

NHIÊN LIỆU SINH HỌC TỪ VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG CỦA VIỆT NAM: BIODIESEL VÀ TẬN THU CÁC SẢN PHẨM PHỤ (AXÍT BÉO KHÔNG BẢO HÒA ĐA NÓI ĐÔI - PUFAs, GLYCEROL VÀ SQUALENE) TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT BIODIESEL

Đặng Diễm Hồng^{1*}, Nguyễn Cẩm Hà^{1,2}, Lê Thị Thơm^{1,2},
Lưu Thị Tâm¹, Hoàng Thị Lan Anh¹, Ngô Thị Hoài Thu¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu liên quan đến việc sản xuất biodiesel và tận thu các sản phẩm phụ có giá trị đi kèm như axit béo không bão hòa đa nối đôi (polyunsaturated fatty acids- PUFAs), glycerol và squalene từ loài vi tảo biển dị dưỡng của Việt Nam, *Schizochytrium mangrovei*. Hiệu suất của quá trình sản xuất các axit béo dạng methyl ester (FAME) từ vi tảo này đạt tương ứng 89,2% và 46,7% so với dầu tảo và sinh khối tảo. Phân đoạn chứa các axit béo bão hòa, biodiesel thô (SFAME), được tách khỏi phân đoạn giàu các axit béo không bão hòa (UFAME) bằng phương pháp tạo phức với urê ở 10°C. Các đặc tính của biodiesel thu được hầu hết phù hợp với tiêu chuẩn biodiesel B100 của Việt Nam. Hàm lượng DHA (axít docosahexaenoic, C22:6 ω-3) chiếm 72,00% so với tổng số axit béo trong phân đoạn UFAME. Bên cạnh đó, các nghiên cứu nhằm sử dụng glycerol thải từ quá trình sản xuất biodiesel như nguồn cacbon để nuôi trồng chính loài *S. mangrovei* và tảo lam *Spirulina platensis* BM cũng đã được thực hiện. Trong bã sinh khối tảo còn lại sau quá trình tách chiết biodiesel, hàm lượng squalene chiếm khoảng 50,21-80,10 ± 0,03 mg/g bã sinh khối. Cấu trúc của squalene thu được sau quá trình tách chiết đã được kiểm tra bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Các kết quả thu được đã cho thấy, khai thác theo hướng tận thu các sản phẩm phụ có giá trị nói trên có thể giảm giá thành sản xuất biodiesel từ loài vi tảo này.

Từ khóa: *Schizochytrium mangrovei*, biodiesel, fatty acid methyl esters, glycerol, squalene.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, biodiesel đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học như là nguồn năng lượng tái tạo, không độc, phân hủy sinh học, thân thiện với môi trường và có thể thay thế cho nhiên liệu hóa thạch thông thường đang dần cạn kiệt (Jeon & Yeom, 2010; Atadashi et al., 2013). Trong số các nguồn nguyên liệu dùng để sản xuất nhiên liệu sinh học, vi tảo được xem là nguồn nguyên liệu có nhiều lợi thế để sản xuất biodiesel do tốc độ sinh trưởng nhanh, hàm lượng dầu cao, việc nuôi trồng không bị ảnh hưởng bởi địa điểm nuôi trồng, mùa vụ, khí hậu, và dễ dàng mở rộng quy mô... (Demirbas, 2010; Ahmad et al., 2011). Biodiesel sản xuất từ dầu tảo có thể cao gấp từ 15-300 lần so với việc sản xuất biodiesel từ các loại cây trồng truyền thống tính trên cùng đơn vị diện tích (Chisti, 2007).

Giá thành cao là một trong những yếu tố lớn

nhất cản trở việc thương mại hóa diesel từ vi tảo. Các biện pháp nhằm làm giảm chi phí của biodiesel là mối quan tâm lớn trong nghiên cứu nhiên liệu sinh học. Gần đây, các nghiên cứu tập trung vào việc giảm thiểu các chi phí nguyên vật liệu và khai thác sản phẩm phụ có giá trị đi kèm. Các sản phẩm này có thể là các axit béo, vitamin, sterol, hoặc các phân tử có hoạt tính sinh học khác. Trong số đó, rất nhiều sản phẩm có giá trị thương mại cao như các axit béo không bão hòa đa nối đôi-PUFAs (polyunsaturated fatty acids): axit eicosapentaenoic (C20:5ω-3, EPA) và docosahexaenoic (C22:6ω-3, DHA), docosapentaenoic (C22:5ω-6, DPA), thường được sử dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm như chất bổ sung để ngăn ngừa bệnh tim mạch, bệnh trầm cảm và có hoạt tính kháng viêm (Adarme-Vega et al., 2012). Bên cạnh đó, còn có squalene, một chất chống oxy hóa tiềm

năng, có tác dụng tăng cường miễn dịch, giảm cholesterol máu (Nergiz & Celikkale, 2011) và glycerol- một nguồn cacbon mà một số loài vi tảo có thể sử dụng (Ethier et al., 2011).

Biodiesel có thể được sản xuất bằng các phương pháp khác nhau, trong đó phương pháp chuyển vị ester tại chỗ được xem là phương pháp đơn giản, tiết kiệm thời gian, giảm giá thành của sản phẩm diesel cuối cùng và là phương pháp thích hợp với nguồn nguyên liệu là vi tảo (Haag, 2007; Ehimen et al., 2010).

Schizochytrium mangrovei là một loài vi tảo biến dị dưỡng được phân lập tại Việt Nam có khả năng tích lũy lipid cao với thành phần axit béo khá phù hợp cho việc sản xuất biodiesel và PUFAs trong đó hàm lượng hai axit béo chủ yếu là DHA chiếm 43,52% so với tổng số axit béo-TFA (total fatty acids), axit palmitic (C16:0) chiếm 37,71% so với TFA (Hong et al., 2011). Nghiên cứu này tập trung vào việc sản xuất biodiesel và tận thu các sản phẩm phụ như PUFAs và glycerol từ sinh khối tảo bằng phương pháp chuyển vị ester tại chỗ. Glycerol sau đó được sử dụng trở lại để nuôi trồng tảo *Schizochytrium* và *Spirulina*. Bã sinh khối tảo còn lại sẽ được sử dụng để tách chiết squalene. Các kết quả thu được sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm hiện thực hóa việc đưa biodiesel vào thực tế.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng tảo và điều kiện nuôi trồng

Loài *S. mangrovei* được phân lập từ huyện đảo Phú Quốc, Kiên Giang năm 2006-2008, loài tảo lam *Spirulina platensis* BM thuộc tập đoàn giống của phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam. Chủng vi tảo này được nuôi trồng ở hệ thống lên men 30 và 150 lít (Hong et al., 2011). Sinh khối tảo sau khi thu hoạch được rửa bằng nước cất 3 lần, sấy khô ở 80°C và bảo quản trong desiccator làm nguyên liệu để chuyển hóa biodiesel. *S. platensis* BM được lưu giữ trên môi trường SOT theo công bố của Ngô Thị Hoài Thu và nnk. (2007), được sử dụng trong các thí nghiệm sử dụng glycerol thải như nguồn C để nuôi trồng.

Sản xuất biodiesel và xác định các đặc tính của biodiesel sản xuất được

Biodiesel được chuyển hóa từ sinh khối tảo theo mô tả của Johnson & Wen (2009) và Wanasundara (2010) với một số cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm Việt Nam (Đinh Thị Ngọc Mai và nnk., 2012). Sau khi thu được các axit béo dạng methyl ester (FAME), thành phần axit béo không bão hòa (UFAME) sẽ được tách ra khỏi axit béo bão hòa (SFAME) bằng phương pháp tạo phức với urê ở 10°C trong 12 h. Phần SFAME-biodiesel sinh học thô và UFAME-chứa DHA tiếp tục được làm sạch bằng nước ấm với tỷ lệ 50 biodiesel: 50 nước cất (v/v) cho đến khi pH của nước rửa đạt trung tính. Hiệu suất của quá trình chuyển hóa biodiesel được xác định dựa trên khối lượng của sản phẩm biodiesel thu được so với hàm lượng lipid tổng số chứa trong sinh khối tảo (% theo khối lượng dầu). Các tính chất đặc trưng của biodiesel thu được và các tính chất ngoại quan được xác định theo các phương pháp chuẩn ASTM do Việt Nam quy định tại Phòng thử nghiệm Xăng-Dầu-Khí, Trung tâm kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng 1, Tổng cục tiêu chuẩn đo lường chất lượng Việt Nam, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Thành phần và hàm lượng axit béo được xác định bằng phương pháp sắc ký khí tại Viện hoá học các hợp chất tự nhiên theo tiêu chuẩn ISO/FDIS 5590:1998, Liên bang Đức theo phương pháp đã mô tả trong công bố của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2007).

Sử dụng glycerol như nguồn C để nuôi trồng *Schizochytrium mangrovei* và *Spirulina platensis* BM

Glycerol thô được tinh sạch bằng ethanol để loại bỏ các axit béo tự do, muối vô cơ. Đối với *S. mangrovei*, glucose trong môi trường M1 được thay thế bởi 30, 50, 70, 90 g/L glycerol thải ra từ quá trình chuyển hóa biodiesel (Hong et al., 2011). Thí nghiệm được tiến hành ở bình tam giác 250 mL chứa 100 mL môi trường, nhiệt độ 28°C, lắc 200 rpm. Sau 4 ngày nuôi trồng, lượng sinh khối khô và hàm lượng lipid tổng số trong sinh khối tảo được xác định.

Đối với *S. platensis* BM, loài tảo này được nuôi cấy trong các bình tam giác 250 mL chứa

100 mL môi trường SOT với NaHCO_3 là nguồn C, glycerol thái được bổ sung vào môi trường SOT (ở nồng độ 2,5 mM) và nồng độ NaHCO_3 được giảm xuống từ 16,8 g/L xuống 0 g/L. Tất cả thành phần khác trong môi trường được giữ nguyên. Nhiệt độ nuôi trồng được duy trì ở $28 \pm 1^\circ\text{C}$ và cường độ chiếu sáng là $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, lắc ở 100 rpm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Tách chiết squalene từ bã sinh khối tảo sau quá trình sản xuất biodiesel

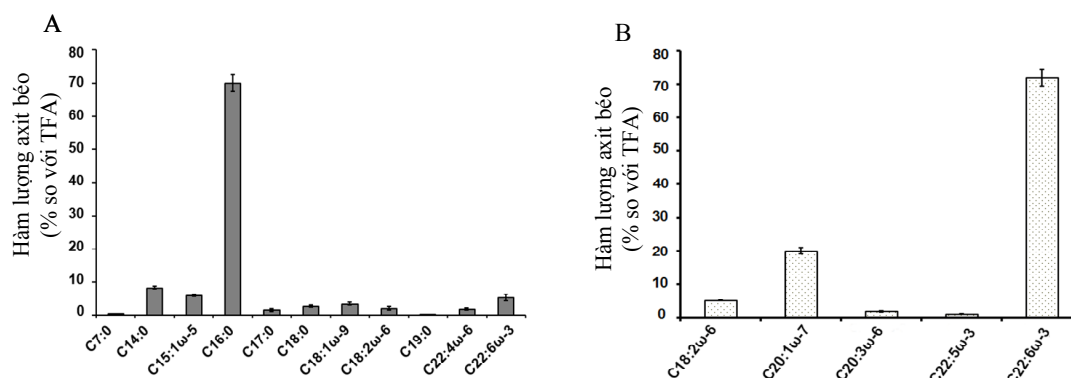
Lipit từ bã sinh khối tảo được tách chiết theo phương pháp Bligh & Dyer (1959) với một số cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam. Sau đó, phần lipit không xà phòng hoá được tách từ lipit tổng số theo mô tả của Lewis et al. (2001). Squalene được phân tách từ phần lipit không xà phòng hóa trên bản sắc ký lớp mỏng (TLC) và được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) (Đinh Thị Ngọc Mai và nnk., 2013). Sau khi

tinh sạch qua cột sắc kí silicagel 60, cấu trúc squalene được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) sử dụng máy Bruker Avance-500 MHz spectrometer (Bruker, Karlsruhe, CHLB Đức) tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biodiesel từ vi tảo *Schizochytrium* và đặc tính của chúng

Chuyển vị ester tại chỗ là phương pháp được sử dụng nhiều cho việc sản xuất FAME từ sinh khối tảo (Johnson & Wen, 2009). Quá trình này dễ dàng chuyển đổi dầu sinh khối tảo thành FAME một cách trực tiếp từ sinh khối chứa dầu, do đó loại bỏ các bước tách chiết bằng dung môi cần thiết nguyên liệu chứa dầu. Hiệu suất sản xuất FAME từ *S. mangrovei* PQ6 bằng phương pháp chuyển vị ester tại chỗ khoảng 89,2% tính trên khối lượng dầu và 46,7% dựa trên khối lượng tảo.



Hình 1. Thành phần SFAME (A) and UFAME (B) sản xuất từ sinh khối *Schizochytrium mangrovei*

Kết quả thu được cho thấy, phân đoạn SFAME và UFAME chiếm 72% và 28% khối lượng, tương ứng. Thành phần axit béo của hai phân đoạn này được chỉ ra ở hình 1. Thành phần các methyl ester chủ yếu có chứa trong SFAME đó là C16:0 ($70,03 \pm 2,56\%$ so với TFA), C14:0 ($8,14 \pm 0,45\%$ so với TFA), C15:1 ω -5 ($5,78 \pm 0,34\%$ so với TFA). Tất cả các methyl ester có C14-16 chiếm khoảng 83,95% so với TFA (hình 1A). Giá trị này cho thấy biodiesel được sản xuất ra có chất lượng cao. Đối với UFAME, các

methyl esters chiếm chủ yếu là C18:2 ω -6-t ($5,12 \pm 0,15\%$ so với TFA), C20:1 ω -7 ($20,01 \pm 1,02\%$ so với TFA), C20:3 ω -6 ($1,80 \pm 0,13\%$ so với TFA), C22:5 ω -3 ($1,07 \pm 0,05\%$ so với TFA), C22:6 ω -3 ($72,00 \pm 2,31\%$ so với TFA) (hình 1B). Như vậy, có thể thấy rõ một lượng lớn DHA tập trung ở phân đoạn UFAME. Một lượng nhỏ DHA đã bị mất sau quá trình chuyển vị ester và tinh sạch phân đoạn giàu PUFAs.

Bảng 1. Các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm biodiesel sản xuất từ sinh khối tảo *S. mangrovei* PQ6

Chi tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Tiêu chuẩn	Diesel sinh học chuyển hóa có thu sản phẩm phụ PUFAs
Khối lượng riêng ở 15°C	Kg/m ³	TCVN 6594	860 - 900	885,67
Điểm chớp cháy cốc kín	°C	TCVN 2693	Min 130	188,34
Nước và cặn	% thể tích	TCVN 7757	Max 0,05	0,02
Độ nhớt động học ở 40°C	cSt	TCVN 3171	1,9 - 6,0	5,18
Tro sulphat	% khối lượng	TCVN2689	Max 0,02	0,001
Lưu huỳnh	ppm	TCVN 7760	500	9,50
Độ ăn mòn đồng		TCVN 2694	Loại 1	Loại 1
Trị số xêtan		TCVN 7603	Min 47	69,50
Điểm vẫn đục	°C	ASTM D 2500		19,45
Cặn cacbon	% khối lượng	TCVN 6324	0,5	0,43
Trị số axit	mg KOH/g	TCVN 6325	0,5	6,50
Chỉ số iot	g Iot/100 g	TCVN 6122	Max 120	41,21
Độ ổn định oxy hóa (110°C)	Giờ	EN 14112	6	0,07
Nhiệt độ cất, 90% thu hồi	°C	ASTMD 1160	360	395,23
Ngoại quan		Mắt thường	Không có nước, cặn và tạp chất lơ lửng	Không có nước, cặn và tạp chất lơ lửng

Bảng 1 trình bày đặc tính của biodiesel sản xuất từ sinh khối *S. mangrovei*. Kết quả cho thấy, sản phẩm biodiesel thu được có 11/15 chỉ tiêu đạt yêu cầu của sản phẩm diesel sinh học B100 theo tiêu chuẩn Việt Nam công bố, gồm khối lượng riêng ở 15°C, hàm lượng nước và cặn, độ nhớt động học, tro sulphat, lưu huỳnh, độ ăn mòn đồng, trị số xêtan, cặn cacbon, trị số iot và các tính chất ngoại quan (TCVN 7717: 2007). Các chỉ tiêu chưa đạt chuẩn cần tiếp tục có những nghiên cứu sâu hơn để cải thiện.

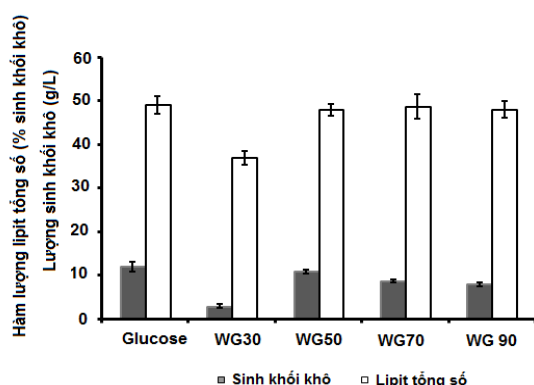
Sử dụng glycerol như nguồn C để nuôi trồng *Schizochytrium mangrovei* và *Spirulina platensis* BM

Trong quá trình sản xuất dầu diesel sinh học, glycerol là một sản phẩm phụ, không tinh khiết và có giá trị kinh tế thấp. Chi phí tinh chế glycerol cho các ứng dụng y tế cao. Chính vì vậy, một hướng đi khác là sử dụng glycerol thô làm nguồn C cho nuôi trồng tảo với mục tiêu sản xuất DHA thông qua quá trình nuôi trồng dị

dưỡng (Chi et al., 2007). Ở đây, chúng tôi thử nghiệm việc sử dụng glycerol thải với các nồng độ khác nhau từ 30-90 g/L (viết tắt WG30-90) để nuôi trồng *S. mangrovei* cho sản xuất sinh khối giàu DHA. Kết quả chỉ ra ở hình 2 và bảng 2. Sinh trưởng và hàm lượng lipid tổng số của *S. mangrovei* được đánh giá sau 4 ngày nuôi cấy ở các công thức thí nghiệm đã cho thấy, lượng sinh khối khô và lipid tổng số cao nhất đạt được khi sử dụng glycerol thải với nồng độ 50 g/L (10,95 g/L; 48,02% sinh khối khô) tương ứng với công thức đối chứng sử dụng 30 g/L glucose. Việc phân tích thành phần axit béo của sinh khối tảo này khi nuôi trồng trên nguồn C là glucose và glycerol thải (50 g/L) đã cho thấy, phổ axit béo khi môi trường được bổ sung glycerol thải đơn giản hơn so với glucose nhưng lại có hàm lượng DHA là tương tự nhau đối với cả hai công thức. Thành phần axit béo đơn giản sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tách chiết và tinh sạch sau này.

Bảng 2. Thành phần axit béo trong sinh khối *S. mangrovei* khi nuôi trong môi trường có bổ sung 30 g/L glucose và 50 g/L glycerol thải

Thành phần	Hàm lượng (% so với tổng số axit béo)	
	30 g/ L glucose	50 g/L glycerol thải
C14:0	1,70 ± 0,02	1,71 ± 0,01
C14:1ω-5	0,65 ± 0,01	-
C15:0	-	2,60 ± 0,12
C15:1ω-5	6,20 ± 0,43	-
C16:0	30,90 ± 2,17	41,91 ± 1,56
C16:1ω-7	0,53 ± 0,01	-
C16:1ω-9	1,21 ± 0,03	-
C17:0	0,25 ± 0,01	1,32 ± 0,01
C18:0	0,93 ± 0,05	1,09 ± 0,02
C18:1ω-7	0,34 ± 0,03	-
C18:2ω-6	0,14 ± 0,01	1,58 ± 0,01
C18:4ω-3	0,13 ± 0,02	-
C20:0	0,06 ± 0,00	-
C20:3ω-3	-	2,47 ± 0,12
C20:3 ω-6	0,32 ± 0,01	-
C20:4ω-3	1,24 ± 0,16	-
C22:4ω-6	0,12 ± 0,00	-
C22:5ω-6	10,16 ± 0,57	-
C22:6ω-3	45,12 ± 1,42	47,09 ± 1,16



Hình 2. Sinh trưởng và hàm lượng lipit tổng số của *S. mangrovei* khi sử dụng glucose và glycerol thải (WG) từ quá trình sản xuất biodiesel

Không giống như *S. mangrovei*, *Spirulina platensis* BM là loài vi tảo lam quang tự dưỡng sử dụng nguồn C vô cơ là chủ yếu. Tuy nhiên,

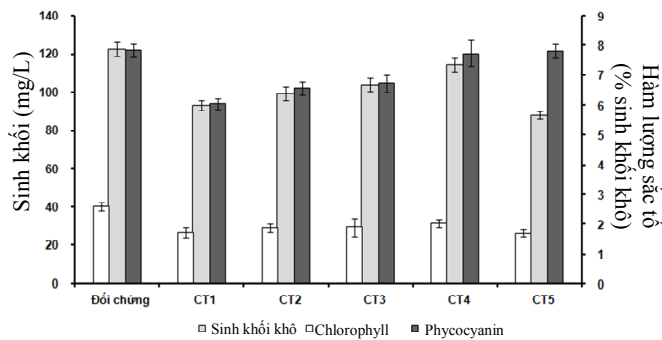
cũng có một số nghiên cứu được thực hiện trên nguồn C hữu cơ (Narayan et al., 2005). Lượng sinh khối khô, hàm lượng các sắc tố như chlorophyll và phycocyanin trong sinh khối tảo ở công thức đối chứng và các công thức thí nghiệm có bổ sung glycerol thải được trình bày ở hình 3. Có thể thấy sinh khối và hàm lượng sắc tố thay đổi đáng kể giữa các công thức và tảo sinh trưởng tốt nhất ở công thức với nguồn C gồm 2 g NaHCO₃/L và 2,5 mM glycerol thải (CT4).

Thành phần axit béo trong sinh khối tảo ở công thức đối chứng và CT4 tương tự nhau. Hai axit béo ALA (α -linoleic acid, C18:2 ω -6) và GLA (γ -linolenic acid; C18:3 ω -6) chiếm tới 36,15 và 33,45 % so với TFA ở công thức đối chứng và CT4, tương ứng (bảng 3). Các kết quả trên đã chứng minh việc sử dụng glycerol thải để nuôi trồng tảo *Schizochytrium* và *Spirulina* hoàn toàn khả thi.

Bảng 3. Hàm lượng axit béo (% so với tổng số axit béo) trong sinh khối *Spirulina platensis* BM ở công thức đối chứng và CT4

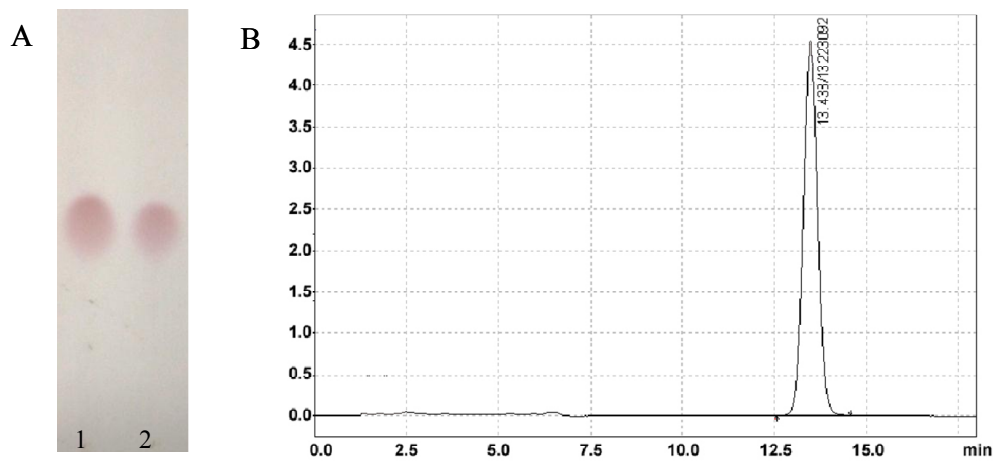
Thành phần	Hàm lượng axit béo (% so với axit béo tổng số)	
	Đối chứng	CT4
C16:0	44,02 ± 1,02	44,94 ± 1,14
C16:1ω-7	8,54 ± 0,15	8,63 ± 0,78
C18:0	2,01 ± 0,01	3,07 ± 0,01
C18:1ω-9	9,04 ± 0,86	9,61 ± 0,47
C18:2ω-6-t (ALA)	12,19 ± 0,75	11,34 ± 0,72
C18:3ω-6 (GLA)	23,96 ± 1,03	22,11 ± 1,12

Đối chứng- Môi trường chứa 16,8 g NaHCO₃; CT4: Môi trường chứa 2 g NaHCO₃ + 2,5 mM glycerol thải.



Hình 3. Ảnh hưởng của glycerol thải lên sinh khối và hàm lượng sắc tố của *Spirulina platensis* BM

Đối chứng: 16,8 g NaHCO₃; CT1: 16,8 g NaHCO₃ + 2,5 mM glycerol thải; CT2: 9 g NaHCO₃ + 2,5 mM glycerol thải; CT3: 4 g NaHCO₃ + 2,5 mM glycerol thải; CT4: 2 g NaHCO₃ + 2,5 mM glycerol thải; CT5: 2,5 mM glycerol thải



Hình 4. Sắc kí lớp mỏng (A) và sắc kí đồ squalene tinh sạch từ bã sinh khối *S. mangrovei* sau quá trình sản xuất biodiesel (B)

1: squalene chuẩn; 2: squalene tinh sạch từ bã sinh khối *S. mangrovei* sau quá trình sản xuất biodiesel.

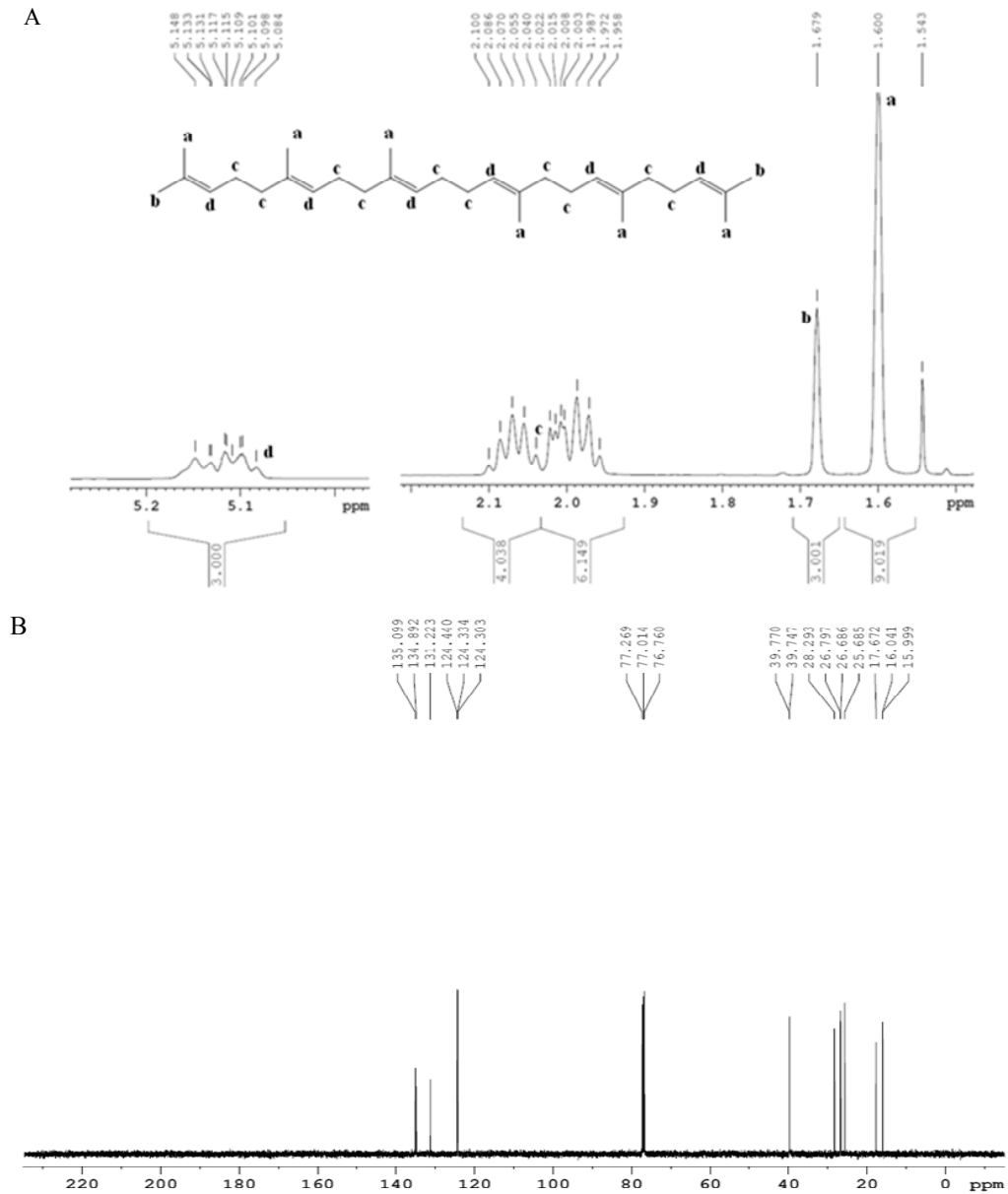
Tách chiết squalene từ bã sinh khối sau quá trình sản xuất biodiesel

Thách thức lớn nhất của việc sản xuất biodiesel từ vi tảo đó là sản phẩm tạo ra phải cạnh tranh được với giá thành của các nguyên

liệu truyền thống (dầu mỏ). Vì vậy, cần có các giải pháp nhằm giảm giá thành của biodiesel để có thể đưa sản phẩm vào đời sống. Các sản phẩm phụ có giá trị như PUFAs (EPA, DHA) đã được tận thu cùng với biodiesel tách từ sinh

khối *S. mangrovei*. Bên cạnh đó, glycerol thải từ quá trình sản xuất biodiesel được sử dụng như nguồn cacbon để nuôi trồng *S. mangrovei* và *Spirulina platensis*. Ngoài ra, còn có squalene, một chất có giá trị, được tách từ bã sinh khối sau quá trình sản xuất biodiesel. Giá trị kinh tế của squalene cũng sẽ giúp cho việc giảm chi phí cuối cùng của việc sản xuất biodiesel. Theo quy

trình tách chiết và xác định hàm lượng squalene đã được trình bày trong phương pháp nghiên cứu, chúng tôi xác định được hàm lượng chất này dao động khoảng $50,21-80,10 \pm 0,03$ mg/g bã sinh khối. Như vậy, có thể thấy phần lớn lượng squalene được tập trung trong bã sinh khối sau khi đã tách chiết biodiesel và PUFAs.



Hình 5. Phổ NMR của squalene tinh sạch từ bã sinh khối *S. mangrovei* sau quá trình sản xuất diesel sinh học. A: Phổ ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); B: Phổ ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃).

Cấu trúc của squalene tách chiết từ bã sinh khối tảo sau quá trình sản xuất biodiesel

Để xác định cấu trúc, squalene tách chiết từ bã sinh khối tảo sau khi sản xuất biodiesel được tinh sạch bằng sắc kí cột silicagel. Một số phân đoạn giàu squalene được phát hiện bằng TLC dựa trên chất chuẩn. Các phân đoạn này sau đó được tập trung lại và làm bay hơi dung môi thu lấy squalene. Kết quả thu được ở hình 4 cho thấy, squalene tách chiết được có độ tinh sạch cao và không bị tạp nhiễm. Cấu trúc của squalene đã tách chiết tiếp tục được khẳng định bằng những dữ liệu phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C (hình 5). Phổ ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) (hình 5A) cho thấy các nhóm methyl ở δ 1,60 (s, 18H) và δ 1,68 (s, 6H), các nhóm methylene ở δ 1,99-2,03 (m, 20H), và các tín hiệu nội sinh ở δ 5,084-5,148 (m, 6H). Phổ ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) (hình 5B) cho thấy carbon methyl ở δ 16,00; 16,04; 17,67; carbon methylene ở δ 25,685; 26,686; 26,797; 28,293; 39,747; 39,770 và các carbon có nối đôi ở δ 124,303; 124,334; 124,440; 131,223; 134,892; 135,099. Phổ NMR tương tự với phổ squalene chuẩn và thư viện khối phổ đã công bố (Pouchert & Behnke, 1993).

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu được trình bày nêu trên chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Phương pháp chuyển vị ester tại chỗ là phương pháp phù hợp, hiệu quả để sản xuất diesel sinh học từ vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium mangrovei*. Hiệu suất của quá trình sản xuất các axit béo dạng methyl ester (FAME) từ vi tảo này đạt 89,20% so với dầu tảo và 46,70% so với sinh khối tảo.

Biodiesel sản xuất được có 11/15 chỉ tiêu bao gồm khối lượng riêng ở 15°C, điểm chớp cháy cốc kín, hàm lượng nước và cặn, độ nhớt động học ở 40°C, tro sulphat, lưu huỳnh, độ ăn mòn đồng, trị số xêtan, cặn cacbon, trị số iot và các tính chất ngoại quan phù hợp với tiêu chuẩn Việt Nam đối với biodiesel B100.

Hàm lượng DHA trong phân đoạn UFAME chiếm 72,00% so với tổng số axit béo.

Lượng sinh khối và hàm lượng lipid tổng số

của *S. mangrovei* đạt cao nhất khi môi trường nuôi được bổ sung 50 g/L glycerol thái. Sinh khối tảo nuôi ở điều kiện này có thành phần phổ axit béo đơn giản hơn nhưng lại có thành phần DHA cao hơn (đạt 47,09% so với tổng số axit béo) so với công thức đối chứng chứa 30 g/L glucose.

Tảo *Spirulina platensis* BM sinh trưởng tốt nhất khi môi trường có 2 g/L NaHCO_3 và bổ sung 2,5 mM glycerol thái. Thành phần axit béo của sinh khối loài tảo này không có sự khác biệt đáng kể so với khi nuôi trồng trong môi trường chuẩn SOT.

Squalene tập trung chủ yếu ở bã sinh khối *S. mangrovei* sau quá trình sản xuất diesel sinh học với hàm lượng đạt 50,21-80,10 \pm 0,03 mg/g bã sinh khối. Cấu trúc của squalene đã tách chiết được khẳng định lại bởi những dữ liệu phổ cộng hưởng từ ^1H và ^{13}C .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adarme-Vega T. A., Lim D. K. Y., Timmins M., Vernen F., Li Y., Schenk P. M., 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb. Cell Fact.*, 11: 96.
- Ahmad A. L., Yasin N. H. M., Derek C. J. C., Lim J. K., 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 15(1): 584-593
- Atadashi I. M., Aroua M. K., Abdul A. Z., Sulaiman N., 2013. The effects of catalysts in biodiesel production: A review. *J. Ind. Eng. Chem.*, 19(1): 14-26.
- Bligh E. G., Dyer W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37(8): 911-917.
- Chi Z., Pyle D., Wen Z., Frear C., Chen S., 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.*, 42(11): 1537-1545.
- Chisti Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25(3): 294-306.
- Demirbas M. F., 2010. Microalgae as a feedstock for biodiesel. *Energy, Education,*

- Science and Technology, Part A: Energy Science and Research, 25: 31-43.
- Ehimen E. A., Sun Z. F., Carrington C. G., 2010. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89(3): 677- 684.
- Ethier S., Woisard K., Vaughan D., Wen Z., 2011. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresour. Technol.*, 102(1): 88-93.
- Haag A. L., 2007. Algae bloom again. *Nature*, 447: 520-521.
- Hong D. D., Anh H. T. L., Thu N. T. H., 2011. Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalgae *Schizochytrium mangrovei* PQ6 isolated from Phu Quoc Island, Kien Giang province, Vietnam. *J. Phycol.*, 47(4): 944-954.
- Đặng Diễm Hồng, Hoàng Minh Hiền, Nguyễn Đình Hưng, Hoàng Sỹ Nam, Hoàng Lan Anh, Ngô Hoài Thu, Đinh Khánh Chi, 2007. Nghiên cứu về quá trình sinh tổng hợp DHA từ các loài vi tảo biển dị dưỡng mới *Labyrinthula*, *Schizochytrium* và ứng dụng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 45(1B): 144-153.
- Jeon D. J., Yeom S. H., 2010. Two-step bioprocess employing whole cell and enzyme for economical biodiesel production. *Kor. J. Chem. Eng.*, 27(5): 1555-1559.
- Johnson M. B., Wen Z. Y., 2009. Production of biodiesel fuel from the microalgae *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy Fuel*, 23(10): 5179-5183.
- Lewis T. E., Nichols P. D., McMeekin T. A., 2001. Sterol and squalene content of a docosahexaenoic acid producing thraustochytrid: influence of culture age, temperature and dissolved oxygen. *Mar. Biotechnol.*, 3(5): 439-447.
- Đinh Thị Ngọc Mai, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Thị Thơm, Đặng Diễm Hồng, 2013. Bước đầu nghiên cứu squalene trong một số chủng vi tảo biển phân lập ở Việt Nam. *Tạp chí Sinh học*, 35(3): 333-341.
- Đinh Thị Ngọc Mai, Đinh Đức Hoàng, Lê Thị Thơm, 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.
- Narayan M. S., Manoj G. P., Vatcharavelu K., Bhagyalakshmi N., Mahadevaswamy M., 2005. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 56(7): 521- 528.
- Nergiz C., Celikkale D., 2011. The effect of consecutive steps of refining on squalene content of vegetable oils. *J. Food. Sci. Technol.*, 48(3): 382-385.
- Pouchert C. J., Behnke J., 1993. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FTNMR Spectra; Aldrich Chemical Co.: Milwaukee, WI, p46.
- Ngô Hoài Thu, Đặng Diễm Hồng, Aiba S., Kawata Y., 2007. Ứng dụng phương pháp thể mỡ để chuyển nạp gen vào tế bào của các loài vi tảo lam *Spirulina platensis*. *Tạp chí Sinh học*, 29(1): 70-75.
- TCVN 7717, 2007. Nhiên liệu diesel sinh học gốc (B100) Yêu cầu kỹ thuật.
- Wanasundara U. N., 2010. Process for separating saturated and unsaturated fatty acids. Patent US 2010/0305347 A1.

**BIOFUEL FROM VIETNAM HETEROTROPHIC MARINE MICROALGAE:
BIODIESEL AND SALVAGING CO-PRODUCTS (POLYUNSATURATED
FATTY ACIDS, GLYCEROL AND SQUALENE) DURING BIODIESEL
PRODUCING PROCESS**

**Dang Diem Hong^{1*}, Nguyen Cam Ha^{1,2}, Le Thi Thom^{1,2},
Luu Thi Tam¹, Hoang Thi Lan Anh¹, Ngo Thi Hoai Thu¹**

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

SUMMARY

In this paper, we present the results relating to producing biodiesel and valuable added co-products, such as polyunsaturated fatty acids, glycerol and squalene from Vietnam heterotrophic marine microalga, *Schizochytrium mangrovei*, which was isolated from Phu Quoc Island, Kien Giang province, Vietnam in 2006-2008. The productivity of fatty acid methyl esters (FAME) from this microalga resulted in a yield of 89.2% based on algal oil and 46.7% based on algal biomass. The saturated fatty acids-SFA (biodiesel) was separated from fraction enriched in unsaturated fatty acids-PUFAs by urea complexation method at 10°C. Almost parameters of obtained biodiesel meet Vietnam Biodiesel B100 Standard. Docosahexaenoic acid (C22:6 ω -3) in PUFA fraction reached up 72.00% of total fatty acid. Waste glycerol from biodiesel process can be used for cultivating *S. mangrovei* and *Spirulina platensis* BM. In spent biomass after biodiesel production process, squalene was detected approximately 50.21-80.10 \pm 0.03 mg/g of spent biomass. The structure of squalene in residues of the biodiesel process was confirmed from its nuclear magnetic resonance spectra. The obtained results indicated that the cost of producing biodiesel from microalgae can be reduced if we fully exploit valuable added co-products above besides biodiesel.

Keywords: *Schizochytrium mangrovei*, biodiesel, fatty acid methyl esters, glycerol, squalene.

Citation: Dang Diem Hong, Nguyen Cam Ha, Le Thi Thom, Luu Thi Tam, Hoang Thi Lan Anh, Ngo Thi Hoai Thu, 2017. Biofuel from Vietnam heterotrophic marine microalgae: biodiesel and salvaging co-products (polyunsaturated fatty acids, glycerol and squalene) during biodiesel producing process. Tap chi Sinh hoc, 39(1): 51-60. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.7129.

**Corresponding author:* ddhong60vn@yahoo.com

Received 22 September 2016, accepted 20 March 2017