

## NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT LIPIT TỔNG SỐ VÀ AXÍT BÉO TỰ DO CHO SẢN XUẤT DẦU OMEGA-3 VÀ OMEGA-6 TỪ SINH KHỐI VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG *Schizochytrium mangrovei* PQ6

**Hoàng Thị Minh Hiền, Lưu Thị Tâm, Lê Thị Thơm, Nguyễn Cẩm Hà,  
Lương Hồng Hạnh, Hoàng Thị Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu, Đặng Diễm Hồng\***

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*ddhong60vn@yahoo.com

**TÓM TẮT:** Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu tách chiết lipit tổng số và axit béo tự do từ sinh khối vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium mangrovei* PQ6 phân lập tại Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang, Việt Nam để sản xuất dầu sinh học omega-3 và omega-6 giàu axit béo docosahexaenoic (C22:6  $\omega$ -3, DHA), eicosapentaenoic (C20:5 $\omega$ -3, EPA) và docosapentaenoic (C22:5  $\omega$ -3/ $\omega$ -6). Chủng PQ6 được nuôi cấy trong bình lên men 150 lít để cung cấp sinh khối cho quá trình tách chiết axit béo tự do. Mật độ tế bào, khối lượng khô và hàm lượng lipit tổng số đạt lần lượt là  $125,51 \times 10^6$  tế bào/ml, 30,31 g/l và 56% sinh khối khô sau 96 giờ lên men. Sinh khối tảo có hàm lượng DHA chiếm 32,98% so với tổng số axit béo. Dưới điều kiện tối ưu sử dụng dung môi n-hexane; nhiệt độ 70-75°C; khuấy trộn liên tục trong 4 giờ; nhiệt độ sấy sinh khối 80°C; độ ẩm sinh khối 0%, hàm lượng lipit tổng số tách chiết được tăng từ 56% lên trên 70% sinh khối khô. Điều kiện thủy phân dầu tảo thô để thu axit béo tự do bằng phương pháp hoá học với phản ứng xà phòng hóa có nồng độ NaOH là 1,8 N được pha trong cồn 70%; nhiệt độ phản ứng ở 70°C trong 3 giờ. Hàm lượng axit béo omega-3 và omega-6 chiếm đến 60,937% so với tổng số axit béo có trong thành phần axit béo tự do, trong đó, hàm lượng DHA và EPA đạt 22,438% và 14,304% so với tổng số axit béo. Hỗn hợp axit béo tự do thu được trong nghiên cứu này là nguyên liệu tốt cho sản xuất dầu sinh học giàu axit béo omega-3 và omega-6 để làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi.

*Từ khóa:* *Schizochytrium mangrovei* PQ6, axit béo không bão hoà, dầu sinh học.

### MỞ ĐẦU

Các axit béo không bão hoà mạch dài đa nối đôi (long chain polyunsaturated fatty acids-LCPUFAs) là thành phần quan trọng của cấu trúc và chức năng tế bào ở rất nhiều sinh vật. Các nghiên cứu lâm sàng tích lũy trên hai thập kỷ qua đã chứng minh rằng việc tiêu thụ lượng thấp các PUFA thuộc nhóm omega-3 làm gia tăng tỷ lệ mắc các bệnh tim mạch, ung thư, đột quỵ, tiểu đường, bệnh thần kinh [12, 14]. Trong các omega-3 LCPUFA, DHA (docosahexaenoic acid, C22:6  $\omega$ -3) và EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5  $\omega$ -3) có một tầm quan trọng đặc biệt đối với sự phát triển của não và mắt người, hỗ trợ điều trị ung thư tiền liệt tuyến, ung thư ruột, bệnh trầm cảm, giảm hàm lượng cholesterol trong máu; giảm triglyceride (TG), tăng cường chỉ số thông minh IQ ở trẻ nhỏ. Vì vậy, tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo việc bổ sung các axit béo này vào sữa cho trẻ nhỏ cũng như đưa ra mức yêu cầu tiêu thụ đối với người trưởng thành [10, 17].

Theo phương pháp truyền thống, dầu sinh

học, trong đó có dầu cá, chủ yếu được sản xuất từ gan các loài cá [5]. Nhu cầu về dầu cá dùng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi thủy hải sản ngày càng một tăng cao. EPA và DHA là các PUFA có mặt chủ yếu trong dầu cá. Tuy nhiên, trong dầu cá cũng chứa một số chất tạp nhiễm như dioxin, PCBs (polychlorinated biphenyls), một số các kim loại nặng; mùi vị thường khó chịu cùng với việc suy giảm sản lượng đánh bắt cá hiện nay đã và đang đặt ra cho các nhà nghiên cứu cần phải tìm kiếm các cơ thể sinh vật sinh dầu khác thay thế [11]. Trong các cơ thể sinh dầu như thực vật có dầu, nấm, tảo, vi tảo biển dị dưỡng thuộc chi *Schizochytrium* đang là đối tượng được quan tâm cho việc sản xuất thương mại LCPUFA có triển vọng [9] do hàm lượng lipit tổng số của *Schizochytrium* có thể đạt đến 70% sinh khối khô tế bào, trong đó, hàm lượng DHA chiếm trên 30-50% so với tổng số axit béo [7]. Nhiều sản phẩm có nguồn gốc từ sinh khối *Schizochytrium* spp. sấy phun khô đã được thương mại hoá như Algamac® 2000 và Algamac®3000, được sử dụng để làm giàu

DHA cho các đối tượng trong nuôi trồng thủy sản. Hiện nay, trên thế giới, thị trường thực phẩm chức năng có bán rất nhiều các loại dầu sinh học có nguồn gốc từ vi tảo, dành cho trẻ em hoặc người ăn kiêng như DHASCO®-S (từ *Schizochytrium*) của Martek hoặc DHA Flax Oil của Flora. Các sản phẩm thực phẩm chức năng có chứa axit béo omega-3 và omega-6 có mặt tại Việt Nam hầu như đều nhập ngoại và chủ yếu được sản xuất từ cá, còn từ thực vật vẫn còn rất hạn chế. Đây chính là những khó khăn cho sự phát triển các sản phẩm có chứa axit béo omega-3 và omega-6 ở Việt Nam. Trong bài báo này, chúng tôi xác định các điều kiện tối ưu cho quá trình tách chiết lipit tổng số và axit béo tự do từ sinh khối vi tảo biển dị dưỡng *S. mangrovei* PQ6 của Việt Nam để làm nguyên liệu cho sản xuất dầu sinh học giàu axit béo omega-3 và omega-6 làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng *S. mangrovei* PQ6 được phân lập tại Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang vào năm 2008 do phòng Công nghệ Tảo (Viện Công nghệ sinh học) cung cấp. Tảo được giữ trên đĩa môi trường GPY theo công bố của Hong et al. (2011) [7]. Giống cấp 1 cho lên men được nuôi cấy trong các bình tam giác 1 lít chứa 350 ml môi trường M1 theo công bố của Hong et al. (2011) [7]. Môi trường lên men (M12) sử dụng cho nuôi trồng ở bình 150 lít có thành phần gồm glucose 9%, cao nấm men công nghiệp 1% (do Viện Công nghệ Thực phẩm cung cấp), muối biển nhân tạo có hàm lượng NaCl là 1,5%.

Vi tảo *S. mangrovei* PQ6 được nuôi trồng trong bình lên men 150 ml với dịch nuôi là 100 ml môi trường M12 ở nhiệt độ 28°C; pH từ 6,5-7,5. Sau 96 h lên men, dịch tảo được ly tâm ở 4000 vòng/phút (v/p) trong 10 phút để thu sinh khối. Sinh khối tảo tươi được sấy khô ở nhiệt độ 70-80°C, đóng gói trong các túi nylông được hàn kín và đặt trong bình hút ẩm, tránh ánh sáng trực tiếp hoặc cất giữ trong tủ -20°C cho đến khi được sử dụng làm nguyên liệu để tách chiết lipit tổng số và axit béo tự do.

Sinh trưởng của tế bào tảo đánh giá thông qua mật độ tế bào được đếm bằng buồng đếm

Burker-Turk (Đức) hoặc sinh khối khô (SKK, g/l) theo công bố của Hong et al. (2011) [7].

Hàm lượng lipit tổng số được xác định bằng phương pháp của Bligh & Dyer (1959) [2] có một số cải tiến phù hợp với điều kiện của Việt Nam [7]: 100 gam sinh khối vi tảo *S. mangrovei* PQ6 được bổ sung thêm nước cất, cất thủy tinh và nghiền mịn bằng máy xay sinh tố. Bổ sung thêm dung môi vào sinh khối, hỗn hợp phản ứng được đảo trộn, đun nóng và duy trì ở một nhiệt độ nhất định bằng máy khuấy từ gia nhiệt. Sau thời gian phản ứng, hỗn hợp được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Tiến hành ly tâm hỗn hợp ở 4.000 v/p trong 10 phút. Thu lớp dung môi phía trên chứa lipit và loại bỏ dung môi bằng máy cô quay chân không để thu sản phẩm lipit, lipit tổng số thu được được lưu giữ trong chai thủy tinh đầy và màu nâu và bảo quản ở nhiệt độ 4-5°C.

Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi khác nhau như: n-hexan, chloroform hoặc petroleum ether; nhiệt độ và thời gian phản ứng; điều kiện khuấy trộn; số lần chiết; tỷ lệ sinh khối/dung môi và nhiệt độ sấy sinh khối lên hiệu suất tách lipit tổng số từ sinh khối tảo *S. mangrovei* PQ6. Dải nhiệt độ phản ứng được khảo sát là 0, 30, 50 và 80°C. Thời gian phản ứng thay đổi từ 1, 3, 4 và 5 giờ. Các điều kiện khuấy trộn hỗn hợp phản ứng gồm: không khuấy trộn, khuấy trộn liên tục và gián đoạn. Sinh khối được tách chiết 1, 2 hoặc 3 lần, tỷ lệ sinh khối/dung môi được lựa chọn cho thí nghiệm là 1:8, 1:10 và 1:12, nhiệt độ sấy sinh khối được khảo sát là 60, 70, 80 và 90°C. Hỗn hợp phản ứng được thực hiện với 100 g sinh khối khô và theo nguyên tắc khi nghiên cứu ảnh hưởng của một yếu tố nào đó thí nghiệm đều được tiến hành với tất cả các thông số còn lại được giữ nguyên. Sau khi đã lựa chọn được giá trị thích hợp của yếu tố đã được nghiên cứu, giá trị đó được cố định trong các thí nghiệm tiếp theo để khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố còn lại.

Hàm lượng lipit tổng số (% SKK) =  $(m_2 - m_1) \times 100\%$ . Trong đó,  $m_2$  là khối lượng lipit thu được,  $m_1$  là khối lượng sinh khối khô đem tách. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hiệu suất tách lipit tổng số được tính theo công thức:  $X = [(m_1 \times 100) / m_2] (\%)$ .

Trong đó, X là hiệu suất tách lipid tổng số (%);  $m_1$  là khối lượng lipid thu được sau khi tách (gr);  $m_2$  là khối lượng nguyên liệu sử dụng để tách lipid (gr).

*Tách chiết axit béo tự do từ lipid tổng số (hay gọi là dầu thô) bằng phương pháp hóa học*

Lipid tổng số (hay còn gọi là dầu thô) được xà phòng hoá bằng dung dịch NaOH (nồng độ từ 1N đến 2,5 N) pha trong cồn 70%. Hỗn hợp được khuấy từ gia nhiệt ở 70°C trong 3 giờ. Sau phản ứng, dung dịch muối NaCl 3% được bổ sung vào hỗn hợp xà phòng hoá và các chất không xà phòng hóa được tách ra khỏi hỗn hợp bằng li tâm ở 4000 v/p trong 40 phút. Phần xà phòng hoá được axit hoá bằng dung dịch HCl đến pH = 2. Sau đó, các axit béo tự do được tách ra bằng dung môi n-hexan. Lớp dung môi n-hexan có chứa các axit béo tự do (FFA) được làm khô bằng muối  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  và loại bỏ dung môi n-hexan bằng máy cô quay chân không ở 70°C.

Hiệu suất thủy phân dầu thô tảo được tính theo công thức sau:  $H (\%) = (m \times 100)/M$ . Trong đó, H là hiệu suất thủy phân dầu thô (%); m là khối lượng axit béo tự do thu được sau khi thủy phân dầu thô (g); M là khối lượng dầu tảo thô đem thủy phân.

Thành phần và hàm lượng axit béo trong sinh khối vi tảo và FFA được phân tích bằng máy sắc kí khí HP-6890, ghép nối với Mass Selective Detector Agilent 5973; cột: HP-5MS

(0,25 m × 30 m × 0,25 mm); khí mang He; chương trình nhiệt độ: 80 (1 phút)-40/phút-150 (1 phút)-10/phút-260° (10 phút). Thư viện phổ khối: WILEY275. L và NIST 98. L theo tiêu chuẩn ISO/ FDIS 5590:1998, LB Đức và theo mô tả trong công trình của Đặng Diễm Hồng và nnk. (2007) [8] được tiến hành tại Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA ở mức ý nghĩa  $p \leq 0,05$ .

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Sinh trưởng và thành phần axit béo của *S. mangrovei* PQ6 nuôi trồng trong bình lên men 150 lít

Để có thể sản xuất được dầu sinh học giàu axit béo omega-3 và omega-6 (EPA, DHA và DPA) có chất lượng tốt, điều kiện đầu tiên là chủng giống vi tảo phải có tốc độ sinh trưởng, hàm lượng lipid tổng số và PUFAs cao. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, mật độ tế bào (MDTB) của chủng PQ6 tăng nhanh từ 0-24 giờ lên men ( $1,70 \times 10^6$  TB/ml tăng lên  $49,50 \times 10^6$  TB/ml). MDTB đạt cực đại  $125,51 \times 10^6$  TB/ml sau 96 giờ nuôi cấy. Sinh khối khô và hàm lượng lipid cũng đồng thời tăng dần theo thời gian và đạt cực đại là 30,31 g/l và 56% sinh khối khô sau 96 giờ, tương ứng.

*Bảng 1.* Sinh trưởng và hàm lượng lipid tổng số của chủng *S. mangrovei* PQ6 lên men trong bình 150L

Thời gian nuôi cấy (h)	Mật độ tế bào ( $\times 10^6$ TB/ml)	Sinh khối khô (g/l)	Hàm lượng lipid (% SKK)
0	$1,70 \pm 0,37$	-	-
8	$15,21 \pm 0,41$	$3,67 \pm 0,08$	$11,43 \pm 0,09$
12	$28,16 \pm 0,53$	$7,54 \pm 0,16$	$20,01 \pm 0,26$
24	$49,50 \pm 0,68$	$15,86 \pm 0,34$	$27,09 \pm 0,23$
48	$96,15 \pm 0,64$	$26,97 \pm 0,23$	$48,78 \pm 0,19$
72	$112,57 \pm 1,07$	$29,09 \pm 0,35$	$62,88 \pm 0,25$
96	$125,51 \pm 0,67$	$30,31 \pm 0,26$	$70,56 \pm 0,38$
120	$123,56 \pm 0,84$	$29,37 \pm 0,21$	$69,63 \pm 0,33$

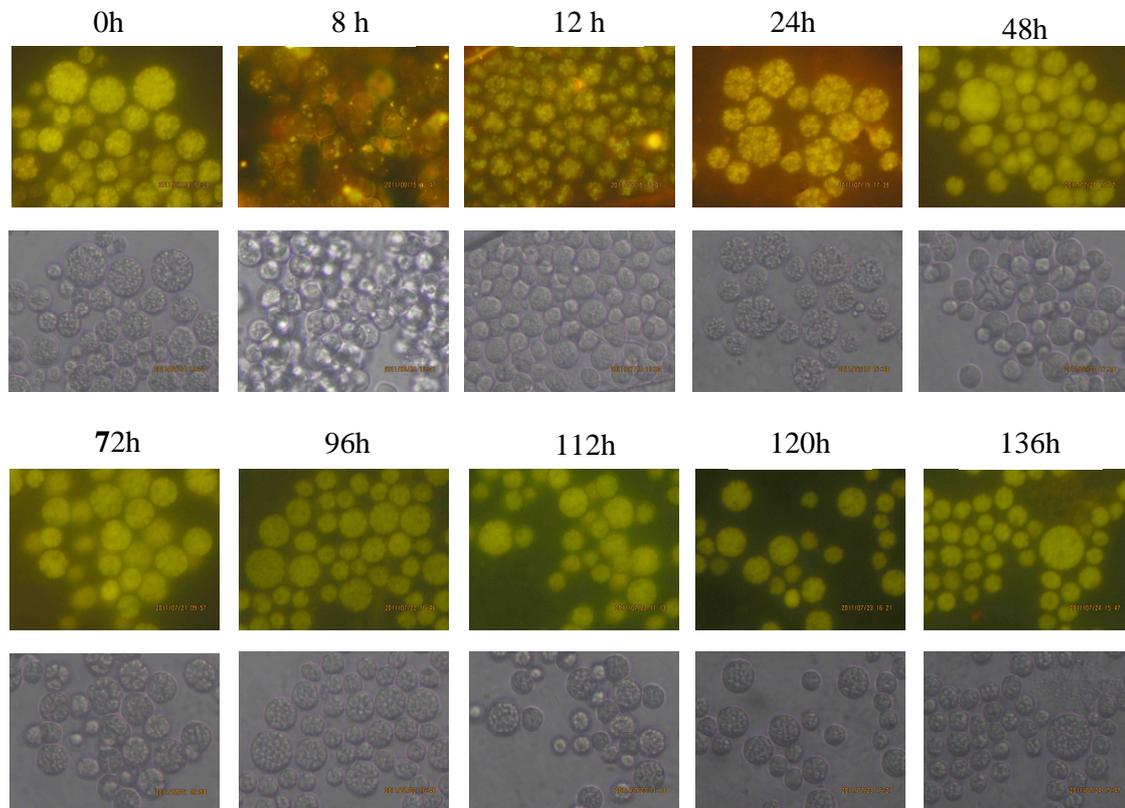
(-). không xác định; SKK. sinh khối khô; TB. tế bào.

Kết quả nhuộm lipid trung tính trong tế bào tảo bằng Nile Red cũng phù hợp với hàm lượng

lipid trong sinh khối tảo (hình 1). Sau 96 giờ nuôi cấy, quá trình tổng hợp lipid trong tế bào

tảo tăng cao nhất, lúc này các hạt lipid chiếm đầy toàn bộ bên trong tế bào. Chính vì vậy, sau 96 giờ lên men, sinh khối chủng PQ6 thu được

hoàn toàn phù hợp làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tối ưu tách chiết lipid tổng số và axit béo tự do.



Hình 1. Ảnh chụp tế bào chủng PQ6 nuôi ở bình lên men 150 lít dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi huỳnh quang sau khi nhuộm Nile Red với độ phóng đại 1.500 lần

Thành phần và hàm lượng axit béo trong sinh khối chủng PQ6 nuôi trồng được ở bình lên men 150 lít đã được phân tích bằng GC (bảng 2). Kết quả nghiên cứu được chỉ ra trên bảng 2 đã cho thấy, DHA chiếm 32,98% so với tổng số axit béo - TFA và axit palmitic -55,14% so với TFA là thành phần chính trong axit béo, hàm lượng các axit béo no và không no chiếm 60,00 % và 39,89% so với TFA. Khi so sánh với các chủng tiềm năng trên thế giới hiện nay như *Thraustochytrium* spp. có hàm lượng DHA chiếm từ 38,5% đến 59,5% so với TFA) [3], *Schizochytrium* sp. SR21 và *Ulkenia* sp. SAM 2179 có DHA chiếm từ 30,5% đến 46,2% so với TFA) [15, 18] thì sinh khối chủng PQ6 có hàm lượng DHA rất phù hợp làm nguyên liệu cho

việc sản xuất dầu sinh học giàu axit béo omega-3 và omega-6.

#### **Nghiên cứu ảnh hưởng của các tác nhân khác nhau lên hiệu suất tách chiết lipid từ sinh khối *S. mangrovei* PQ6**

Trong công nghệ khai thác dầu sinh học từ vi tảo hiện nay, người ta thường sử dụng các phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ, enzyme hoặc là trích ly với CO<sub>2</sub> siêu tới hạn với những ưu nhược điểm riêng của chúng [1]. Thực tế sản xuất cho thấy, khai thác dầu bằng phương pháp chiết đem lại hiệu quả kinh tế cao, được nhiều nước trên thế giới áp dụng [4, 16]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dung môi hữu cơ để tách chiết lipid tổng số (hay còn gọi là dầu thô) từ sinh khối chủng PQ6 có hiệu

suất cao và chất lượng tốt. Trước tiên cần phải lựa chọn dung môi thích hợp cũng như cần xác định được các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình

tách chiết như nhiệt độ, thời gian, điều kiện khuấy trộn, số lần tách chiết, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi.

**Bảng 2.** Thành phần và hàm lượng axit béo trong sinh khối của chủng PQ6 được nuôi trồng trong bình lên men 150 L

STT	Axit béo	Tên khoa học	Tên thường	Hàm lượng (% so với tổng số axit béo)
1	C10:0	Decanoic acid	Capric	0,04
2	C12:0	Dodecanoic acid	Lauric	1,87
3	C14:1(n-5)	9-Tetradecenoic acid	-	3,08
4	C15:0	Pentadecanoic acid	-	0,10
5	C16:0	Hexadecanoic acid	Palmitic	55,14
6	C18:0	Octadecanoic acid	Stearic	2,56
7	C18:1(n-7)	11-octadecenoic acid	Vaccenic	1,53
8	C18:2(n-6)	9,12-octadecadienoic acid	Linoleic	0,08
9	C19:0	Nonadecanoic acid	-	1,21
10	C19:1(n-9)	10-nonadecenoic acid	-	0,02
11	C18:4(n-3)	6,9,12,15-octadecatetraenoic acid	-	0,05
12	C20:0	Eicosanoic acid	Arachidic	0,12
13	C20:3(n-6)	8,11,14-eicosatrienoic acid	-	0,29
14	C20:4(n-6)	5,8,11,14-eicosatetraenoic acid	Arachidonic	0,23
15	C20:4(n-3)	8,11,14,17-eicosatetraenoic acid	-	0,57
16	C22:0	Docosanoic acid	Behonic	0,37
17	C20:5(n-3)	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	EPA	0,67
18	C20:4(n-6)	5,8,11,14-eicosatetraenoic acid	Arachidonic	0,39
19	C24:0	Eicosanoic acid	Lignoceric	18,72
20	C22:6(n-3)	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	<b>DHA</b>	<b>32,98</b>
Loại khác				0,12
<b>Tổng các axit béo no</b>				<b>60,00</b>
<b>Tổng các axit béo không no đa nối đôi</b>				<b>39,89</b>

#### *Ảnh hưởng của dung môi*

Nhằm mục đích nâng cao hiệu quả tách chiết lipid tổng số từ sinh khối tảo, chúng tôi lựa chọn 3 loại dung môi là n-hexan, chloroform và petroleum ether. Kết quả ở hình 2A cho thấy, hiệu suất tách chiết lipid tổng số với các dung môi chloroform, n-hexan và petroleum ether tương ứng là 61,1%, 60,1% và 51,8%, tuy nhiên, trong sản xuất công nghiệp thì khả năng thu hồi triệt để chloroform khó hơn so với n-hexan, ở đây, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hàm lượng lipid tổng số tách chiết được giữa hai loại dung môi này, vì vậy, chúng tôi lựa chọn n-hexan như là dung môi tối ưu cho tách chiết

lipid tổng số ở các thí nghiệm tiếp theo.

#### *Ảnh hưởng của nhiệt độ*

Sinh khối tảo được chiết trong dung môi n-hexan dưới nhiều điều kiện nhiệt độ khác nhau (50-55, 60-65 và 70-75°C) (hình 2B), kết quả ở hình 2B cho thấy, hiệu suất tách chiết lipid tăng khi nhiệt độ tăng. Ở 70-75°C, hiệu suất tách chiết lipid đạt mức cao nhất là 68,2%, chính vì vậy, chúng tôi chọn nhiệt độ từ 70-75°C cho các thí nghiệm tiếp sau.

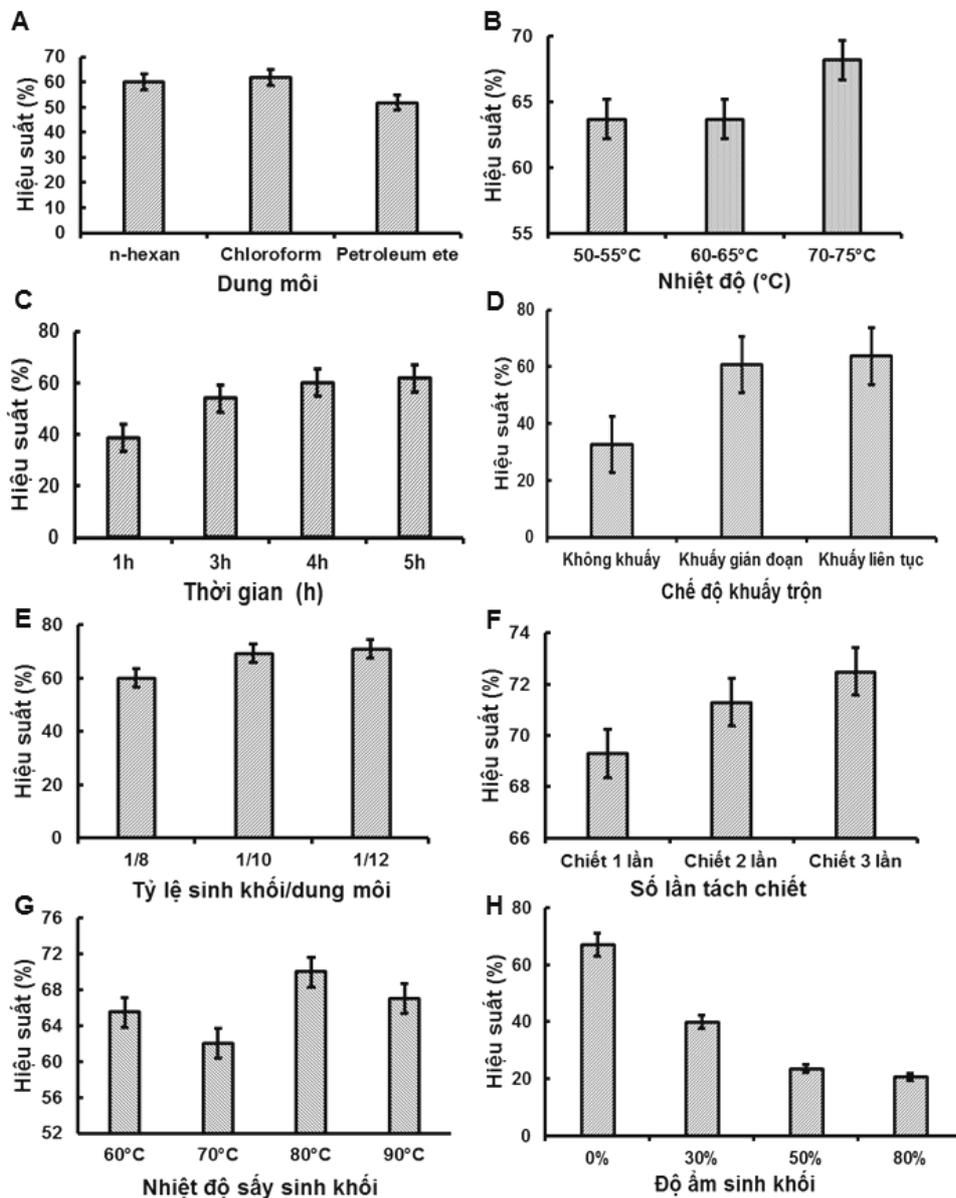
#### *Ảnh hưởng của thời gian chiết*

Sinh khối chủng PQ6 được chiết trong n-hexan ở nhiệt độ 70-75°C, thời gian mỗi lần

chiết được thay đổi từ 1, 2, 3, 4 và 5 giờ (hình 2C), kết quả ở hình 2C cho thấy, hiệu suất tách chiết lipid tăng dần khi tăng thời gian chiết. Sau 4 đến 5 giờ, hiệu suất tách chiết lipid thu được đạt cao nhất (> 60%) và sự sai khác về hiệu suất

không đáng kể ở hai khoảng thời gian này. Vì vậy, để tiết kiệm chi phí thì thời gian tách chiết 4 giờ được lựa chọn để tách dầu ở qui mô lớn.

#### Ảnh hưởng của điều kiện khuấy trộn



Hình 2. Ảnh hưởng của các điều kiện như dung môi (A), nhiệt độ (B), thời gian (C), điều kiện khuấy trộn (D), số lần tách chiết (E), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (F), và nhiệt độ sấy sinh khối (G) và độ ẩm sinh khối (H) lên hiệu suất tách chiết lipid từ sinh khối *S. mangrovei* PQ6.

Nghiên cứu được tiến hành trong ba điều kiện: không khuấy trộn, khuấy trộn gián đoạn

(1 giờ khuấy, 1 giờ ngừng) và khuấy trộn liên tục. Mỗi tương quan giữa chế độ khuấy và

lượng lipid thu được (ở điều kiện tỷ lệ dung môi : sinh khối là 10:1, nhiệt độ 70-75°C, thời gian chiết 4 giờ) được thể hiện ở hình 2D. Các kết quả nghiên cứu thu được đã cho thấy, hiệu quả tách lipid tăng lên đáng kể khi tảo được tách chiết trong dung môi dưới điều kiện khuấy trộn liên tục (63,7% so với 32,5% khi không khuấy trộn), như vậy, sự khuấy trộn cần thiết để tăng cường quá trình phản ứng. Mục đích của việc khuấy trộn này là để ngăn chặn sự ngưng kết cục bộ và giúp sinh khối tảo được tiếp xúc một cách đầy đủ với dung môi chiết.

#### *Ảnh hưởng của số lần tách chiết*

Sinh khối chủng PQ6 được chiết từ 1, 2 và 3 lần trong dung môi n-hexan, khuấy trộn liên tục trong vòng 4 giờ ở nhiệt độ 70-75°C (hình 2E). Kết quả ở hình 2E cho thấy, số lần tách chiết càng nhiều, hiệu suất tách chiết lipid càng tăng cao, nhưng so với tách chiết một lần mức tăng lại không đáng kể, 2% khi tách chiết 2 lần và 3,2% khi tách chiết 3 lần. Khi so sánh với lượng hóa chất sử dụng cho các lần tách chiết (tăng gấp 2 và 3 lần so với công thức tách chiết 1 lần) thì lượng lipid tăng không đáng kể. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn điều kiện tách chiết 1 lần cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### *Ảnh hưởng của tỷ lệ sinh khối tảo và dung môi*

Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi có ảnh hưởng không nhỏ lên quá trình tách chiết lipid tổng số [6]. Các tỷ lệ giữa sinh khối tảo và dung môi được nghiên cứu là 1:8, 1:10 và 1:12, kết quả ở hình 2F cho thấy, với tỷ lệ 1:8, hiệu suất tách chiết lipid chỉ đạt được khoảng 60%, khi tăng tỷ lệ này lên 1:10 và 1:12, hiệu suất tách chiết lipid tăng lên đáng kể, tương ứng là 69,3% và 71%. Vì vậy, trong các thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi lựa chọn tỷ lệ sinh khối/dung môi 1:10 để tiết kiệm dung môi.

#### *Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy sinh khối tảo*

Sinh khối tảo trước khi được tách lipid tổng số cần qua công đoạn sơ chế nhằm nâng cao hiệu suất tách chiết [4, 6]. Để tránh gây tổn thất cũng như làm biến đổi các thành phần trong nguyên liệu, sinh khối tảo *S. mangrovei* PQ6 sau khi thu hoạch sẽ được sấy ở các nhiệt độ 60, 70, 80 và 90°C, kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hiệu suất tách lipid được trình bày ở

hình 2G. Kết quả cho thấy, nhiệt độ sấy thích hợp cho quá trình tách chiết lipid từ tảo là 80°C vì ở nhiệt độ này hiệu suất tách lipid đạt cao nhất, trên 70%, khi nhiệt độ sấy cao hơn, nguyên liệu quá khô làm giảm hiệu suất tách chiết và chất lượng lipid thu được. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi tăng nhiệt độ sấy lên 90°C, hiệu suất tách chiết lipid giảm hơn 5% so với ở 80°C. Vì vậy, để thu được hàm lượng dầu tách chiết được cao nhất, đồng thời tiết kiệm được năng lượng sử dụng trong quá trình sấy, nhiệt độ sấy sinh khối thích hợp là 80°C.

#### *Ảnh hưởng của độ ẩm sinh khối*

Sinh khối tảo ở các độ ẩm 0, 30, 50, 80% được sử dụng để tách chiết lipid tổng số theo điều kiện tối ưu với các thông số như: dung môi n-hexan, tỷ lệ dung môi: sinh khối bằng 10:1, nhiệt độ 70-75°C, khuấy liên tục trong thời gian chiết 4 giờ (hình 2H), kết quả cho thấy, khi độ ẩm sinh khối càng cao, hiệu suất tách lipid càng giảm, cụ thể, hàm lượng lipid thu được giảm từ 67 xuống 20% SKK khi độ ẩm sinh khối tăng từ 0-80%. Điều này cho thấy, trong thí nghiệm tách chiết lipid, hàm lượng lipid thu được phụ thuộc vào khối lượng thực sinh khối đem tách chiết, để nâng cao hiệu suất tách chiết lipid cần sấy sinh khối tảo đến khối lượng không đổi.

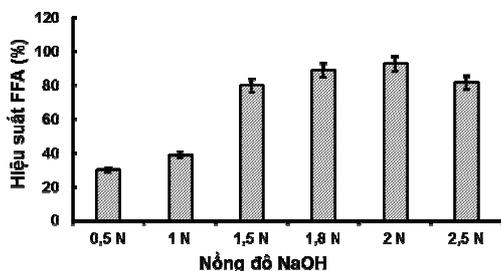
Công nghệ tách chiết hỗn hợp axit béo omega-3 và omega-6 LCPUFA từ axit béo tự do động vật và thực vật được ứng dụng trên thế giới chủ yếu qua 2 công đoạn: thủy phân axit béo tự do thực vật/động vật và làm giàu hỗn hợp axit béo omega-3 và omega-6 từ FFA thu được [13].

#### **Tối ưu quá trình thủy phân dầu thô tảo bằng phương pháp hóa học**

Thủy phân dầu tảo thô là quá trình nhằm thu được hỗn hợp các axit béo ở dạng tự do, tạo điều kiện thuận lợi cho công đoạn tách các axit béo no và axit béo không no một nối đôi ra khỏi hỗn hợp các PUFA omega-3 và omega-6. Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của một số tác nhân vật lý và hóa học lên hiệu suất của quá trình thủy phân dầu thô tảo đã được nghiên cứu nhằm xác định điều kiện tối ưu cho phép thủy phân được lượng axit béo ở dạng tự do lớn nhất dùng làm nguyên liệu cho tách dầu sinh học giàu axit béo

omega-3/omega-6 (EPA, DHA, DPA) trong điều kiện phòng thí nghiệm.

*Ảnh hưởng của nồng độ NaOH trong phản ứng xà phòng hóa*



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH lên hiệu suất thủy phân dầu tảo thô *S. mangrovei* PQ6

Nồng độ NaOH được sử dụng trong thí nghiệm lần lượt là 1, 1,5, 1,8, 2 và 2,5 N được pha trong cồn 70%, phản ứng xà phòng hóa xảy ra ở điều kiện nhiệt độ 70°C trong 3 giờ (hình 3).

Kết quả về mối tương quan giữa nồng độ NaOH và hiệu suất thủy phân dầu tảo được

thể hiện ở hình 3 cho thấy, nồng độ NaOH ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất thủy phân dầu tảo thô. Ở nồng độ NaOH thấp (0,5-1N), phản ứng xà phòng hóa xảy ra không hoàn toàn, hiệu suất thủy phân dầu tảo thô không cao, chỉ đạt 30-38,7% khối lượng dầu, khi tăng lượng NaOH lên từ 1,5 đến 2N, hiệu suất thủy phân tăng mạnh và đạt giá trị 80-92% khối lượng dầu tảo. Tuy nhiên, khi nồng độ NaOH cao hơn và bằng 2,5N, hỗn hợp xà phòng hóa bị đông đặc nhanh sau 15 phút phản ứng, điều này ảnh hưởng đến tốc độ khuấy sục mẫu, do đó hiệu suất thủy phân dầu tảo lại không cao. Hàm lượng axit béo tự do sau quá trình thủy phân đạt giá trị cao nhất là 92,6% khối lượng dầu ở công thức NaOH 2N (tương đương với 24 g NaOH cho 100 g dầu tảo). Phân tích thống kê ANOVA ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$  đã cho thấy sự sai khác không đáng kể về hàm lượng axit béo tự do thu được giữa 2 công thức có hàm lượng NaOH 1,8 và 2N. Vì vậy, để đảm bảo phản ứng xà phòng hóa xảy ra hoàn toàn và tăng hiệu suất thủy phân dầu tảo, nồng độ NaOH là 1,8N (tương đương với 21,6 g NaOH cho 100 g dầu tảo) đã được lựa chọn.

Bảng 3. Thành phần và hàm lượng axit béo của mẫu axit béo tự do thu được sau phản ứng thủy phân dầu tảo thô

STT	Axit béo	Tên khoa học	Tên thường	Hàm lượng (% so với tổng số axit béo)
1	C14:0	Tetradecanoic acid(14:0)	Myristic	5,085
2	C16:0	Hexadecanoic acid (16:0)	Palmitic	20,478
3	C18:1(n-9)	Cis-9-Octadecanoic acid	Oleic	3,821
4	C18:2(n-6) -t	9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic	19,441
5	C20:4n-6	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	AA	4,754
6	C20:5n-3	Eicosapentaenoate	EPA	14,304
7	C22:6n-3	Docosahexaenoate	DHA	22,438
Tổng số axit béo không bão hòa đa nối đôi omega-3 và omega-6				60,937

*Thành phần axit béo của hỗn hợp axit béo tự do sau phản ứng thủy phân dầu tảo*

Thành phần axit béo là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất đối với các nguyên liệu được sử dụng để sản xuất dầu sinh học. Chúng tôi tiến hành phân tích thành phần axit béo của mẫu axit béo tự do thu được sau phản ứng thủy phân dầu tảo thô (bảng 3).

Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy, axit béo tự do sau phản ứng thủy phân dầu tảo

có chất lượng rất tốt vì tổng hàm lượng axit béo omega-3 và omega-6 chiếm 60,937% so với TFA, trong đó, hàm lượng DHA và EPA chiếm 22,438% và 14,304% so với TFA, tương ứng. Chính vì vậy, hỗn hợp axit béo tự do thu được trong nghiên cứu này sẽ được sử dụng cho việc sản xuất dầu sinh học giàu hỗn hợp axit béo omega-3 và omega-6 làm thực phẩm chức năng cho người. Các kết quả nghiên cứu tối ưu hoá quá trình làm giàu hỗn hợp omega-3 và omega-

6 từ hỗn hợp axit béo tự do sẽ được trình bày trong các công bố tiếp theo.

## KẾT LUẬN

Vi tảo biển dị dưỡng *S. mangrovei* PQ6 được nuôi trồng bằng bình lên men 150 lít có hàm lượng DHA chiếm 32,98% so với tổng số axit béo.

Điều kiện tối ưu cho tách chiết lipid tổng số (dầu tảo thô) từ *S. mangrovei* PQ6 đạt hiệu suất trên 70% (hàm lượng lipid tổng số đạt trên 70% sinh khối khô) bao gồm: dung môi n-hexan; nhiệt độ 70-75°C; khuấy trộn liên tục trong 4 giờ; tách chiết 1 lần; tỷ lệ sinh khối tảo: dung môi là 1:10; nhiệt độ sấy sinh khối là 80°C; độ ẩm sinh khối 0%.

Điều kiện phù hợp cho quá trình thủy phân dầu tảo thô để thu được axit béo tự do bằng phương pháp xà phòng hoá có sử dụng NaOH 1,8N pha trong cồn 70%; nhiệt độ phản ứng 70°C trong 3 giờ.

Hàm lượng axit béo omega-3 và omega-6 chiếm đến 60,937% so với tổng số axit béo có trong thành phần axit béo tự do. Trong đó, hàm lượng DHA và EPA chiếm đến 22,438% và 14,304% so với tổng số axit béo.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu quy trình tách chiết axit béo tự do sinh học giàu axit béo omega-3 và omega-6 (EPA, DHA, DPA) từ sinh khối vi tảo biển dị dưỡng” của Bộ Công Thương thuộc Đề án Phát triển và Ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020 (mã số ĐT.01.13/CNSHCB).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balasubramanian R. K., Doan T. T. Y., Obbard J. P., 2013. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 215-216: 929-936.
- Bligh E. G., Dyer W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- Bowles R. D., Hunt A. E., Bremer G. B., Duchars M. G., Eaton R. A., 1999. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group of the traustochytrids: Screening of isolates and optimisation of docosaheptaenoic acid production. *J. Biotechnol.*, 70: 193-202.
- Grima E. M., Belarbi E. H., Fernandez F. G. A., Medina F. G. A., Chisti Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics *Biotechnol. Adv.*, 20: 491-515.
- Gunstone F. D., 1996. *Fatty acid and lipid chemistry*, Blackie Academic, London.
- Halim R., Danquah M. K., Webley P. A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol. Adv.*, 30: 709-732.
- Hong D. D., Anh H. T. L., Thu N. T. H., 2011. Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalga - *Schizochytrium mangrovei* PQ6 isolated from Phu Quoc island, Kien Giang province, Vietnam. *J. Phycol.*, 47: 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 loại vi tảo biển dị dưỡng mới *Labyrinthula*, *Schizochytrium* và ứng dụng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 45: 144-154.
- Lewis T. E., Nichols P. D., McMeekin T. A., 1999. The biotechnological potential of thraustochytrids. *Mar. Biotechnol.*, 1: 580-587.
- Mendes A., Reis A., Vasconcelos R., Guerra P., da Silva T. L., 2009 *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *J. Appl. Phycol.*, 21: 199-214.
- Raghukumar S., 2008. Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Mar. Biotechnol.*, 10: 631-640.
- Robert S. S., 2006. Production of eicosapentaenoic and docosaheptaenoic acid-containing oils in transgenic land plants for

- human and aquaculture nutrition. *Mar. Biotechnol.*, 8: 103-109.
13. Shahidi F., Wanasundara U. N., 1998. Omega 3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in food science & technology*, 9: 230-240.
  14. Song C., Li X., Kang Z., Kadotomi Y., 2007. Omega-3 fatty acid ethyl-eicosapentaenoate attenuates IL-1beta-induced changes in dopamine and metabolites in the shell of the nucleus accumbens: involved with PLA2 activity and corticosterone secretion. *Neuropsychopharmacology*, 32: 736-744.
  15. Tanaka S., Yaguchi T., Shimizu S., Sogo T., Fujikawa S., 2003. Process for preparing Docosahexaenoic acid and Docosapentaenoic acid with *Ulkenia*, US Patent No. 6509178 B1.
  16. Trần Thanh Trúc, 2005. Giáo trình công nghệ chế biến axit béo tự do mỡ thực phẩm. Trường Đại học Cần Thơ, 100 trang.
  17. Ward O. P., Singh A., 2005. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process. Biochem.*, 40: 3627-3652.
  18. 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.

## STUDY ON TOTAL LIPID AND FREE FATTY ACIDS EXTRACTION FROM HETEROTROPHIC MARINE MICROALGA *Schizochytrium mangrovei* PQ6

**Hoang Thi Minh Hien, Luu Thi Tam, Le Thi Thom, Nguyen Cam Ha,  
Luong Hong Hanh, Hoang Thi Lan Anh, Ngo Thi Hoai Thu, Dang Diem Hong**

Institute of Biotechnology, VAST

### SUMMARY

This work aims to extract total lipid and free fatty acids from heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6 which was isolated from Phu Quoc island, Kien Giang province, Vietnam for producing bio-oil rich in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids -PUFAs, especially docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 omega-3), eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5 omega-3) and docosapentaenoic acid (DPA; C22:5 omega-3/omega-6), this microalga was grown in 150 L fermentor to supply enough biomass for lipid extraction. The cell density, dry cell weight and total lipid were  $125.51 \times 10^6$  cells/ml, 30.31 g/l and 56% of dry cell weight after 96 h of cultivation, respectively. Biomass of PQ6 strain have DHA concentration up to 32.98% of total fatty acids (TFA). Under the optimum conditions such as n-hexane; temperature at 70-75°C; continuous agitation for 4 hrs; for one time of extraction; biomass: solvent ratio as 1:10; temperature for drying biomass at 80°C; humidity of biomass at 0%, total lipid content has increased from 56% to 70% of dry biomass weight. The optimal hydrolyzation reaction condition for obtaining the free fatty acids have found out using chemical reaction with NaOH concentration of 1.8N dissolved in ethanol 70%; reaction temperature at 70°C for 3 hrs. The content of omega-3 and omega-6 PUFAs contains up to 60.937% of total fatty acids found in the free fatty acid, DHA and EPA contents take up 22.438% and 14.304%. Obtained free fatty acids in this study can be used as good quality material for producing the bio-oil rich omega-3 and omega-6 PUFAs such as DHA, EPA, DPA for functional food for human and feed for animals.

*Keywords:* *Schizochytrium mangrovei* PQ6, bio-oil, long chain polyunsaturated fatty acids.

*Ngày nhận bài:* 13-4-2013