành phần nhiều peptide có hoạt tính chức năng có khả năng hỗ trợ giảm huyết áp, cholesterol, cải thiện chức năng miễn dịch, chống oxy hóa, chống viêm... đối với người sử dụng [2, 5]. Với nhiều đặc tính linh hoạt như: Khả năng nhũ hóa, tạo bọt, tạo gel tốt, dễ tiêu hóa, protein từ *Chlorella* có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất, chế biến thực phẩm, mỹ phẩm, đặc biệt là thực phẩm, thực phẩm chức năng.

Thị trường protein từ tảo, trong đó bao gồm protein từ *Chlorella* có giá trị ước đạt 1,35 tỷ USD năm 2033, tốc độ tăng trưởng dự kiến 5,5% [6], chứng minh nhu cầu cao của thị trường cũng như người tiêu dùng đối với nguồn protein thay thế lành mạnh và thân thiện với môi trường này.

Phương pháp kết hợp siêu âm và enzyme thương phẩm đã được chứng minh qua nghiên cứu về hiệu quả trong trích ly protein từ vi tảo. Siêu âm tạo ra các vi bọt khí và sóng xung kích, giúp phá vỡ màng tế bào vi tảo một cách nhanh chóng và hiệu quả, tăng khả năng tiếp cận của enzyme tới các protein bên trong tế bào. Enzyme thương phẩm như cellulase, protease, giúp tăng hiệu quả phá vỡ tế bào và giải phóng protein ra môi trường trích ly. Sự kết hợp giữa công nghệ siêu âm và enzyme không chỉ tối ưu hóa quá trình trích ly protein mà còn giữ nguyên được các đặc tính sinh học của protein, giảm thiểu tổn hại và biến đổi cấu trúc protein, cũng như linh hoạt ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Sự kết hợp này cũng cải thiện hiệu suất trích ly, giảm thời gian và chi phí xử lý, đồng thời duy trì chất lượng và

tính toàn vẹn của protein. Điều này mở ra cơ hội phát triển các sản phẩm protein từ vi tảo với chất lượng cao và giá thành hợp lý, đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường [7 – 9].

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá và tối ưu hóa điều kiện phối hợp siêu âm và enzyme cellulase, protease thương phẩm trong trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris* Việt Nam nhằm cải thiện hiệu suất và chất lượng của protein thu được, tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu và ứng dụng sản xuất các sản phẩm phục vụ con người từ sản phẩm công nghệ này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vi tảo *Chlorella vulgaris* được cung cấp bởi Công ty TNHH Thiên Nhiên Việt. Vi tảo tươi có hàm lượng protein 51%DS, độ ẩm 78%. Nguyên liệu sau khi thu nhận được sấy khô ở 60°C đến độ ẩm 5%, sau đó nghiền nhỏ và sàng qua lưới sàng kích thước 20 - 50 mesh để thu được mẫu có kích thước đồng nhất, hút chân không và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trước khi tiến hành sử dụng.

Enzyme thương mại: Viscozyme L (≥ 100 FBGU/g, pH khuyến nghị từ 3,5 – 5,5, nhiệt độ khuyến nghị từ 40 - 60°C); flavourzyme (1.000 AU/g, pH khuyến nghị từ 6 - 8, nhiệt độ khuyến nghị từ 40 - 60°C) của Novozyme.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Quy trình tiền xử lý vi tảo theo kết quả nghiên cứu nội bộ của Trung tâm Thực nghiệm Sản xuất và Chuyển giao công nghệ, Viện Công nghiệp thực phẩm [10]. Nguyên liệu vi tảo thêm nước (pH = 7, tỷ lệ nguyên liệu/nước 10%), khuấy 30 phút ở 300 vòng/phút. Sau khuấy, hỗn dịch thực hiện hoàn nguyên nước trong 2 giờ rồi cấp đông ở - 4°C trong 12 tiếng, sau đó rã đông 24 giờ. Quy trình cấp đông/rã đông lặp lại 3 chu kỳ, sau đó ly tâm tại điều kiện 4°C, 5.000 vòng/phút/30 phút. *Chlorella vulgaris* tiền xử lý được bảo quản 10°C trước khi sử dụng.

Nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của siêu âm, enzyme thương mại (cellulase, protease) đến hiệu suất trích ly protein từ vi tảo Chlorella vulgaris: Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của siêu âm tới hiệu suất trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris* được tiến hành như sau: 100 g

vi tảo đã tiền xử lý được thêm 900 g nước, khuấy trong 30 phút ở 300 vòng/phút, sau đó siêu âm [11], sử dụng thiết bị siêu âm Gtsonic VGT-1910AT tại điều kiện 40 kHz, 80%, 4°C trong 30 phút. Đối với thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của viscozyme/flavourzyme tới hiệu suất trích ly protein từ *Chlorella vulgaris*, sau khi hoàn nguyên nước, hỗn dịch được điều chỉnh đến pH và nhiệt độ khuyến nghị của enzyme, thêm enzyme với tỷ lệ 1% so với nguyên liệu ban đầu và tiến hành enzyme hóa trên bể ổn nhiệt trong 60 phút. Sau đó, mẫu thí nghiệm được nâng nhiệt lên 85°C trong 10 phút để diệt enzyme. Đối với mẫu thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của phối hợp siêu âm và enzyme, hỗn dịch vi tảo sau siêu âm được enzyme hóa tương tự như trên. Sau thí nghiệm, mẫu được ly tâm tách dịch thủy phân ở 4.000 vòng/phút trong 30 phút, phân tích hàm lượng protein hòa tan tổng số, tỷ lệ tế bào bị phá vỡ và hiệu suất trích ly protein.

Lựa chọn điều kiện siêu âm hỗ trợ trích ly protein từ vi tảo Chlorella vulgaris: Thí nghiệm

Bảng 1. Mã hóa các biến độc lập trong tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng enzyme

Biến độc lập	Mã hóa	Viscozyme			Flavourzyme		
		-1	0	+1	-1	0	+1
pH	A, B	5	6	7	6	7	8
Nồng độ enzyme (%ES)	C, B	0,25	0,5	0,75	1	2	3
Nhiệt độ (°C)	A, C	40	50	60	40	50	60
Thời gian	D	30*	60*	90*	1**	2**	3**
Tốc độ đảo trộn (vòng/phút)	E	0	150	300	200	300	400
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	F	-	-	-	1,5	2,5	3,5

*Ghi chú: *: Phút; **: Giờ.*

2.2.2. Phương pháp phân tích

- Xác định hàm lượng protein hòa tan tổng số: Hàm lượng protein hòa tan tổng số được xác định theo phương pháp của He (2011) [13] có điều chỉnh, sử dụng chỉ thị là Coomassie Brilliant Blue G-250, kết hợp với protein tạo ra sự thay đổi màu sắc từ nâu sang xanh. Sáu dung dịch chuẩn BSA (Bovine serum Albumin - Sigma) bao gồm: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2 mg/mL được chuẩn bị. Thêm 30 µL của mỗi dung dịch chuẩn hoặc mẫu vào ống nghiệm, sau đó thêm 1,5 mL thuốc thử Bradford và trộn đều. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm bằng máy đo quang phổ. Hàm lượng protein được xác định dựa trên

bao gồm: Lựa chọn pH 2 - 12, nhiệt độ 4 - 60°C, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 50 - 300 g/L và thời gian siêu âm 5 - 60 phút trên nguyên liệu vi tảo đã hoàn nguyên. Thông số đánh giá thí nghiệm gồm tỷ lệ tế bào bị phá vỡ theo quy trình của Strober (1997) [12].

Tối ưu hóa điều kiện thủy phân bằng enzyme: Quy trình được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng với mô hình I-optimal. Thí nghiệm với viscozyme được tiến hành trên nguyên liệu sau siêu âm (31 thí nghiệm); thí nghiệm với flavourzyme trên nguyên liệu sau xử lý viscozyme (38 thí nghiệm). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc 2 như sau: $Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$.

Trong đó: Y là hàm mục tiêu, x_i là biến độc lập, β_0 , β_i , β_{ii} . Các biến độc lập được mã hóa theo bảng 1.

đường chuẩn xây dựng từ dung dịch chuẩn BSA ($y = 0,9511x + 0,0195$) $R^2 = 0,9996$).

- Xác định tỷ lệ tế bào bị phá vỡ: Tỷ lệ tế bào bị phá vỡ được xác định theo phương pháp Trypan Blue Exclusion Test của Strober (1997) [12] có điều chỉnh. Mẫu thí nghiệm sau khi xử lý được ly tâm ở 4.000 vòng/phút/30 phút để tách dịch. 1 g tế bào được hòa trong 9 ml phosphate buffer sau đó vortex trong 1 phút. Hỗn dịch tiếp tục được pha loãng với dung dịch đệm với tỷ lệ 1/9. 1 ml dung dịch tế bào pha loãng được thêm vào 1 ml dung dịch trypan blue 0,4%, vortex trong 1 phút, sau đó giữ 3 phút ở nhiệt độ phòng để nhuộm màu. Lấy 1 giọt dung dịch tế bào đã nhuộm màu chuyển vào buồng đếm tế bào

hemacytometer, sau đó soi và đếm dưới kính hiển vi. Tế bào không bị phá vỡ, không bị nhuộm màu và tế bào bị phá vỡ, bị nhuộm xanh. Tỷ lệ phần trăm tế bào bị phá vỡ được tính bằng tỷ lệ phần trăm giữa tổng số tế bào bị phá vỡ trên tổng số tế bào ban đầu.

- Hiệu suất trích ly protein: Hiệu suất trích ly protein được xác định bằng tỷ lệ phần trăm giữa hàm lượng protein trong dịch thí nghiệm/thủy phân và hàm lượng protein trong mẫu ban đầu.

- Xác định mức độ thủy phân (Degree of hydrolysis, DH): Được xác định theo phương pháp OPA (Ortho - Phthalaldehyde Assay) theo quy trình của Sun và cs (2023) [14]. Dung dịch OPA được chuẩn bị bằng cách hòa tan 7,62 g sodium tetraborate decahydrate, 200 mg SDS và 160 mg OPA trong 150 mL nước cất, thêm 4 mL β -mercaptoethanol và bổ sung nước cất đến 200 mL. Các dung dịch chuẩn glycine có nồng độ từ 0,1 – 0,5 mg/mL được chuẩn bị để dựng đường chuẩn. Thêm 400 μ L dung dịch OPA vào 100 μ L mẫu hoặc dung dịch chuẩn, trộn đều và để yên trong 2 phút ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ tại bước sóng 340 nm bằng máy đo quang phổ. Mức độ thủy phân được tính theo công thức:

$$DH(\%) = \left(\frac{h}{h_{tot}} \right) \times 100$$

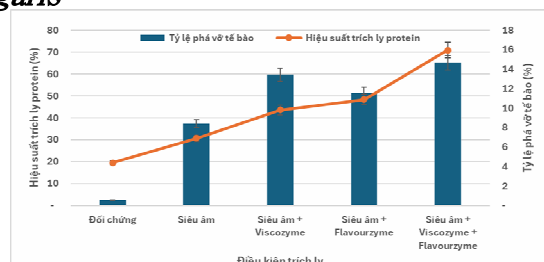
Trong đó: h là lượng nhóm amin tự do trong mẫu; h_{tot} là tổng lượng nhóm amin tự do khi thủy phân hoàn toàn protein, với giá trị cho protein từ *Chlorella vulgaris* là 7,8 meq/g protein.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng phần mềm Excel và Design-expert (version 13).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của siêu âm và enzyme tới hiệu suất trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris*



Hình 1. Ảnh hưởng của siêu âm và enzyme thương phẩm đến hiệu suất trích ly protein từ *Chlorella vulgaris*

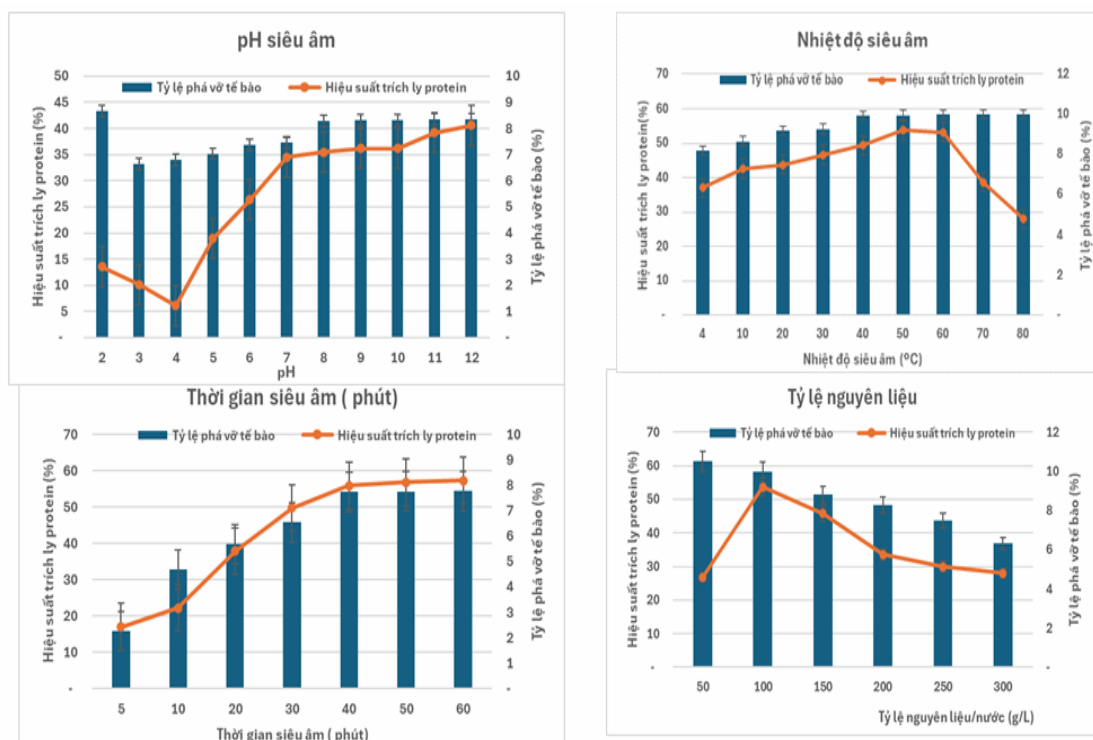
Các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện trích ly gồm sử dụng siêu âm và sử dụng kết hợp siêu âm cùng enzyme cellulase và protease tới hiệu suất thu nhận protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris*. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 1.

Kết quả cho thấy, so với mẫu đối chứng, mẫu thí nghiệm sử dụng siêu âm cải thiện đáng kể các thông số thí nghiệm, chứng minh công nghệ này hiệu quả trong hỗ trợ phá vỡ tế bào vi tảo *Chlorella*, tăng hiệu suất trích ly protein. Khi kết hợp siêu âm với enzyme viscozyme và flavourzyme, hiệu suất trích ly protein và tỷ lệ phá vỡ tế bào tăng đáng kể so với các mẫu còn lại, với kết quả tốt nhất từ mẫu sử dụng cả hai enzyme. Siêu âm phá vỡ cấu trúc tế bào, giải phóng protein, trong khi enzyme xúc tác sinh học phá vỡ liên kết hóa học trong tế bào. Tác động tương hỗ giữa viscozyme và flavourzyme cho hiệu suất trích ly protein cao nhất trong các mẫu thí nghiệm. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Yucetepe (2022) [15]; Zhang và cs (2018) [16]; Gharehbeglou và cs (2024) [17].

3.2. Lựa chọn điều kiện siêu âm hỗ trợ trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris*

Các thí nghiệm lựa chọn điều kiện siêu âm phù hợp sử dụng trong nghiên cứu được tiến hành gồm: Khảo sát lựa chọn pH, nhiệt độ, tỷ lệ nguyên liệu đã hoàn nguyên/nước và thời gian siêu âm. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 2.

Kết quả cho thấy, pH, nhiệt độ và thời gian siêu âm có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất trích ly protein và tỷ lệ phá vỡ tế bào *Chlorella vulgaris*. Hiệu suất trích ly protein tăng tuyến tính khi pH và nhiệt độ tăng, đạt giá trị cao nhất ở pH 12 và 50°C, do các điều kiện này làm cấu trúc thành tế bào dễ bị phá vỡ bởi sóng âm 40 kHz. Tỷ lệ nguyên liệu/nước tối ưu là 100 g/L, cho thấy mức độ phân tán nguyên liệu trong môi trường này phù hợp nhất để tiến hành siêu âm. Tuy nhiên, do protein nhạy cảm với pH kiềm mạnh và nhiệt độ cao, điều kiện siêu âm tối ưu được lựa chọn là pH 8, thời gian siêu âm 40 phút, nhiệt độ 50°C và tỷ lệ nguyên liệu/nước 100 g/L [9, 18, 19].



Hình 2. Ảnh hưởng của điều kiện siêu âm tới hiệu suất trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris*

3.3. Tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa bằng viscozyme hỗ trợ trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris*

Vai trò của cellulase trong nghiên cứu này là tăng cường hiệu quả phá vỡ tế bào *Chlorella* sau khi siêu âm, hỗ trợ quá trình trích ly protein tiếp theo [15, 16]. Các thí nghiệm nội bộ cho thấy, viscozyme là enzyme cellulase thương phẩm phù hợp nhất cho nghiên cứu này. Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) trên mô hình I-optimal được

sử dụng để đánh giá và tối ưu hóa các thông số kỹ thuật của quy trình enzyme hóa bằng viscozyme hỗ trợ trích ly protein từ *Chlorella vulgaris*. Biến độc lập trong thí nghiệm tối ưu hóa gồm: Nồng độ viscozyme, nhiệt độ, pH, tốc độ đảo trộn và thời gian enzyme hóa; hàm mục tiêu gồm: Hiệu suất trích ly protein và tỷ lệ tế bào bị phá vỡ. Kết quả thống kê Anova của mô hình tối ưu được trình bày ở bảng 2.

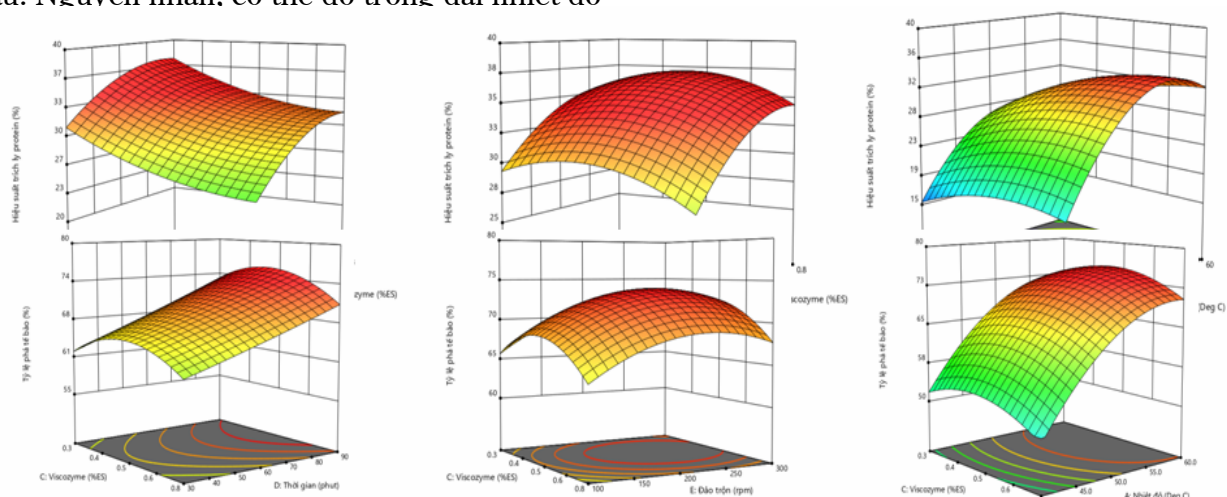
Bảng 2. Kết quả phân tích hồi quy hàm mục tiêu mô hình tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa của viscozyme

Biến độc lập	Hàm mục tiêu					
	Hiệu suất trích ly (%)			Tỷ lệ tế bào bị phá vỡ (%)		
	Giá trị F	Giá trị p	Mức độ ảnh hưởng	Giá trị F	Giá trị p	Mức độ ảnh hưởng
Mô hình	434,31	< 0,0001	30,77	484,40	< 0,0001	66,66
A - Nhiệt độ	3.441,17	< 0,0001	5,56	5.028,49	< 0,0001	9,73
B - pH	0,99	0,34	- 0,09	3,78	0,08	- 0,27
C - Viscozyme	965,11	< 0,0001	2,93	28,33	0,00	- 0,73
D - Thời gian	145,16	< 0,0001	1,14	1.096,22	< 0,0001	4,52
E - Đảo trộn	102,90	< 0,0001	0,95	439,73	< 0,0001	2,85
AB	3,79	0,08	- 0,23	0,01	0,94	- 0,01
AC	110,93	< 0,0001	1,26	1,29	0,28	0,20
AD	36,01	0,00	0,74	74,01	< 0,0001	1,54
AE	61,66	< 0,0001	- 0,90	16,91	0,00	- 0,68
BC	8,37	0,02	0,34	10,22	0,01	0,55
BD	291,37	< 0,0001	2,06	181,60	< 0,0001	2,36

BE	13,85	0,00	- 0,43	3,08	0,11	- 0,29
CD	0,98	0,35	- 0,12	8,18	0,02	- 0,52
CE	3,84	0,08	- 0,23	1,50	0,25	- 0,21
DE	10,41	0,01	0,37	19,69	0,00	- 0,73
A ²	1.346,77	< 0,0001	- 7,11	426,31	< 0,0001	- 5,80
B ²	21,71	0,00	0,84	33,15	0,00	1,50
C ²	123,34	< 0,0001	- 2,00	196,54	< 0,0001	- 3,67
D ²	57,71	< 0,0001	1,28	0,56	0,47	0,18
E ²	156,47	< 0,0001	- 2,16	140,76	< 0,0001	- 2,98
R ²	0,9989			0,999		

Kết quả phân tích phương sai Anova cho thấy, cả hai mô hình hàm mục tiêu đều có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,001$, hệ số xác định R^2 lần lượt là 0,9989 và 0,9990, chứng minh các mô hình phù hợp sử dụng dự đoán hiệu suất trích ly protein và tỷ lệ tế bào bị phá vỡ trong quá trình enzyme hóa bằng viscozyme để hỗ trợ trích ly protein từ *Chlorella vulgaris*. Các biến độc lập gồm: Nhiệt độ, pH, thời gian, tốc độ đảo trộn và nồng độ viscozyme đều có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu. Trong đó, nhiệt độ và thời gian có ảnh hưởng dương, tốc độ đảo trộn có ảnh hưởng âm đối với tỷ lệ tế bào bị phá vỡ; chỉ pH có ảnh hưởng âm đối với hiệu suất trích ly protein. Tương tác giữa nhiệt độ và thời gian; thời gian và nồng độ viscozyme có ý nghĩa thống kê đối với cả 2 hàm mục tiêu, chứng tỏ các biến độc lập này có tương tác phụ thuộc lẫn nhau. Nguyên nhân, có thể do trong dải nhiệt độ

được đánh giá, nhiệt độ từ 50 – 60°C thuộc khoảng tối ưu của viscozyme, thúc đẩy tốc độ enzyme hóa, nâng cao hiệu suất trích ly protein từ vi tảo. pH môi trường enzyme hóa có ảnh hưởng đến trạng thái ion hóa của các nhóm chức năng trên enzyme cũng như khả năng hòa tan của protein từ nguyên liệu, từ đó ảnh hưởng đến hiệu quả thủy phân của viscozyme. Đảo trộn thúc đẩy sự tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất, do đó ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào bị phá vỡ, gián tiếp ảnh hưởng đến hàm lượng protein được giải phóng ra môi trường thủy phân. Các kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu khác về hiệu quả sử dụng cellulase trong phá tế bào và cải thiện hiệu suất trích ly hoạt chất sinh học từ vi tảo [15 - 17]. Biểu đồ biểu thị mối quan hệ giữa các biến độc lập và hàm mục tiêu được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của quan hệ tương tác giữa các biến độc lập đối với các hàm đáp ứng trong ma trận thực nghiệm tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa của viscozyme hỗ trợ trích ly protein từ *Chlorella vulgaris*

Đồ thị biểu thị ảnh hưởng của tương tác giữa các biến độc lập đối với hàm mục tiêu cho thấy, nồng độ viscozyme là tác nhân có ảnh

hưởng lớn nhất đối với sự thay đổi của các hàm này trong khoảng thông số được đánh giá của các biến độc lập. Kết quả này khẳng định vai trò

của viscozyme trong quy trình trích ly protein từ vi tảo *Chlorella*. Hỗ trợ phân giải các polysaccharide thành tế bào, làm yếu và phá vỡ cấu trúc tế bào, giải phóng protein trong nội bào ra môi trường thủy phân.

Hiệu suất trích ly protein (%) = + 30,77 + 5,56A - 0,0947B + 2,93C + 1,14D + 0,9514E - 0,2345AB + 1,26AC + 0,7425AD - 0,9004AE + 0,3448BC + 2,06BD - 0,4252BE - 0,1249CD - 0,2315CE + 0,3677DE - 7,11A² + 0,8388B² - 2,00C² + 1,28D² - 2,16E²

Tỷ lệ tế bào bị phá vỡ (%) = + 66,66 + 9,73A - 0,2685B - 0,7263C + 4,52D + 2,85E - 0,0130AB + 0,1968AC + 1,54AD - 0,6834AE + 0,5522BC + 2,36BD - 0,2906BE - 0,5222CD - 0,2097CE - 0,7328DE - 5,80A² + 1,50B² - 3,67C² + 0,1823D² - 2,98E²

Bảng 3. Kết quả thực nghiệm điều kiện enzyme hóa bởi viscozyme tại các điều kiện tối ưu

Điều kiện thí nghiệm	Nhiệt độ (°C)	pH	Nồng độ enzyme (%ES)	Thời gian (phút)	Tốc độ đảo trộn (vòng/phút)	Hiệu suất trích ly protein (%)	Tỷ lệ tế bào bị phá vỡ (%)
Mô hình	55,411	6	0,727	90	256,866	38,421	79,177
Thực nghiệm	55	6,00	0,75	90,00	250	37,72 ± 0,07	76,53 ± 0,36

Các điều kiện tối ưu mô hình đề xuất được điều chỉnh và thực nghiệm ở quy mô 1 kg nguyên liệu/mẻ/3 mẻ. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, các hàm mục tiêu có kết quả tương đương với kết quả mô hình dự đoán, chứng minh mô hình dự đoán này có độ tin cậy cao. Sự khác biệt số liệu thực nghiệm và kết quả dự đoán do sự biến động của các biến độc lập trong quá trình thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu này khả thi và có khả năng áp dụng trong các quy mô thực nghiệm lớn hơn.

3.4. Tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa bằng flavourzyme trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris*

Mục tiêu của thí nghiệm là tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa bằng protease thương phẩm

Phương trình biểu thị tương quan giữa các biến độc lập và hàm mục tiêu hiệu suất trích ly protein và tỷ lệ tế bào bị phá vỡ như sau:

trích ly protein từ *Chlorella vulgaris* trên nguyên liệu vi tảo, đã tiến hành tiền xử lý bằng siêu âm và viscozyme tại các điều kiện công nghệ tối ưu. Thí nghiệm nội bộ lựa chọn loại enzyme thương phẩm đã xác định được flavourzyme là enzyme protease phù hợp cho nghiên cứu này. (NH₄)₂SO₄ được lựa chọn bổ sung vào môi trường enzyme hóa nhằm thúc đẩy quá trình salting-in, tăng hiệu quả trích ly protein từ *Chlorella* trong quá trình thủy phân [20, 21]. Thí nghiệm tối ưu hóa sử dụng mô hình I-optimal với 5 biến độc lập gồm: pH (A), nồng độ enzyme flavourzyme (B); nhiệt độ (C), thời gian (D), tốc độ đảo trộn (E) và nồng độ muối vô cơ (F). Các hàm mục tiêu gồm: Mức độ thủy phân DH (%) và hiệu suất trích ly protein (%). Kết quả thống kê Anova của mô hình tối ưu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích hồi quy hàm mục tiêu mô hình tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa của flavourzyme

Biến độc lập	Hàm mục tiêu					
	Hiệu suất trích ly protein (%)			Mức độ thủy phân (%)		
Yếu tố ảnh hưởng	Giá trị F	Giá trị p	Mức độ ảnh hưởng	Giá trị F	Giá trị p	Mức độ ảnh hưởng
Mô hình	711,89	< 0,0001	74,74	132,48	< 0,0001	37,53
A: pH	248,42	< 0,0001	- 1,18	84,04	< 0,0001	- 0,82
B: Flavourzyme	1.867,25	< 0,0001	3,24	176,43	< 0,0001	1,19
C: Nhiệt độ	87,59	< 0,0001	0,68	60,31	< 0,0001	0,68
D: Thời gian	7.373,10	< 0,0001	6,37	1.353,69	< 0,0001	3,27
E: Tốc độ đảo trộn	1.003,50	< 0,0001	2,46	181,83	< 0,0001	1,25
F: (NH ₄) ₂ SO ₄	628,33	< 0,0001	1,86	114,36	< 0,0001	0,95

AB	17,83	0,00	0,43	3,84	0,08	0,24
AC	7,30	0,02	- 0,25	0,00	0,97	0,00
AD	2,47	0,15	- 0,14	4,95	0,05	0,24
AE	16,98	0,00	0,40	2,07	0,18	0,17
AF	0,01	0,92	- 0,01	6,81	0,03	0,29
BC	20,98	0,00	0,47	0,04	0,85	0,02
BD	1,36	0,27	- 0,12	20,75	0,00	0,55
BE	133,91	< 0,0001	- 1,13	0,56	0,47	- 0,09
BF	0,02	0,89	0,02	0,43	0,53	0,08
CD	16,86	0,00	- 0,38	2,55	0,14	0,18
CE	3,84	0,08	0,18	17,05	0,00	0,46
CF	116,94	< 0,0001	- 1,03	0,09	0,77	- 0,03
DE	7,68	0,02	0,26	8,04	0,02	0,32
DF	2,82	0,12	- 0,15	4,98	0,05	- 0,24
EF	12,68	0,01	0,35	2,32	0,16	0,18
A ²	287,85	< 0,0001	- 2,53	55,02	< 0,0001	- 1,32
B ²	355,45	< 0,0001	- 2,49	20,99	0,00	- 0,72
C ²	1.516,94	< 0,0001	- 5,71	260,54	< 0,0001	- 2,83
D ²	1.183,55	< 0,0001	- 4,89	175,57	< 0,0001	- 2,25
E ²	92,29	< 0,0001	- 1,33	34,71	0,00	- 0,97
F ²	218,33	< 0,0001	- 2,27	224,81	< 0,0001	- 2,76
R ²	0,9995			R ²	0,9972	

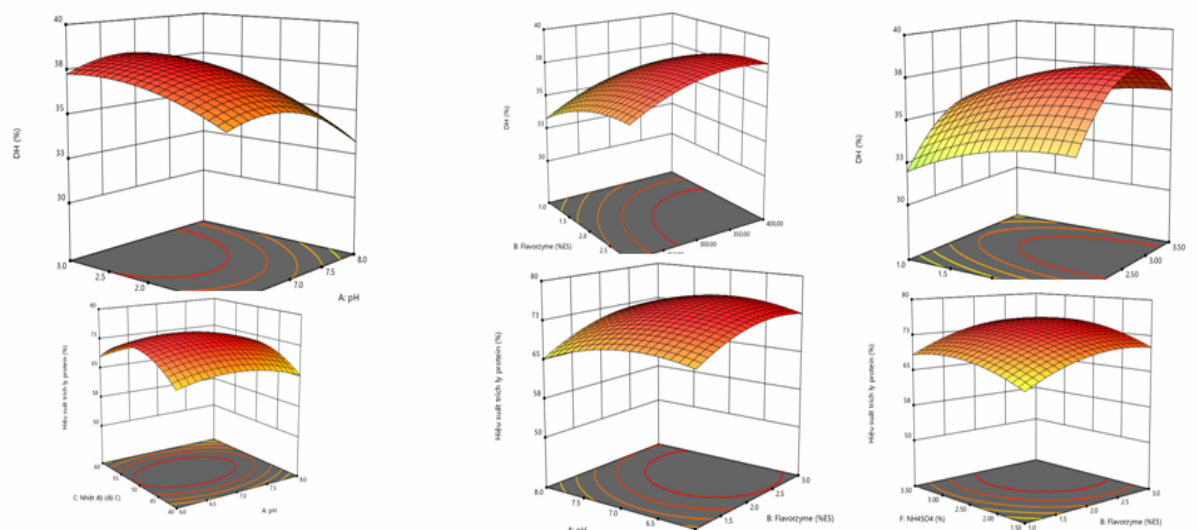
Mô hình của hàm mục tiêu gồm: Hiệu suất trích ly protein và mức độ thủy phân đều có giá trị $p < 0,0001$, với R^2 lần lượt là 0,9995 và 0,9972, chứng tỏ các mô hình có ý nghĩa thống kê và phù hợp với dữ liệu, giải thích được trên 99% sự biến thiên của hàm mục tiêu. Các biến độc lập gồm: pH, nồng độ flavourzyme, nhiệt độ, thời gian, tốc độ quay và nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đều có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất trích ly protein và mức độ thủy phân. Thời gian, nồng độ flavourzyme và tốc độ đảo trộn có ảnh hưởng dương đối với cả 2 hàm mục tiêu. Nguyên nhân, do hoạt tính của enzyme flavourzyme, độ hòa tan của protein từ nguyên liệu chịu ảnh hưởng của các yếu tố ảnh hưởng được đánh giá. Đảo trộn

giúp tăng cường tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất, thúc đẩy tốc độ phản ứng thủy phân giải phóng protein ra môi trường trích ly, tạo ra sự tăng tuyến tính các thông số thí nghiệm. Muối vô cơ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ giúp làm tăng lực ion, làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử protein, từ đó làm tăng độ hòa tan của protein. Tuy nhiên, khi nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ quá cao, lực ion mạnh có thể dẫn đến kết tủa protein, làm giảm hiệu suất trích ly. Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu khác về tác động của các yếu tố pH, nồng độ enzyme, nhiệt độ và muối đến quá trình thủy phân protein [15, 16, 22, 23]. Phương trình dự đoán cho hiệu suất trích ly protein và mức độ thủy phân như sau:

Hiệu suất trích ly protein (%) = + 74,74 - 1,18A + 3,24B + 0,6817C + 6,37D + 2,46E + 1,86F + 0,4337AB - 0,2488AC - 0,1429AD + 0,3950AE - 0,0098AF + 0,4669BC - 0,1169BD - 1,13BE + 0,0151BF - 0,3832CD + 0,1835CE - 1,03CF + 0,2635DE - 0,1505DF + 0,3486EF - 2,53A² - 2,49B² - 5,71C² - 4,89D² - 1,33E² - 2,27F².

Mức độ thủy phân DH (%) = + 37,53 - 8193A + 1,19B + 0,6769C + 3,27D + 1,25E + 0,9470F + 0,2408AB + 0,0046AC + 0,2421AD + 0,1651AE + 0,2854AF + 0,0230BC + 0,5462BD - 0,0872BE + 0,0802BF + 0,1784CD + 0,4627CE - 0,0338CF + 0,3226DE - 0,2395DF + 0,1783EF - 1,32A² - 0,7235B² - 2,83C² - 2,25D² - 0,9736E² - 2,76F²

Biểu đồ biểu thị mối quan hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng và hàm đáp ứng được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của quan hệ tương tác giữa các biến độc lập đối với các hàm đáp ứng trong ma trận thực nghiệm tối ưu hóa điều kiện enzyme hóa của flavourzyme sử dụng trích ly protein từ *Chlorella vulgaris*

Từ các thông số kỹ thuật của quá trình enzyme hóa bởi flavourzyme được mô hình đề xuất, thực nghiệm trên mô hình 1 kg nguyên liệu/mẻ được tiến hành 3 mẻ để đánh giá sự phù hợp của mô hình và các điều kiện tối ưu hóa. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, các hàm mục tiêu: Hiệu suất trích ly protein và mức độ thủy phân DH có giá trị tương đương với kết quả mà mô hình dự đoán, chứng minh mô hình phù hợp và có thể nghiên cứu hoàn thiện trong các quy mô sản xuất và nghiên cứu lớn hơn.

Bảng 5. Kết quả thực nghiệm điều kiện enzyme hóa bởi flavourzyme tại các điều kiện tối ưu

Điều kiện thí nghiệm	Nhiệt độ (°C)	pH	Nồng độ enzyme (%ES)	Thời gian (giờ)	Tốc độ đảo trộn (vòng/phút)	Nồng độ (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Hiệu suất trích ly protein (%)	Mức độ thủy phân (%)
Mô hình	50,832	6,861	2,542	2,698	378,522	2,816	79,035	39,96
Thực nghiệm	50	6,86	2,5	2,7	380	2,8	76,96 ± 0,81	39,42 ± 0,09

4. KẾT LUẬN

Đã tiến hành khảo sát và tối ưu điều kiện trích ly protein từ vi tảo *Chlorella vulgaris* Việt Nam gồm 3 giai đoạn chính: Phá tế bào bằng siêu âm kết hợp thủy phân bằng viscozyme và trích ly protein bằng flavourzyme. Các giai đoạn này đã được tối ưu hóa để đạt được hiệu suất trích ly protein cao nhất trong điều kiện thí nghiệm được đánh giá. Công nghệ siêu âm đã chứng minh là một phương pháp hiệu quả trong việc hỗ trợ phá vỡ tế bào vi tảo và tăng hiệu suất trích ly protein. Điều kiện tối ưu cho giai đoạn này là: pH 8, nhiệt độ 50°C, thời gian 40 phút và tỷ lệ nguyên liệu/nước 100 g/L. Sử dụng enzyme viscozyme sau khi siêu âm giúp tăng cường hiệu quả phá vỡ tế bào và hỗ trợ quá trình

trích ly protein. Điều kiện tối ưu bao gồm: pH 6, nhiệt độ 50°C, thời gian 90 phút và nồng độ enzyme 0,75%. Sau khi phá tế bào bằng viscozyme, enzyme flavourzyme được sử dụng để trích ly protein. Điều kiện tối ưu cho giai đoạn này là: pH 6,86, nhiệt độ 50°C, thời gian 2,5 giờ, tốc độ đảo trộn 380 vòng/phút và nồng độ (NH₄)₂SO₄ 2,8%. Việc sử dụng muối vô cơ (NH₄)₂SO₄ giúp tăng lực ion, làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử protein, từ đó tăng độ hòa tan của protein, cải thiện hiệu suất trích ly protein từ nguyên liệu ban đầu. Các kết quả thực nghiệm cho thấy, sự tương đồng đáng kể với các dự đoán của mô hình, chứng minh tính khả thi của các thông số được sử dụng trong điều kiện thí nghiệm và khả năng áp dụng các điều kiện

này trong các quy mô lớn hơn. Các sản phẩm protein từ quy trình này có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm cũng như nguyên liệu tiềm năng để sản xuất các sản phẩm có tính chức năng từ protein *Chlorella*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ejike CE, Collins SA, Balasuriya N, Swanson A. K., Mason B., Udenigwe C. C. (2017). Prospects of microalgae proteins in producing peptide - based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends in Food Science & Technology*, 59: 30 - 36.
2. Samarakoon K., Jeon Y. J. (2012). Bio - functionalities of proteins derived from marine algae - A review. *Food Research International*, 48(2): 948 - 960.
3. Mordor Intelligence (2024). Global algae products market report (2024 - 2029). Mordor Intelligence JSC.
4. Becker E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2): 207 - 210.
5. Widyaningrum D., Prianto A. D. (2021). *Published chlorella as a source of functional food ingredients: Short review*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: IOP Publishing.
6. Futuremarketinsights (2024). Algae protein market future market insights Inc.
7. Gunda H., Mahesha P. M., Colm O. D., Marianne L. M., Marco G. V., Brijesh T. K. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, 32: 1709 - 1718.
8. Jadhav H. B., Das M., Das A., Geetha V., Choudhary P., Annapure U., Alaskar K. (2024). Enhancing the functionality of plant - based proteins with the application of ultrasound - a review. *Measurement: Food*, 100139.
9. Justino HdFM, dos Santos IF, de Souza RCN, Sanches EA, Bezerra JdA, Lamarão CV *et al.* (2024). Exploring ultrasound - assisted technique for enhancing techno - functional properties of plant proteins: a comprehensive review. *International Journal of Food Science & Technology*, 59(1): 498 - 511.
10. Trần Hoàng Quyên, Nguyễn Minh Châu, Phạm Linh Khoa (2024). Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm giàu peptide chức năng từ một số loại microalgae Việt Nam ứng dụng trong sản xuất thực phẩm dành cho người ăn chay. *Để tài nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ cấp Bộ Công thương*, 2022 - 2024.
11. Quesada-Salas M C, Delfau-Bonnet G, Willig G, Pr  at N, Allais F, Ioannou I (2021). Optimization and comparison of three cell disruption processes on lipid extraction from microalgae. *Processes*, 9(2): 369.
12. Strober W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 21(1): A. 3B. 1-A. 3B. 2.
13. He F. (2011). Bradford protein assay. *Bio-protocol*, e45-e.
14. Sun Y., Cui Y., Wang R., Ma J., Sun H., Cheng L., Yang R. (2023). The hydrolysis of pigment - protein phycoerythrin by bromelain enhances the color stability. *Foods*, 12(13): 2574.
15. Yucetepe A. (2022). A combination of osmotic shock and ultrasound pre - treatments and the use of enzyme for extraction of proteins from *Chlorella vulgaris* microalgae: Optimization of extraction conditions by RSM. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(2): 1516 - 1527.
16. Zhang R., Chen J., Zhang X. (2018). Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. *Bioresource technology*, 247: 267 - 272.
17. Gharehbaglou P., Sarabandi K., Akbarbaglu Z. (2024). Insights into enzymatic hydrolysis: Exploring effects on antioxidant and functional properties of bioactive peptides from *Chlorella* proteins. *Journal of Agriculture and Food Research*, 16: 101129.
18. Chia S R, Chew K W, Zaid H F M, Chu D-T, Tao Y, Show P L. (2019). Microalgal protein extraction from *Chlorella vulgaris* FSP-E using triphasic partitioning technique with sonication.

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7: 396 - 409.

19. Lian H, Wen C, Zhang J, Feng Y, Duan Y, Zhou J *et al.* (2021). Effects of simultaneous dual-frequency divergent ultrasound-assisted extraction on the structure, thermal and antioxidant properties of protein from *Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Research*, 56: 102294.

20. Gerzhova A, Mondor M, Benali M, Aider M (2016). Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food chemistry*, 201: 243 - 252.

21. Jiang Y, Zhu Y, Zheng Y, Liu Z, Zhong Y, Deng Y, Zhao Y (2021). Effects of salting-in/out-

assisted extractions on structural, physicochemical and functional properties of tenebrio molitor larvae protein isolates. *Food chemistry*, 338: 128158.

22. Ursu A-V, Marcati A, Sayd T, Sante-Lhoutellier V, Djelveh G, Michaud P (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 157: 134 - 139.

23. Zheng H, Yin J, Gao Z, Huang H, Ji X, Dou C (2011). Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel - producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis and microwaves. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164: 1215 - 1224.

STUDYING FOR PROTEIN EXTRACTION FROM *Chlorella vulgaris* USING ENZYME - COMBINED ULTRASOUND TECHNIQUES

Tran Hoang Quyen¹, Nguyen Minh Chau¹, Pham Linh Khoa¹,
Le Van Bac¹, Vu Duc Manh¹, Bui Thi Thuy Ha¹, Bui Thi Hong Phuong¹
¹*Food Industries Research Institute*

Abstract

This study investigates using ultrasound technology and commercial enzymes for protein extraction from Vietnam *Chlorella vulgaris*. The research aims to optimize the combined ultrasound and enzymatic conditions to improve the efficiency and quality of protein extraction. The study was conducted in three main stages: Ultrasound-assisted cell disruption followed by hydrolysis with viscozyme and finally, protein extraction with flavourzyme. The study demonstrates the effectiveness of ultrasound technology in breaking down algal cells and increasing protein extraction yield. The optimal conditions for this stage were identified as pH 8, 50°C temperature, 40 minutes ultrasound time and a 100 g/L ratio of algae to water. The enzyme viscozyme was selected as the appropriate cellulase to enhance the disruption of the cells after ultrasound treatment. The optimal conditions for viscozyme were identified as pH 6, 50°C temperature, 90 minutes enzyme treatment time and 0.75% enzyme concentration. After the cell disruption with viscozyme, flavourzyme was used to extract protein, with the optimal conditions being identified as pH 6.8, 50°C temperature, 2.5 hours treatment time, 380 rpm stirring speed and 2.8% (NH₄)₂SO₄ concentration. The use of inorganic salt (NH₄)₂SO₄ helps to increase the ionic strength, reduce the electrostatic repulsion between protein molecules and thus increase the solubility of protein, improving the extraction yield. The experimental results demonstrate remarkable consistency with the model predictions, highlighting the feasibility of the utilized parameters in the experimental conditions and their applicability in larger-scale settings. The research offers promising results for the production of high-quality protein products from *Chlorella vulgaris*.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, flavourzyme, protein extraction, response surface methodology, ultrasound, viscozyme.

Ngày nhận bài: 28/8/2024

Ngày chuyển phản biện: 5/9/2024

Ngày thông qua phản biện: 24/9/2024

Ngày duyệt đăng: 20/02/2025