

# NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN THÍCH HỢP CHO TÁCH CHIẾT HỖN HỢP AXÍT BÉO KHÔNG NO (OMEGA-3,6,7,9) TỪ SINH KHỐI KHÔ VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP

Trần Thị Thu Quỳnh<sup>1,2</sup>, Trần Thu Hà<sup>1</sup>, Đỗ Thị Tuyên<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Thu Huyền<sup>3</sup>,  
Lại Thị Ngọc Hà<sup>4</sup>, Đinh Thị Thu Hằng<sup>2</sup>, Đặng Diễm Hồng<sup>1</sup>, Hoàng Thị Yên<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup> Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên

<sup>4</sup> Học viện Nông nghiệp Việt Nam

## TÓM TẮT

Hiện nay, do thiếu hụt các nguồn nguyên liệu chứa dầu đã gây khó khăn trong việc sản xuất thực phẩm chức năng giàu axit béo không no (omega-3,6,7,9). Do vậy, việc tách chiết axit béo này từ vi sinh vật là hướng đi có nhiều triển vọng trong thời gian tới. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu điều kiện nâng cao hiệu suất tách chiết hỗn hợp các axit béo không no (omega-3,6,7,9) từ sinh khối khô vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) bằng phương pháp chuyển vị ester trực tiếp. Hỗn hợp 2 chủng VKTQH *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 nuôi cấy trong bể 1m<sup>3</sup> được sử dụng cho quá trình tách chiết, có khối lượng khô và hàm lượng lipid tổng số đạt  $2,42 \pm 0,29$  g/L và  $20,342 \pm 1,247\%$  sinh khối khô. Sinh khối khô được methyl hóa trong hỗn hợp dung môi gồm 100 mL dung dịch 10% chất xúc tác được pha trong methanol và 50 mL dichloromethane. Điều kiện tối ưu cho phản ứng gồm chất xúc tác HCl; tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:10 (w/v); khuấy liên tục trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 70-75°C. Hiệu suất tách chiết axit béo tổng số ở quy mô 100 g/mé đạt 19,7% sinh khối khô. Tổng hàm lượng omega-3,6,7,9 chiếm 53,41% so với axit béo tổng số, trong đó, hàm lượng omega-3, omega-6, omega-7 và omega-9 đạt 13,85%; 4,17%; 17,98% và 17,41% so với axit béo tổng số. Hỗn hợp axit béo thu được là nguồn nguyên liệu tốt cho sản xuất dầu sinh học giàu axit béo không no omega-3, 6, 7, 9.

*Từ khóa:* Axit béo, omega, tách chiết, sinh khối, vi khuẩn tía quang hợp.

## MỞ ĐẦU

Dầu sinh học giàu axit béo không no (dạng omega-3,6,7,9) đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong việc giảm các bệnh về tim mạch, bệnh tiểu đường, xương khớp, chống lão hoá (Robert, 2006). Nguồn cung cấp dầu sinh học chủ yếu là từ động vật (cá biển) và các loại thực vật chứa dầu (Gunstone, 1996). Ngoài ra, còn có nấm và tảo mà đặc biệt là loài vi tảo biển dị dưỡng thuộc chi *Schizochytrium* đang là đối tượng được quan tâm cho việc sản xuất thương mại DHA và EPA (Lewis *et al.*, 1999). Tuy nhiên, thành phần axit béo của các đối tượng nêu trên đều là các axit béo không no dạng omega-3,6,9 mà chứa ít dạng omega-7. Nguồn cung cấp omega-7 rất hiếm trong cả giới thực vật và động vật. Chúng được chiết xuất chủ yếu từ cây hắc mai biển và dầu macadamia (Maria, Ruth, 2017). Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của một số nhà khoa học trên thế giới, VKTQH có khả năng tổng hợp các axit béo không no dạng omega-3,6,9 và đặc biệt là omega-7 (axit vaccenic - C18:1(n-7)) với hàm lượng rất cao (chiếm 65 - 82% so với axit béo tổng số (total fatty acid - TFA)) (Harley, Prescott, 2007).

Hiện nay, do thiếu hụt các nguồn nguyên liệu chứa dầu đã gây khó khăn trong việc sản xuất thực phẩm chức năng giàu axit béo không no. Việc tách chiết axit béo không no (dạng omega-3,6,7,9) từ vi sinh vật (vi tảo, VKTQH) là hướng đi có nhiều triển vọng trong thời gian tới. Sử dụng vi sinh vật để tách chiết dầu sinh học có một số ưu thế vượt trội so với các nguồn nguyên liệu chứa dầu khác đó là chúng có tốc độ sinh trưởng cao, hàm lượng lipid có thể được điều chỉnh thông qua việc thay đổi điều kiện nuôi cấy (Kim *et al.*, 2013), có thể thu sinh khối quanh năm mà không phụ thuộc vào mùa vụ như các thực vật chứa dầu khác, không cạnh tranh với quỹ đất nông nghiệp do chúng có thể được nuôi trồng bằng nước mặn, ngọt, lợ hoặc nước thải (Imhoff *et al.*, 2005).

Dầu thực vật có thể được tách chiết bằng nhiều phương pháp khác nhau như ép, Soxhlet, sử dụng CO<sub>2</sub> siêu tới hạn hoặc dung môi hoá học. Trong đó, sử dụng phương pháp tách chiết bằng dung môi hoá học và đặc biệt là sử dụng hỗn hợp các dung môi cho hiệu quả tách chiết cao hơn do trong thành phần axit béo chứa nhiều các chất phân cực và không phân cực (Nguyễn Trung Thành *et al.*, 2015). Tuy nhiên, các phương pháp này lại khá tốn kém và thải ra môi trường một lượng dung môi khá lớn gây ô nhiễm môi trường. Phương pháp chuyển vị ester trực tiếp (methyl hóa trực tiếp axit béo và chất xúc tác được bổ sung cùng một lúc) từ sinh khối vi tảo là phương pháp đơn giản, tiết kiệm thời gian, cho hiệu suất tách chiết cao do đó dẫn đến giá thành sản phẩm giảm hơn so

với phương pháp chuyển hóa hai giai đoạn (đầu sau khi tách chiết được cho phản ứng với methanol có mặt chất xúc tác). Bằng phương pháp này, trên đối tượng là vi tảo, các nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và Hoàng Thị Lan Anh (2016), Johnson và Wen (2009) cho kết quả hiệu suất tách chiết TFA cao đạt 46,7% và 42,05%, tương ứng so với sinh khối tảo. Lipid và thành phần axit béo của VKTQH cũng tương tự như vi tảo. Do vậy, trong bài báo này chúng tôi đã bước đầu nghiên cứu tối ưu các thông số của quá trình tách chiết TFA thu được hiệu suất cao nhất sử dụng phương pháp chuyển vị ester trực tiếp từ sinh khối cho đối tượng mới là VKTQH và tiến hành kiểm tra chất lượng mẫu dầu tách chiết được thông qua thành phần và hàm lượng axit béo.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu và hóa chất

Sinh khối của hỗn hợp hai chủng VKTQH *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 phân lập tại Hải Phòng và Vũng Tàu năm 2018 được sản xuất trong bể kính thể tích 1m<sup>3</sup> sử dụng môi trường bán tổng hợp (BTH) gồm bột đậu tương 0,68 g/L; cao nấm men 0,75 g/L, Mg<sup>2+</sup> 5,5 mg/L. Sau 192 giờ (8 ngày) nuôi cấy, sinh khối VKTQH được thu bằng chitosan nồng độ 150 mg/L pha trong axit acetic 0,4%. Sinh khối tươi VKTQH được sấy khô ở 70°C đến khối lượng không đổi sau đó xay nhỏ thành dạng bột mịn và được lưu trữ ở -20°C sử dụng cho tách chiết axit béo.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm hóa chất vô cơ như NaCl, NaOH, KOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl và các loại dung môi như n-hexane, methanol, dichloromethane (Merck- Đức).

### Tách chiết axit béo tổng số

Axit béo tổng số được tách theo phương pháp chuyển vị ester trực tiếp từ sinh khối để tạo ra hỗn hợp các axit béo ở dạng methyl ester (Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Lan Anh, 2016; Johnson, Wen, 2009): 10 g sinh khối khô VKTQH được methyl hóa với 100 mL dung dịch 10% chất xúc tác HCl được pha trong methanol và 50 mL dichloromethane. Phản ứng được thực hiện trên máy khuấy từ gia nhiệt ở 60°C, thời gian 3 giờ, khuấy liên tục. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được làm nguội đến nhiệt độ phòng và lọc loại bỏ bã sinh khối. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung thêm 20 mL dung dịch NaCl bão hòa và 100 mL n-hexane, lắc đều hỗn hợp, để phân lớp trên phễu chiết và tách lấy lớp n-hexane phía trên có chứa TFA. Loại bỏ n-hexane bằng máy cất quay chân không và thu hồi sản phẩm là các axit béo dạng methyl ester.

Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của chất xúc tác khác nhau như HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KOH, NaOH; nhiệt độ, thời gian phản ứng, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, điều kiện khuấy trộn lên hiệu suất tách TFA từ sinh khối VKTQH. Phản ứng được khảo sát ở nhiệt độ từ 60°C đến 85°C; thời gian phản ứng thay đổi từ 2h đến 4h; tỷ lệ sinh khối:dung môi từ 1:6 (w/v) đến 1:12 (w/v); điều kiện khuấy trộn được khảo sát là không khuấy trộn, khuấy trộn liên tục và gián đoạn lên hiệu suất tách TFA từ sinh khối VKTQH.

Hiệu suất của quá trình tách TFA được tính theo công thức sau:  $H (\%) = [(m_1 \times 100)/m_2] (\%)$ . Trong đó, H (%) là hiệu suất của quá trình tách TFA; m<sub>1</sub> là khối lượng TFA thu được sau khi chuyển hóa; m<sub>2</sub> là khối lượng sinh khối ban đầu.

### Xác định thành phần và hàm lượng axit béo theo phương pháp ISO/FDIS 5509:1998

Thành phần và hàm lượng axit béo xác định theo phương pháp ISO/FDIS 5509:1998, tại Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam. Trong thực nghiệm 10 mg dầu béo được hòa tan với 1 mL petroleum benzin trong lọ có nút kín, bổ sung 25 µL dung dịch sodium methanolate trong methanol (2 mol/L) và lắc kĩ trong 1 phút. Thêm vào 20 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lắc kĩ và đem li tâm ở chế độ 5.000 rpm trong 1 phút. Dịch trong ở pha trên được tách riêng và đem phân tích trên máy sắc kí khí HEWLETT PACKARD 5890 Series II theo chế độ: Capillary column CP - Sil 88, 100m/ 0,25ID/ 0,2µm, chương trình nhiệt độ: 155°C-220°C (1,5°C/phút), Injector 250°C, detector 250°C, khí mang H<sub>2</sub>.

### Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả biểu diễn ở dạng TB ± SD. Phần mềm SAS 9.1 được dùng để phân tích số liệu. Vẽ đồ thị được thực hiện bằng phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2010. So sánh trung bình giữa nghiệm thức dựa vào phương pháp ANOVA ở mức ý nghĩa α = 0,05.

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### Hàm lượng sinh khối khô, lipid và thành phần axit béo (omega-3,6,7,9) của hỗn hợp 2 chủng VKTQH nuôi trong bể kính thể tích 1m<sup>3</sup>

Bể kính thể tích 1m<sup>3</sup> (sử dụng môi trường BTH) đã được lựa chọn để sản xuất sinh khối VKTQH làm nguyên liệu tách chiết dầu sinh học giàu axit béo không no (omega-3,6,7,9). Kết quả thu được cho thấy sinh khối có hàm lượng sinh khối khô và lipid đạt 2,42 ± 0,29 g/L và 20,342 ± 1,247% khối lượng khô (KLK) tương ứng. Các axit

béo không no (1 - 2 nối đôi) chiếm 56,28% so với TFA. Trong đó, hàm lượng omega-3, omega-6, omega-7 và omega-9 đạt 8,48%; 4,10%, 18,32% và 25,38% tương ứng (Bảng 1). Như vậy, sinh khối hỗn hợp 2 chủng VKTQH có thành phần và hàm lượng axit béo phù hợp, đảm bảo về chất lượng sử dụng làm nguyên liệu cho tách chiết dầu sinh học giàu axit béo.

**Bảng 1. Hàm lượng sinh khối khô, lipid và omega-3,6,7,9 của VKTQH khi nuôi trong bể kính thể tích 1m<sup>3</sup>**

Các thông số	Hàm lượng
Sinh khối khô (g/L)	2,42 ± 0,29
Lipid (% KLK)	20,342 ± 1,247
Omega-3 (% so với TFA)	8,48
Omega-6 (% so với TFA)	4,10
Omega-7 (% so với TFA)	18,32
Omega-9 (% so với TFA)	25,38
Tổng omega-3,6,7,9 (% so với TFA)	56,28

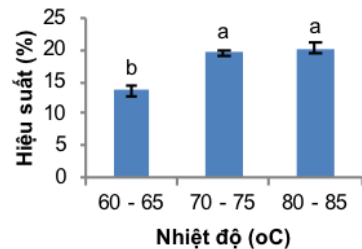
**Ảnh hưởng của các tác nhân khác nhau lên hiệu suất tách chiết TFA từ sinh khối khô VKTQH**

Sử dụng quy trình tách chiết TFA đã được xây dựng cho vi tảo áp dụng với đối tượng mới là VKTQH và tiến hành tối ưu các thông số cho phù hợp với đối tượng mới này như: nhiệt độ; chất xúc tác; tỷ lệ nguyên liệu:dung môi (khối lượng:thể tích); thời gian trích ly; chế độ trích ly (khuấy liên tục, để tĩnh, khuấy gián đoạn).

**Ảnh hưởng của nhiệt độ**

Trong thí nghiệm này sử dụng 3 khoảng nhiệt độ: 60 - 65°C, 70 - 75°C và 80 - 85°C với chất xúc tác HCl, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1:10 (w/v), thời gian phản ứng 3 giờ và khuấy trộn liên tục để tách chiết TFA (Hình 1).

Từ Hình 1 cho thấy ở nhiệt độ trong khoảng 80-85°C hiệu suất tách TFA tối ưu đạt 20,3 ± 1,07% KLK. Hiệu suất tách TFA ở các khoảng nhiệt độ 70 - 75°C và 60 - 65°C đạt lần lượt 19,6 ± 1,12% và 13,7 ± 0,87% KLK. Như vậy, hiệu suất tách chiết TFA tăng khi nhiệt độ phản ứng tăng. Tuy nhiên, khi tách chiết với một lượng lớn sử dụng nhiệt độ 80-85°C là không an toàn, dung môi dễ bay hơi và dễ xảy ra cháy nổ. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ phản ứng trong khoảng 70-75°C để tiến hành tối ưu các thông số tiếp theo. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn Johnson và Wen (2009) khi tiến hành phản ứng ở 90°C trong 40 phút trên đối tượng vi tảo cho hàm lượng biodiesel cao nhất đạt 42,05% sinh khối khô tảo, nhưng lại cao hơn so với nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và Hoàng Thị Lan Anh (2016) với nhiệt độ 60 - 65°C trong 3 giờ cho tách chiết axit béo đạt hiệu suất 46,7% sinh khối tảo. Cho đến nay, tại Việt Nam chưa có một công bố nào về tách chiết các axit béo không bão hòa trên đối tượng VKTQH. Ngoài ra, về thành phần các axit béo có trong sinh khối VKTQH lại có sự tương đồng khá lớn với thành phần axit béo ở sinh khối vi tảo. Do vậy, sinh khối VKTQH cũng đã được sử dụng làm thức ăn cho một số đối tượng nuôi trồng thủy sản như nhuyễn thể (ngao, hào) (Hoàng Thị Yến, 2010), một số loài cá (như cá rô phi) (Banerjee *et al.*, 2000). Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành so sánh kết quả nghiên cứu của mình với các công bố của vi tảo tại Việt Nam.

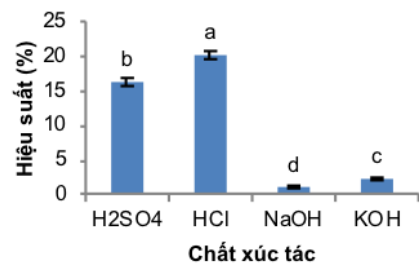


**Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hiệu suất tách chiết TFA từ sinh khối VKTQH**

**Ảnh hưởng của chất xúc tác**

Sử dụng các chất xúc tác như: HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH và KOH với tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:10 (w/v) ở nhiệt độ 70 - 75°C trong thời gian phản ứng 3 giờ và điều kiện khuấy trộn liên tục để tách chiết TFA.

Kết quả ở Hình 2 cho thấy khi sử dụng chất xúc tác bazơ (KOH, NaOH) trong phản ứng tách chiết TFA rất phức tạp, khó khăn, hiệu suất tách chiết TFA thấp chỉ đạt 2,4 ± 0,28% và 1,1 ± 0,15% KLK tương ứng. Khi sử dụng chất xúc tác axit (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), TFA thu được dễ dàng và đạt hiệu suất cao 19,7 ± 0,59% và 16,4 ± 0,6% KLK tương ứng. Ngoài ra, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> có độ đậm đặc rất cao nên rất nguy hiểm khi sử dụng và dễ dàng gây ô nhiễm môi trường nếu không có biện pháp xử lý thu hồi sau khi sử dụng. Trên đối tượng là vi tảo, HCl cũng được sử dụng làm xúc tác



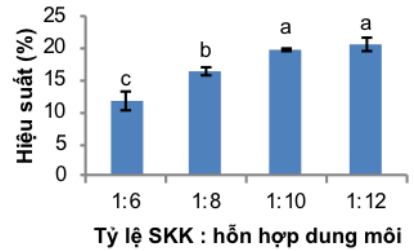
**Hình 2. Ảnh hưởng của chất xúc tác lên hiệu suất tách chiết TFA từ sinh khối**

cho phản ứng tách chiết axit béo (Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Lan Anh, 2016). Một số nghiên cứu cũng sử dụng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> làm chất xúc tác và thu được hiệu suất chuyển hóa biodiesel cao nhất đạt 66,47% (Johnson, Wen, 2009).

**Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu:dung môi (khối lượng:thể tích)**

Trong thí nghiệm này sinh khối khô VKTQH được tách chiết với các tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:6; 1:8; 1:10 và 1:12 (w:v), chất xúc tác HCl, nhiệt độ 70-75°C trong thời gian 3 giờ và ở điều kiện khuấy trộn liên tục.

Kết quả Hình 3 cho thấy hiệu suất tách chiết TFA cao nhất tại tỷ lệ 1:12 (w:v) (đạt 20,5 ± 0,95% KLK) và thấp nhất tại tỷ lệ 1:6 (w/v) (chỉ đạt 11,8 ± 1,61% KLK). Khi so sánh hàm lượng TFA ở tỷ lệ 1:10 và 1:12 (w/v) cho thấy không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê. Ở điều kiện tỉ lệ sinh khối:hỗn hợp dung môi 1:8 (w/v), TFA thu được chỉ đạt 82% so với tỷ lệ 1:10 (w/v). Vì vậy, để tiết kiệm dung môi cũng như giảm giá thành sản phẩm tỷ lệ sinh khối:hỗn hợp dung môi 1:10 (w/v) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Như vậy trên các đối tượng khác nhau thì tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là khác nhau. Johnson và Wen (2009) sử dụng tỷ lệ sinh khối:hỗn hợp dung môi (methanol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, hexane) là 1:8 (w/v) cho hàm lượng biodiesel cao nhất đạt 42,05% sinh khối khô tảo.

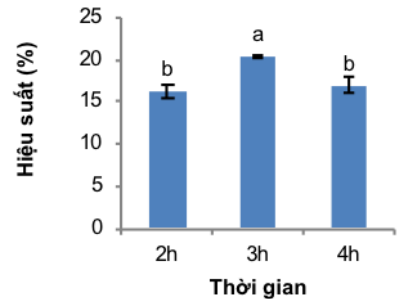


**Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ sinh khối/dung môi lên hiệu suất tách chiết TFA từ sinh khối VKTQH**

**Ảnh hưởng của thời gian**

Trong thí nghiệm này, sử dụng chất xúc tác HCl, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:10 (w/v), nhiệt độ 70 - 75°C, điều kiện khuấy trộn liên tục và thời gian thay đổi: 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ.

Từ Hình 4 cho thấy hiệu suất thu TFA thay đổi khi tăng dần thời gian phản ứng. Với thời gian 3 giờ, hiệu suất tách chiết TFA cao nhất đạt 19,7 ± 0,25% KLK. Với thời gian 2 giờ hiệu suất thu TFA thấp chỉ đạt 16,2 ± 0,8% KLK, nguyên nhân có thể do phản ứng xảy ra chưa hoàn toàn. Khi tiếp tục tăng thời gian lên 4 giờ, hiệu suất giảm cũng chỉ đạt 16,9 ± 0,01% KLK, nguyên nhân có thể do phản ứng xảy ra trong thời gian dài làm bay hơi dung môi hoặc do tác động của nhiệt độ trong thời gian dài một số axit béo chưa bão hòa bị chuyển hóa dẫn đến hiệu suất giảm. Để tiết kiệm thời gian và đạt hiệu quả kinh tế, thời gian phản ứng là 3 giờ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo phù hợp với nghiên cứu của Đinh Thị Ngọc Mai và đồng tác giả (2012) khi phản ứng ở 3 giờ đã chuyển hóa 43% biodiesel và axit béo đạt 46,7% sinh khối tảo (Đinh Thị Ngọc Mai *et al.*, 2012).

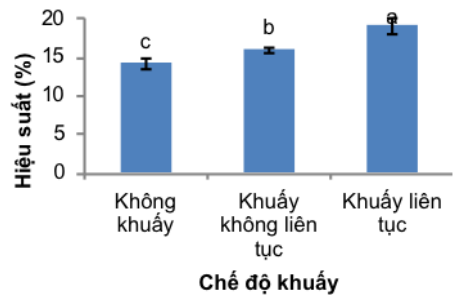


**Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian lên hiệu suất tách chiết TFA từ sinh khối VKTQH**

**Ảnh hưởng của điều kiện khuấy trộn**

Trong thí nghiệm này sử dụng chất xúc tác HCl, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:10 (w:v) ở nhiệt độ 70 - 75°C, thời gian 3 giờ và điều kiện khuấy trộn như sau: không khuấy trộn, khuấy trộn gián đoạn (30 phút khuấy, 30 phút ngừng) và khuấy trộn liên tục.

Kết quả Hình 5 cho thấy hiệu suất tách chiết TFA ở điều kiện khuấy liên tục cao nhất đạt 19,8 ± 1,01% KLK. Trong khi đó ở điều kiện không khuấy hoặc khuấy gián đoạn, hiệu suất tách chiết TFA giảm đi chỉ đạt 14,3 ± 0,76%KLK và 19,8 ± 1,01% KLK tương ứng. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do chế độ khuấy ảnh hưởng đến sự tiếp xúc giữa sinh khối và dung môi làm phản ứng xảy ra không liên tục. Do vậy, chế độ khuấy liên tục đã được lựa chọn để làm tăng tối đa hiệu suất tách chiết TFA từ sinh khối khô VKTQH. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Đinh Thị Ngọc Mai và đồng tác giả (2012) trên đối tượng vi tảo cho thấy hiệu quả chuyển hóa biodiesel tăng lên đáng kể đạt 89% dưới điều kiện khuấy trộn liên tục.

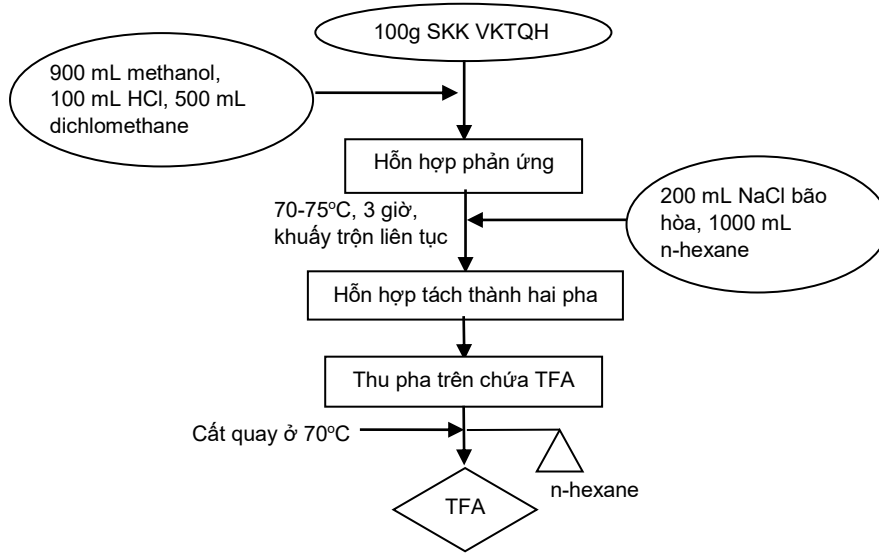


**Hình 5. Ảnh hưởng của điều kiện khuấy trộn lên hiệu suất tách chiết TFA từ sinh khối VKTQH**

**Tách chiết và kiểm tra chất lượng axit béo sau khi được tối ưu**

Sử dụng quy trình tách chiết axit béo tổng số đã được công bố ở Việt Nam đối với đối tượng là vi tảo Đặng Diễm Hồng và Hoàng Thị Lan Anh (2016) và sử dụng kết quả tối ưu các điều kiện tách chiết cho phù hợp với đối tượng

mới là sinh khối VKTQH đã thu được quy trình tách chiết axit béo tổng số từ VKTQH quy mô 100 g KLK/m<sup>2</sup> (Hình 6).



**Hình 6. Quy trình tách chiết TFA từ sinh khối khô VKTQH**

Sử dụng quy trình tách chiết trên, từ 100 g sinh khối khô, đã thu được 19,7 g dầu VKTQH (hiệu suất đạt 19,7% KLK). Như vậy, hiệu suất tách TFA thấp hơn không đáng kể so với hàm lượng lipid có trong sinh khối khô VKTQH (20,342 ± 1,247 % KLK). Thành phần axit béo tổng số được xác định và so sánh với thành phần axit béo trong sinh khối khô. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

**Bảng 2. Thành phần và hàm lượng axit béo trong sinh khối khô và trong dầu VKTQH tách chiết được**

Axit béo	Tên khoa học	Hàm lượng trong sinh khối khô (% so với TFA)	Hàm lượng trong dầu tách chiết được (% so với TFA)
C12:0	Dodecanoic acid		0,095
C14:0	Tetradecanoic acid	3,849	3,630
C15:0	Pentadecanoic acid	0,251	1,240
C16:1n-9	cis-7 hexadecenoic acid	0,240	0,956
C16:1n-7	(9Z)-hexadecenoic acid	1,491	7,441
C16:0	Hexadecanoic acid	33,313	33,105
C17:1n-7	10-Heptadecenoic acid		0,186
C17:0	Heptadecanoic acid	0,410	0,986
C18:1n-9	9-octadecenoic acid	25,147	16,458
C18:1n-7	11-Octadecenoic acid	16,523	9,768
C18:4n-3	cis-6,9,12,15-octadecatetraenoic acid	3,521	9,327
C18:3n-6	cis-6,9,12-octadecatrienoic acid	3,600	3,580
C18:3n-3	cis-9,12,15-octadecatrienoic acid	4,961	4,438
C20:1n-7	13-eicosenoic acid	0,304	0,580
C20:4n-6	(5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	0,274	0,296
C20:3n-6	all-cis-8,11,14-eicosatrienoic acid	0,222	0,294
C20:5n-3	cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoic		0,088
	Loại khác	5,894	7,532
	Tổng các axit béo omega-3	8,48	13,85
	Tổng các axit béo omega-6	4,10	4,17
	Tổng các axit béo omega-7	18,32	17,98
	Tổng các axit béo omega-9	25,38	17,41
	<b>Tổng các axit béo không no (omega-3,6,7,9)</b>	<b>56,28</b>	<b>53,41</b>

Từ Bảng 2 cho thấy dầu sinh học sau quá trình tách chiết chứa axit béo không no (omega-3,6,7,9) chiếm 53,41% so với TFA, thành phần này không sai khác đáng kể so với trong sinh khối khô VKTQH (56,28%; chỉ giảm 2,87%). Hàm lượng omega-3 tăng từ 8,48% lên 13,85%; hàm lượng omega-6 tăng từ 4,10% lên 4,17%; hàm lượng omega-7 giảm từ 18,32% xuống 17,98% và hàm lượng omega-9 giảm từ 25,38 xuống còn 17,41%. Sự khác biệt này có thể do sai số trong khi phân tích, trong quá trình tách chiết hay xử lý mẫu đã gây ra một sự chuyển hóa nào đó trong thành phần các axit béo. So sánh sản phẩm dầu trong nghiên cứu của Đinh Thị Ngọc Mai và đồng tác giả (2012) cho kết quả axit béo không no từ sinh khối tảo cao hơn (chiếm 58,06% so với TFA). Như vậy quy trình tách chiết TFA từ sinh khối khô VKTQH có được là phù hợp với đối tượng này, hỗn hợp axit béo thu được sẽ tiếp tục được kiểm tra tính an toàn và sẽ được thông báo trong các công bố tiếp theo để bảo đảm sử dụng nguồn nguyên liệu này cho sản xuất dầu sinh học giàu axit béo không no omega-3,6,7,9 làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người.

## KẾT LUẬN

Từ những số liệu thu được cho thấy, các điều kiện thích hợp cho quá trình tách chiết TFA từ sinh khối khô VKTQH gồm: chất xúc tác - HCl; tỷ lệ sinh khối:hỗn hợp dung môi là 1:10 (w/v); nhiệt độ phản ứng 70 - 75°C; thời gian phản ứng 3 giờ; điều kiện khuấy trộn liên tục.

Đã xây dựng được quy trình tách chiết TFA từ sinh khối khô VKTQH ở quy mô 100 g/mẻ với hiệu suất tách chiết đạt 19,7%. Tổng hàm lượng omega-3,6,7,9 thu được sau tách chiết chiếm 53,41% so với TFA, trong đó, hàm lượng omega-3, omega-6, omega-7 và omega-9 lần lượt đạt 13,85%; 4,17%; 17,98% và 17,41% tương ứng so với axit béo tổng số.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020 trong đề tài “Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất omega 6, 7, 9 từ vi khuẩn tía quang hợp ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm”, mã số: ĐT.09.17/CNSHCB.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Banerjee S, Azad SA, Vikineswary S, Selvaraj OS, Mukherjee TK (2000). Phototrophic Bacteria as Fish Feed Supplement. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13 (7): 991-994.
- Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Lan Anh (2016). Vi tảo biển dị dưỡng *Labyrinthula*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* ở Việt Nam: Tiềm năng và thách thức. Bộ sách chuyên khảo Tài nguyên thiên nhiên và môi trường Việt Nam, Nhà xuất bản khoa học tự nhiên và công nghệ.
- Đinh Thị Ngọc Mai, Đinh Đức Hoàng, Lê Thị Thom, Bùi Đình Lâm, Nguyễn Cẩm Hà, Đặng Diễm Hồng (2012). Nghiên cứu áp dụng phương pháp chuyển vị ester tại chỗ để sản xuất diesel sinh học từ vi tảo biển *Nannochloropsis oculata*. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 10 (2): 371-377.
- Gunstone FD (1996). Fatty acid and lipid chemistry. *Blackie Academic, London*.
- Harley JP, Prescott LM (2007). Laboratory exercises in microbiology. 7<sup>th</sup> ed. *McGraw-Hill Science Engineering*.
- Hoàng Thị Yến (2010). Nghiên cứu vi khuẩn quang hợp tía không lưu huỳnh phân lập tại Việt Nam dùng làm thức ăn tươi sống cho com giống động vật hai mảnh vỏ. *Luận án Tiến sĩ sinh học*.
- Imhoff JF, Hiraishi, Suling J (2005). Anoxygenic phototrophic purple bacteria. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. George M. Garrity*, 2: 1- 41.
- International Organization for Standardization (1988). Animal and vegetable fats and oils-preparation of methyl esters of fatty acids. *ISO, Geneva, Switzerland, Standard No. 5509*
- Johnson MB, Wen Z (2009). Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy & Fuels*, 23 (10): 5179-5183.
- Kim, DH, Lee JH, Hwang Y, Kang S, Kim MS (2013). Continuous cultivation of photosynthetic bacteria for fatty acids production. *Bioresour Technol*, 148: 277-282.
- Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA (1999). The biotechnological potential of thraustochytrids. *Mar Biotechnol*, 1 (6): 580-587.
- Maria EF and Ruth GA (2017). The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. *Adv Nutr*, 8 (1): 173S-181S.
- Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Đăng Toàn, Đinh Thị Ngọc (2015). Nghiên cứu chiết tách dầu từ sinh khối vi tảo họ *Botryococcus* sp. làm nguyên liệu cho quá trình tổng hợp biodiesel. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53 (5): 646-653.
- Robert SS (2006). Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-containing oils in transgenic land plants for human and aquaculture nutrition. *Mar Biotechnol*, 8 (2): 103-109.

## STUDY ON SUITABLE CONDITIONS FOR THE EXTRACTION OF UNSATURATED FATTY ACIDS (OMEGA-3,6,7,9) FROM PHOTOSYNTHETIC PURPLE BACTERIAL BIOMASS

Tran Thi Thu Quynh<sup>1,2</sup>, Tran Thu Ha<sup>1</sup>, Do Thi Tuyen<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Thu Huyen<sup>3</sup>, Lai Thi Ngoc Ha<sup>4</sup>, Dinh Thi Thu Hang<sup>2</sup>, Dang Diem Hong<sup>1</sup>, Hoang Thi Yen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

<sup>2</sup> Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup> Thai Nguyen University of Sciences

<sup>4</sup> Vietnam National University of Agriculture

### SUMMARY

These days, the functional food related to omega-3,6,7,9 supplement play an important role in human health care. However, the lack of material resources which are rich in unsaturated fatty acids (omega-3,6,7,9) causes a lot of difficulties in producing these kinds of food. Beside that, the number of researches have shown that the oil extractions from microbial biomass could solve the lack of materials and bring a lot of prospects in the future production. In this study, transesterification ester method was carried out and all related conditions were optimized. Biomass of two purple nonsulfur bacteria strains named *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 and *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 was used for extraction. The dry biomass weight and total lipid content were  $2.42 \pm 0.29$  g/L and  $20.342 \pm 1.247\%$ , respectively. The dry biomass was methylated in 100 mL solvent containing 10% of catalytic solution and 90% methanol, then this mixture was added by 50 mL dichloromethane. The optimal conditions for the reaction include HCl playing as the catalyst; biomass in solvent with 1:10 (w/v) ratio and continuous stirring in period of 3 hours at 70-75°C. The total fatty acid obtained from the extraction process reached to 19.7% of dry biomass weight and the content of unsaturated fatty acids accounted for 53.41% of total fatty acid, in which the percentages of omega-3, omega-6, omega-7 and omega-9 were 13.85%, 4.17%, 17.98% and 17.41%, respectively. Obtained fatty acids in this study can be used as good quality material for producing the bio-oil rich omega-3,6,7,9 for functional food.

**Keywords:** Fatty acid, omega, extraction, biomass, purple nonsulfur bacteria.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0912543265; E-mail: hoangyen.ibt@gmail.com