

TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CÁC ACID BÉO KHÔNG BẢO HÒA TỪ SINH KHỐI VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG *SCHIZOCHYTRIUM MANGROVEI* PQ6

Hoàng Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Minh Thanh, Đặng Diễm Hồng

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Sử dụng một quy trình đơn giản và không đắt tiền gồm quá trình methyl hóa sinh khối khô, tạo phức với urea và làm lạnh liên tục, chúng tôi đã thành công trong việc tách chiết và làm sạch các acid béo không bão hòa đặc biệt là acid docosahexaenoic (DHA, C22:6n-3) và docosapentaenoic (DPA, C22:5n-6) từ sinh khối *Schizochytrium mangrovei* PQ6 được phân lập từ vùng biển huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang, năm 2006. Với tỷ lệ urea/acid béo là 5:2; nhiệt độ kết tinh trong phương pháp tạo phức với urea nằm trong khoảng 4 - 10°C trong 12 h, chúng tôi đã phân tách được acid béo tổng số thành hai phân đoạn riêng biệt: phân đoạn không tạo phức với urea (pha lỏng) và tạo phức với urea (pha rắn). Trong đó, phần lớn DHA và DPA nằm ở phân đoạn không tạo phức với urea (trên 85% và 13% tổng số acid béo của pha lỏng, tương ứng). Ngược lại, phân đoạn phản ứng với urea chứa chủ yếu là các acid béo bão hòa với acid palmitic chiếm trên 55% tổng số acid béo. Như vậy, quy trình này có thể coi là thích hợp để tách chiết và làm sạch DHA từ *S. mangrovei* PQ6 cho định hướng ứng dụng trong thực phẩm chức năng và dược phẩm.

Từ khóa: Acid béo không bão hòa mạch dài, docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, *Schizochytrium mangrovei* PQ6

MỞ ĐẦU

Trong điều kiện sống hiện nay, con người phải đối mặt với hàng loạt nguy cơ mắc các bệnh như tim mạch, mất trí nhớ hoặc ung thư mà một trong những nguyên nhân quan trọng đó là chế độ dinh dưỡng chưa phù hợp. Việc tìm ra những giải pháp nhằm cải thiện vấn đề nêu trên đang được thúc đẩy nghiên cứu. Trên thực tế, vai trò của docosahexaenoic (DHA, C22:6n-3), docosapentaenoic acid (DPA: 5n-6) và các acid béo không bão hòa mạch dài khác (LCPUFA) trong việc làm giảm các bệnh tim mạch như huyết áp cao, xơ vữa động mạch, đột quỵ, hay tắc nghẽn mạch máu, ngăn chặn sự rối loạn về tâm thần, cũng như điều trị một số bệnh ung thư đã được chỉ ra trong hàng trăm thí nghiệm *in vivo* và *in vitro* (Connor, 2000; Narayan *et al.*, 2006). Đặc biệt, DHA được xem như là nhân tố thiết yếu đối với sự phát triển của thần kinh và thị giác của trẻ nhỏ (Das, Fams, 2003). Tổ chức y tế thế giới, Hội dinh dưỡng Anh Quốc, Hội tiêu hóa và dinh dưỡng trẻ em châu Âu và Hội nghiên cứu về acid béo và lipid quốc tế cũng đã nhấn mạnh đến tầm quan trọng của DHA, đồng thời cũng đã khuyến cáo rằng LCPUFA nên có trong tất cả công thức thức ăn của trẻ nhỏ. Hiện nay, trên 50% công thức thức ăn cho trẻ nhỏ ở Mỹ đều chứa DHA (Wynn *et al.*, 2005).

Hiện nay, dầu cá là nguồn cung cấp chính DHA. Tuy nhiên, việc sử dụng dầu cá làm nguồn thức ăn

bổ sung bị giới hạn bởi các vấn đề liên quan tới mùi vị, cũng như mức độ ổn định oxy hóa thấp hoặc có thể bị nhiễm các kim loại nặng và các chất độc khác (Raghukumar, 2008). Ngoài ra, nguồn cung cấp này khó có thể đáp ứng nhu cầu về DHA ngày càng tăng do sự suy giảm của quần thể cá ở nhiều đại dương. Các vi tảo biển dị dưỡng có thể chứa một lượng lớn DHA và chúng được xem là nguồn sản xuất DHA đầy tiềm năng. Chúng có thể được nuôi cấy trong các hệ thống lên men truyền thống và dưới các điều kiện được kiểm soát, sẽ cho sản phẩm có chất lượng rất cao. Việc sản xuất sinh khối nhờ lên men hoàn toàn có thể tăng lên hay giảm đi tùy theo nhu cầu của thị trường. Thêm vào đó, sự lên men không phụ thuộc vào thời gian hay mùa (Mendes *et al.*, 2009; Raghukumar, 2008).

Vi vậy, việc sàng lọc được các loài vi tảo biển dị dưỡng cho sản xuất DHA là hết sức quan trọng. Trong số các loài vi tảo biển dị dưỡng, *Schizochytrium* được xem là đối tượng tiềm năng bởi hàm lượng lipid chiếm 70% trọng lượng khô và DHA chiếm đến 35% tổng số acid béo (Yaguchi, 1997; Ward, Singh, 2005). Thêm vào đó, sinh khối vi tảo này đặc biệt thích hợp cho quá trình tách chiết và tinh sạch LCPUFA, do chúng có thành phần rất ổn định; LCPUFA từ vi tảo nuôi cấy không có cholesterol, không bị nhiễm kim loại nặng hay polychlorobiphenyl (PCB)... và có mùi vị dễ chịu (Mendes, 2007; Raghukumar, 2008).

Mục đích của nghiên cứu này là đưa ra được quy trình tách chiết và tinh sạch DHA từ sinh khối vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium mangrovei* PQ6 được phân lập từ vùng biển thuộc huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang năm 2006 (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2008), cho phép thực hiện với một lượng lớn nguyên liệu với các thiết bị và điều kiện đơn giản cũng như chỉ sử dụng các dung môi được phép sử dụng trong thực phẩm và không đắt tiền như hexan và methanol. Các kết quả nghiên cứu theo hướng này sẽ là cơ sở khoa học cho việc mở rộng quy mô tách chiết, tinh sạch DHA, DPA từ sinh khối vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium* phân lập từ vùng biển Việt Nam theo định hướng ứng dụng chúng làm thực phẩm chức năng và được phẩm sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng tảo và điều kiện nuôi cấy

Schizochytrium mangrovei PQ6 nằm trong bộ chủng giống vi tảo biển dị dưỡng của phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, được phân lập từ vùng biển huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang năm 2006 (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2008), được giữ trên môi trường thạch GPY (0,2% glucose, 0,1% polypeptone, 0,05% cao nấm men, 1,5% agar, 1,5% NaCl). Chủng này được nuôi cấy trong bình lên men tự tạo với thể tích 30 l, môi trường M12 (9% glucose, 1% cao nấm men, 1,5% NaCl) ở 28°C. Sinh khối tảo được thu hoạch ở pha cân bằng (sau 160 h nuôi cấy) (Hoàng Thị Lan Anh *et al.*, 2008) bằng ly tâm ở 4000 rpm trong 10 phút và được bảo quản ở nhiệt độ < 0°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Tách chiết acid béo tổng số

Sinh khối *Schizochytrium* được thu bằng ly tâm và sấy khô ở 80 - 100°C trong 6 - 8 h. 10 g sinh khối khô *Schizochytrium* được methyl hóa với 100 ml dung dịch 10% HCl trong methanol và 30 ml dichloromethane. Hỗn hợp này được đặt ở 60°C trong 3 h. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung 10 ml dung dịch NaCl bão hòa và 30 ml n-hexane (Kumon *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 1995; Dang Diem Hong, Nakahara, 2008). Sau khi lắc đều hỗn hợp, để phân lớp và chiết lấy pha hexan, cô đuổi dung môi thu được acid béo tổng số.

Phân tách acid béo không bão hòa ra khỏi hỗn hợp acid béo tổng số

Bổ sung methanol và tinh thể urea vào lượng acid béo tổng số thu được tương ứng theo tỷ lệ 20:1

(v/w) và 5:2 (w/w). Hỗn hợp được đun nóng ở 60 - 65°C và lắc đều cho đến khi dung dịch trở nên trong. Phức hợp urea được làm lạnh ở nhiệt độ 4 - 10°C qua đêm để phân tách giữa phức hợp urea với các phân đoạn không tạo phức với urea xảy ra được hoàn toàn. Sau đó, hai phân đoạn tạo phức và không tạo phức với urea được tách riêng ra để phân tích thành phần và hàm lượng các acid béo bão hòa và không bão hòa (Medina *et al.*, 1995; Grima *et al.*, 1995; Mendes *et al.*, 2007; Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2007).

Phân tích thành phần và hàm lượng của các acid béo

Thành phần và hàm lượng của các acid béo được phân tích bằng máy sắc kí khí: HP-6890, ghép nối với Mass Selective Detector Agilent 5973; Cột: HP-5MS (0,25 mm × 30 m × 0,25 μ m); Khí mang He; Chương trình nhiệt độ: đặt nhiệt độ ban đầu 80°C, duy trì trong 1 phút. Sau đó, nhiệt độ được tăng 40°C /phút để đạt 150°C; Nhiệt độ này được duy trì trong 1 phút; Cuối cùng nhiệt độ được tăng 10°C/phút để đạt 260°C và duy trì ở nhiệt độ này trong 10 phút. Thư viện phổ khối: WILEY275.L và NIST 98.L theo tiêu chuẩn ISO/ FDIS 5590:1998, Cộng hòa liên bang Đức như đã mô tả (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2007), được tiến hành tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nuôi cấy thu sinh khối *Schizochytrium* giàu DHA cho thí nghiệm tách chiết acid béo

Sử dụng thiết bị và môi trường nuôi cấy như đã mô tả (Hoàng Thị Lan Anh *et al.*, 2008), chúng tôi tiến hành nuôi thu sinh khối *Schizochytrium* giàu DHA nhằm phục vụ cho thí nghiệm tách chiết sau đó. Sự thay đổi về mật độ tế bào, trọng lượng khô trong quá trình sinh trưởng; hàm lượng lipid tổng số, các acid béo bão hòa và không bão hòa (trong đó chú trọng đến DHA và DPA) tại thời điểm thu mẫu (160 h) được trình bày ở bảng 1.

Do chi phí cao nên việc phân tích hàm lượng lipid và các acid béo ở tất cả các thời điểm nuôi cấy là khó khăn. Thêm vào đó, theo rất nhiều công bố, tế bào tích lũy lipid cực đại vào giai đoạn cuối của phát triển hoặc pha cân bằng và thời gian để thu DHA tốt nhất vào khoảng 4 - 7 ngày nuôi cấy (Bajpai *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1996; Yaguchi *et al.*, 1997; Raghukumar, 2008) nên chúng tôi chỉ phân tích các thông số này từ thời điểm 96 - 160 h. Kết quả chỉ ra trên bảng 1 cho thấy, sau 144 h nuôi

cây, sinh trưởng của *Schizochytrium* bắt đầu đi vào pha cân bằng. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy từ 144 đến 160 h, sinh khối *Schizochytrium* thực tế không tăng nhiều (MĐTB đạt 153,27 triệu tế bào/ml so với 155,32 triệu tế bào/ml; TLK đạt 31,92 g/l so với 32,02 g/l ở thời điểm 144 và 160 h, tương ứng). Trong khi đó từ 96 lên 160 h, hàm lượng lipid tổng số trong sinh khối *Schizochytrium* tăng lên xấp xỉ 3 lần. Hàm lượng DHA (34,444% tổng số acid béo)

và DPA (8,389% tổng số acid béo) chiếm tới 42,833% tổng số acid béo ở thời điểm 160 h so với 21,10% tổng số acid béo ở thời điểm 96 h. Như vậy, hàm lượng DHA và DPA tăng lên 2 lần từ 96 h lên 160 h. Do vậy, chúng tôi đã thu sinh khối *Schizochytrium* tại thời điểm 160 h để bảo đảm thời gian nuôi trồng không quá dài (7 ngày nuôi cấy) và thu được nguyên liệu giàu DHA và DPA cho thí nghiệm tách chiết acid béo sau này.

Bảng 1. Sự thay đổi của mật độ tế bào, trọng lượng khô, hàm lượng lipid tổng số, tổng số acid béo bão hòa và không bão hòa, hàm lượng DHA và DPA của chủng PQ6 ở các giai đoạn nuôi cấy khác nhau trong bình lên men 30 l.

Thời gian nuôi cấy (h)	Mật độ tế bào ($\times 10^6$ TB/ml)	Trọng lượng khô (g/l)	Hàm lượng lipid tổng số (% trọng lượng tươi)	Hàm lượng DHA (% tổng số acid béo)	Hàm lượng DPA (% tổng số acid béo)	Tổng acid béo không bão hòa (% tổng số acid béo)	Tổng acid béo bão hòa (% tổng số acid béo)
0	2,56 ± 0,37	-	-	-	-	-	-
24	78,12 ± 0,28	12,81 ± 0,64	-	-	-	-	-
48	109,05 ± 0,64	25,22 ± 0,23	-	-	-	-	-
72	120,12 ± 1,07	28,21 ± 0,35	-	-	-	-	-
96 (*)	130,14 ± 0,67	29,40 ± 1,06	6,64	21,10	0	85,86	7,3
120	141,76 ± 0,45	30,56 ± 0,99	10,23	25,54	2,099	45,839	54,159
144	153,27 ± 1,24	31,92 ± 1,02	16,43	29,98	4,19	46,013	53,884
160	155,32 ± 0,74	32,02 ± 0,87	18,7	34,444	8,389	48,854	51,144

Ghi chú: - : không xác định; (*) : theo Hoàng Thị Lan Anh và đồng tác giả (2008).

Tách chiết acid béo từ sinh khối *Schizochytrium*

Sử dụng quy trình như đã mô tả ở phần trên, chúng tôi đã phân tách thành công hỗn hợp acid béo thành hai pha: pha rắn chứa chủ yếu các acid béo no và pha lỏng- chứa các acid béo không no. Thành phần acid béo của các pha lỏng và rắn được chỉ ra trong bảng 2, hình 1 và 2.

Kết quả chỉ ra trên bảng 2 cho thấy ở pha lỏng hoàn toàn chỉ chứa các acid béo không no có số carbon từ 18 đến 22 với DHA chiếm 85,207% tổng số acid béo. Trong khi đó, ở pha rắn chứa chủ yếu là acid béo bão hòa (62,273% tổng số acid béo), trong đó acid palmitic chiếm đến 55,87% tổng số acid béo. Tuy nhiên, trong pha rắn, các acid béo không bão hòa vẫn còn chiếm trên 38,721% tổng số acid béo. Trong đó, DHA chiếm 20,231% tổng số acid béo, DPA - 4,079% tổng số acid béo (Bảng 2).

Cơ sở của việc sử dụng urea để phân tách acid

béo bão hòa và không bão hòa là do các tinh thể urea có cấu trúc tứ giác kín với các rãnh có đường kính 5,67 angstrom. Khi có mặt các phân tử acid béo không phân nhánh mạch dài, các rãnh của phân tử urea được tạo nên đủ lớn để khớp với chuỗi acid béo và kết tinh trong một cấu trúc lục giác với các rãnh có đường kính 8 - 12 angstrom (Mendes *et al.*, 2007). Sự có mặt của các liên kết đôi trong chuỗi carbon làm tăng kích thước của phân tử và đồng thời lại làm giảm khả năng tạo phức của nó với urea. Chính vì vậy, các phân tử acid béo bão hòa hoặc chỉ có một nối đôi có khả năng tạo phức một cách dễ dàng với phân tử urea hơn so với các phân tử acid béo có 2 hay 3 nối đôi trở lên. Do vậy, trong phân đoạn không tạo phức với urea sẽ chỉ chiếm phần lớn các acid béo không bão hòa có nhiều hơn 1 nối đôi (Mendes *et al.*, 2007). Trong thí nghiệm của chúng tôi, ở phân đoạn không tạo phức với urea, DHA chiếm phần lớn (chiếm 85,207% tổng số acid béo của pha lỏng), sau đó là DPA (chiếm

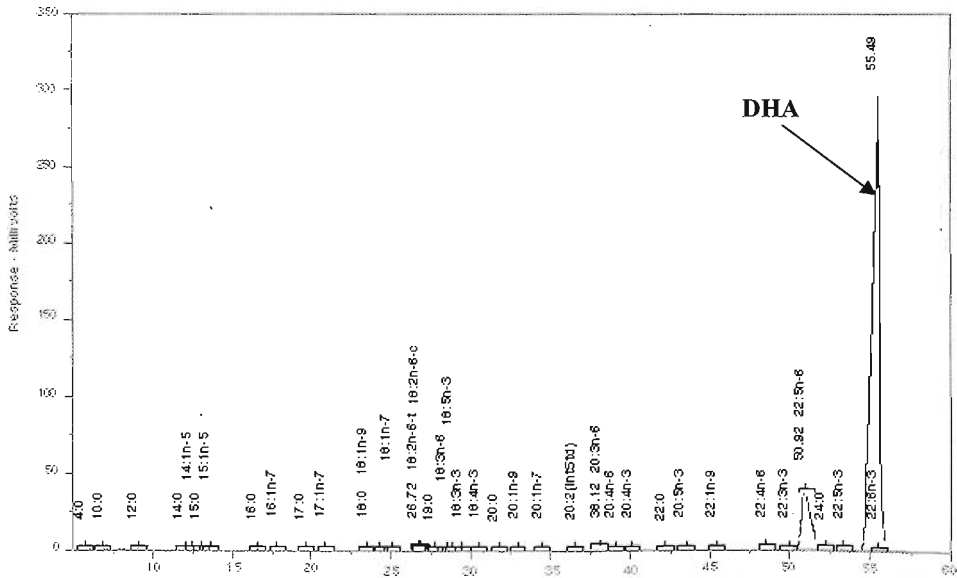
13,444% tổng số acid béo của pha lỏng). Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả công bố của Mendes và đồng tác giả (2007). Mặc dù quy trình tách chiết đơn giản, tiết kiệm nhiều hóa chất, hàm lượng DHA và DPA thu được trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi lại gần như tương đương (98,44% tổng số acid béo trong pha lỏng từ sinh khối vi tảo biến dị dưỡng *Schizochytrium* so với 99,25% tổng số acid

béo ở *Cryptocodinium cohnii* trong công bố của Mendes và đồng tác giả (2007).

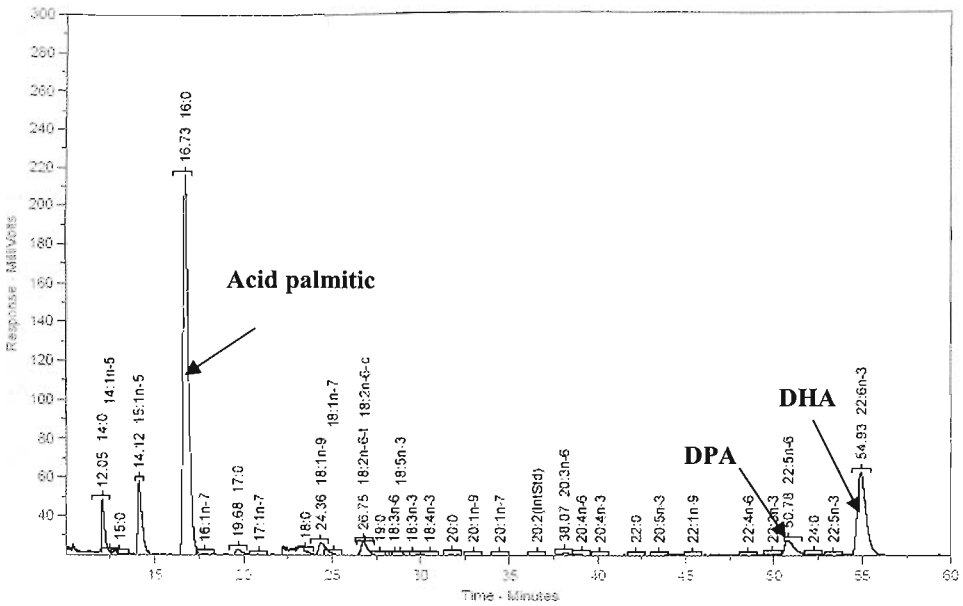
Nghiên cứu của Mendes và đồng tác giả (2007) đã cho thấy, thành phần acid béo trong phần tạo phức với urea và phần không tạo phức với urea là khác nhau, phụ thuộc vào tỷ lệ urea/acid béo và nhiệt độ kết tinh sử dụng.

Bảng 2. Thành phần các acid béo trong các pha lỏng và pha rắn.

Acid béo	Tên khoa học	Tên thường	Hàm lượng (% tổng số acid béo trong từng pha)	
			Pha lỏng	Pha rắn
C14:0	Tetradecanoic acid	Myristic acid	-	4,384
C15:1(n-5)	10-pentadecenoic acid	-	-	8,199
C16:0	Hexadecanoic acid	Palmitic acid	-	55,870
C17:0	Heptadecanoic acid	Margnic acid	-	1,023
C18:1(n-9)	9-Octadecenoic acid	Oleic acid	-	2,734
C18:2(n-6)	9,12-Octadecenoic acid	Linoleic acid	0,744	2,490
C20:3(n-6)	8,11,14-Eicosatrienoic acid	Dihomo- γ -linolenic acid	0,604	0,989
C22:5(n-6)	7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	DPA	13,444	4,079
C22:6(n-3)	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	DHA	85,207	20,231



Hình 1. Sắc ký đồ thành phần acid béo của pha lỏng.



Hình 2. Sắc ký đồ thành phần acid béo của pha rắn.

Quy trình cô đặc và tinh sạch DHA ở vi tảo biển điều dưỡng giàu DHA như *Cryptocodinium cohnii* đã được thực hiện với tỷ lệ urea/acid béo tối ưu là 7:2; nhiệt độ kết tinh là 4°C hoặc 8°C. Khi đó, hàm lượng DHA tinh sạch chiếm tới 99,2% tổng số acid béo. Wanasundara và Shahidi (1999) cũng đã tối ưu hóa điều kiện tách chiết và làm sạch các acid béo không bão hòa để đạt được hàm lượng cực đại EPA và DHA trong mỡ cá voi bằng phương pháp cô đặc có sử dụng urea. Kết quả là các acid béo ω -3 thu được chiếm đến 88,2% tổng số acid béo khi tỷ lệ urea/acid béo là 9:2 và thời gian tinh thể hóa là 24 h ở nhiệt độ -10°C. Tuy nhiên, để thu được DHA không còn lẫn với các acid béo omega-3 khác như EPA thường đòi hỏi tiếp theo phải tách phân đoạn giữa chúng dựa theo thời gian lưu trên cột tách của phương pháp HPLC. Grima và đồng tác giả (1995) cũng đã sử dụng phương pháp tạo phức với urea để cô đặc PUFA từ sinh khối vi tảo biển *Isochrysis galbana*, với tỷ lệ urea/acid béo là 4:1, ở 4°C. Sau khi tiếp tục phân tách bằng HPLC, phân đoạn EPA và DHA đạt độ tinh khiết tương ứng là 96,0 và 94,9%. Tuy nhiên, chúng ta có thể thấy rằng bước tinh sạch các acid béo omega-3 bằng HPLC không phải dễ dàng thực hiện trên quy mô lớn ngay cả ở các nước có nền kinh tế cao trên thế giới nói chung và đặc biệt ở Việt Nam nói riêng do chi phí cao.

Trong nghiên cứu của chúng tôi nêu trên, tỷ lệ urea/acid béo được sử dụng là 5:2, thời gian tinh thể hóa là 12 h ở nhiệt độ từ 4 đến 10°C. Khi đó, trong pha lỏng - phần không tạo phức với urea có chứa DHA và DPA đến 85,2% và 13,4% tổng số acid béo của pha lỏng, tương ứng. Bên cạnh DHA, DPA - là các acid béo có tác dụng sinh lý và được lý rất cao đối với cơ thể người và động vật nuôi, còn có hai loại PUFA khác là linoleic acid (C18:2n-6) và dihomo- γ -linolenic acid (C20:3n-6) chiếm một lượng nhỏ 0,604% và 0,744% tổng số acid béo trong pha lỏng. Cũng giống như DHA và DPA, hai loại acid béo này cũng đóng vai trò rất quan trọng đối với cơ thể người và động vật (Lunn, Theobald, 2006). Do vậy, chúng ta không nhất thiết phải tiến hành bước làm sạch DHA và DPA tiếp theo bằng HPLC trong điều kiện ở Việt Nam đối với pha lỏng. Thành phần và hàm lượng các acid béo trong pha lỏng thu được trong thí nghiệm này là hoàn toàn phù hợp cho việc ứng dụng chúng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi trồng thủy sản.

Tuy nhiên, đúng như dự đoán của chúng tôi, trong phân đoạn tạo phức với urea vẫn còn chứa một hàm lượng tương đối cao các PUFA mà chủ yếu là DHA và DPA (20,2% và 4,1% tổng số acid béo ở pha rắn, tương ứng). Do vậy, việc lặp lại các bước

tạo phức với urea nên được tiến hành đối với pha rắn để thu hồi lại DHA và DPA trong phân đoạn này, nhằm tăng hiệu suất tách chiết và thu nhận toàn bộ DHA và DPA trong sinh khối vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium*. Mặt khác, các acid béo bão hòa còn lại sau khi đã thu hồi tiếp DHA và DPA ở pha rắn, đặc biệt là các acid béo bão hòa có số lượng cacbon thấp thu được từ pha rắn - pha tạo phức với urea, lại rất thích hợp cho việc sử dụng chúng làm nguyên liệu để sản xuất diesel sinh học (Jang *et al.*, 2005; Dijkstra, 2006).

KẾT LUẬN

Với quy trình đơn giản, không đắt tiền, chúng tôi đã thành công trong việc tách chiết và tinh sạch acid béo không bão hòa DHA và DPA từ sinh khối khô *Schizochytrium mangrovei* PQ6 với hiệu suất tách chiết và tinh sạch DHA đạt 85,2% tổng số acid béo, DPA- 13,4% tổng số acid béo ở pha lỏng (pha không tạo phức với urea) cho định hướng sử dụng chúng làm thực phẩm chức năng và được phẩm cho người và bổ sung cho động vật trong nuôi trồng thủy sản sau này.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ một phần kinh phí của đề tài “Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất vi tảo biển làm nguyên liệu sản xuất diezen sinh học” cấp Bộ Công thương 2009 - 2011.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP (1991) Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J Am Oil Chem Soc* 68: 509-514.

Connor WE (2000) Importance of ω -3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 71 (Suppl.): 171S-175S.

Das UN, Fams MD (2003) Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutrition* 19: 62-65.

Dijkstra AJ (2006) Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils. *Eur J Lipid Sci Technol* 108 (3): 249-264.

Đặng Diễm Hồng, Hoàng Minh Hiền, Nguyễn Đình Hưng, Hoàng Sỹ Nam, Hoàng Thị 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.

Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Lan Anh, Ngô Hoài Thu (2008) Phân lập được vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium* giàu DHA ở vùng biển huyện đảo Phú Quốc. *Tạp chí Sinh học* 30(2): 50-55.

Dang Diem Hong, Nakahara T (2008) Comparison of labyrinthulid strains L4 and L75 by fatty acid composition and characteristics. *J Fish Sci Technol* 11(3): 149-158.

Grima E, Pérez J, Camacho F, Medina A, Giménez A, Alonso D (1995) The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: From strain selection to product purification. *Process Biochem* 30: 711-719.

Jang ES, Jung MY, Min DB (2005) Hydrogenation for low trans and high conjugated fatty acids. *Comp Rev Food Sci Saf* 4: 22-30.

Hoàng Thị Lan Anh, Lưu Thị Tâm, Nguyễn Thị Minh Thanh, Đinh Thị Ngọc Mai, Đặng Diễm Hồng (2008) Nuôi cấy chủng *Schizochytrium* sp. PQ6 trong các hệ thống lên men khác nhau. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4A): 705-711.

Kumon Y, Yokoyama R, Yokochi T, Honda D, Nakahara T (2003) A new labyrinthulid isolate, which solely produces n-6 docosapentaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 22-28.

Lunn L, Theobald HE (2006) The health effects of dietary unsaturated fatty acid. British Nutrition Foundation *Nutrition Bulletin* 31: 178-224.

Medina AR, Giménez A, Camacho F, Pérez JA, Grima E, Gómez A (1995) Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *J Am Oil Chem Soc* 72: 575-583.

Mendes A, da Silva TL, Reis A (2007) DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation. *Food Technol Biotechnol* 45(1): 38-44.

Mendes A, Reis A, Vasconcelos R, Guerra P, da Silva TL (2009) *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *J Appl Phycol* 21(2): 199-214.

Narayan B, Miyashita K, Hosakawa M (2006) Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) -A review. *Food Rev Int* 22: 291-307.

Raghukumar S (2008) Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Mar Biotechnol* 10: 631-640.

Singh A, Wilson S, Ward OP (1996) Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC20892. *J Microbiol Biotechnol* 12: 76-83.

Wanasundara U, Shahidi F (1999) Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by

urea complexation: Optimization of reaction conditions. *Food Chem* 65: 41-49.

Ward OP, Singh A (2005) Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem* 40: 3627-3652.

Wynn J, Behrens P, Sundararajan A, Hansen J, Apt K

(2005) Production of single cell oils by dinoflagellates. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) Single cell oils. AOCS press, Illinois: 86-98.

Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T (1997) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *J Am Oil Chem Soc* 74:1431-1434.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF UNSATURATED FATTY ACIDS FROM HETEROTROPHIC MARINE MICROALGAE *SCHIZOCHYTRIUM MANGROVEI* PQ6 BIOMASS

Hoang Thi Lan Anh, Nguyen Thi Minh Thanh, Dang Diem Hong*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Using a simple and inexpensive procedure involving methylation in dried biomass, urea complexation and winterization in a sequential way, we succeeded in extracting and purifying of unsaturated fatty acid, especially docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) and docosapentaenoic acid (DPA, C22:5n-6) from *Schizochytrium mangrovei* PQ6 biomass isolated in Phu Quoc island, Kien Giang province on 2006. With the urea/fatty acid ratio was 5:2 at crystallization temperature from 4 to 10°C for 12 hours, total fatty acid was divided into two fractions: non-urea complexing (liquid phase) and urea complexing fraction (solid phase). The non-urea complexing fraction contained a highest amount of DHA and DPA (85.2% and 13.4% total fatty acid of liquid phase, respectively). In the contrast, urea complexing fraction contained mainly saturated fatty acid including palmitic acid more than 55.9% of total fatty acid in this phase. For the reason, this procedure was appropriated for DHA, DPA extraction and purification from *S. mangrovei* PQ6 biomass.

Keywords: DHA, DPA, long-chain polyunsaturated fatty acid, *Schizochytrium mangrovei* PQ6

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37911059; Fax: 84-4-38363144; E-mail: ddhong60vn@yahoo.com