



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ  
Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường

website: [sj.ctu.edu.vn](http://sj.ctu.edu.vn)



DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.108

## NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT DẦU VI SINH VẬT TỪ CÁM GẠO TÁCH BÉO

Hồ Quốc Phong<sup>1</sup>, Lê Trang Nguyên Thu<sup>2</sup>, Huỳnh Liên Hương<sup>1</sup>, Trần Nam Nghiệp<sup>1</sup> và Nguyễn Văn Đạt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Kỹ thuật hoá học, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/03/2017

Ngày nhận bài sửa: 19/06/2017

Ngày duyệt đăng: 30/10/2017

### Title:

Study of microbial lipid production from defatted rice bran

### Từ khóa:

Chất béo, cám gạo, diesel sinh học, dầu vi sinh vật, *Yarrowia lipolytica*

### Keywords:

Biodiesel, lipid, rice bran, *Yarrowia lipolytica*

### ABSTRACT

In this study, the defatted rice bran (DRB) was hydrolysed by dilute  $H_2SO_4$  solution to obtain sugar solution for culturing *Yarrowia lipolytica* Po1g. In hydrolysis process, some important factors affecting to sugar concentration such as  $H_2SO_4$  concentration (from 2% to 5%), reaction time (from 2 h to 8 h), temperature (from 60°C to 90°C) and ratio of defatted rice bran to acid solution (from 1/4 g/mL to 1/12 g/mL) were investigated. The results showed that 4% of  $H_2SO_4$ , 6 hrs, 90 °C and the ratio of 1/8 g/mL were good reaction conditions for hydrolysing the defatted rice bran and concentration of total sugar in the defatted rice bran hydrolysate (DRBH) was 53.59 g/L. The DRBH was detoxified with  $Ca(OH)_2$  before using for culturing yeast. In culturing process, some factors affecting growth and lipid accumulation of the yeast such as time, sugar concentration, nitrogen source, pH, and carbon source were conducted. The result showed that the maximum of yeast concentration was 11.73 g/L with 25.41% of lipid content when the yeast was cultured 4 days in detoxified DRBH with sugar concentration of 30 g/L, without adding nitrogen source. Composition of lipid consisted high free fatty acid (FFA) 82.53% and glycerides such as monoacylglyceride (11.45%), diacylglyceride (1.41%), and triacylglyceride (3.05%). The fatty acid profile was varying from C16 to C18 and this was considered as potential biodiesel feedstock.

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, cám gạo tách béo (CGTB) được thủy phân bằng dung dịch  $H_2SO_4$  loãng nhằm thu được dung dịch đường làm nguồn dinh dưỡng nuôi cấy nấm men *Yarrowia lipolytica* Po1g. Trong giai đoạn thủy phân, các yếu tố ảnh hưởng đến nồng độ đường tổng (NDDT) như nồng độ  $H_2SO_4$  với khoảng khảo sát (2 - 5%), thời gian phản ứng (2 - 8 giờ), nhiệt độ (60 - 100 °C) và tỉ lệ CGTB và dung dịch acid (CGTB/DDA) (1/4 - 1/12 g/mL). Kết quả cho thấy rằng, điều kiện thủy phân thích hợp là  $H_2SO_4$  4%, thời gian 6 giờ, nhiệt độ là 90 °C và tỉ lệ CGTB/DDA là 1/8 g/mL, với nồng độ đường thu được là 53,59 g/L. Sau khi thủy phân dung dịch đường được khử độc bằng  $Ca(OH)_2$  trước khi sử dụng để lên men. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và tích lũy chất béo của nấm men như thời gian, nồng độ đường, nguồn nitrogen, pH, nguồn carbon được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy rằng, lượng sinh khối thu được cao nhất là 11,73 g/L, tương ứng với lượng dầu tích lũy là 25,41% trong điều kiện không có bổ sung nguồn nitơ; NDDT 30 g/L và 4 ngày nuôi cấy. Kết quả phân tích cho thấy thành phần chủ yếu của chất béo thu được là chất béo tự do (FFA) 82,53% và các glyceride như monoacylglyceride (MAG, 11,45%), diacylglyceride (DAG, 1,41%) và triacylglyceride (TAG, 3,05%). Các acid béo có cấu trúc mạch carbon chủ yếu C16 đến C18. Đây là nguồn dầu thích hợp làm nguyên liệu để sản xuất diesel sinh học.

Trích dẫn: Hồ Quốc Phong, Lê Trang Nguyên Thu, Huỳnh Liên Hương, Trần Nam Nghiệp và Nguyễn Văn Đạt, 2017. Nghiên cứu sản xuất dầu vi sinh vật từ cám gạo tách béo. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52a: 37-45.

## 1 GIỚI THIỆU

Trong vài thập kỷ qua, để giảm thiểu tác động môi trường do nhiên liệu hoá thạch gây ra, nhiều quốc gia và các tổ chức quốc tế đã tập trung nghiên cứu sử dụng năng lượng tái tạo và nhiên liệu sinh học để thay thế. Trong đó, nhiên liệu sinh học nói chung và diesel sinh học nói riêng ngày càng được quan tâm vì nó là nguồn nhiên liệu thân thiện với môi trường. Hiện nay, diesel sinh học thương mại được tổng hợp từ các nguồn mỡ động vật hay dầu thực vật và chi phí cho nguồn nguyên liệu thô này chiếm 70-75% tổng chi phí sản xuất. Đây là một trong những trở ngại lớn cho việc phát triển và ứng dụng rộng rãi diesel sinh học (Ma & Hanna, 1999). Mặt khác, tiêu thụ một lượng lớn các loại dầu động thực vật để sản xuất dầu diesel sinh học có thể sẽ dẫn đến sự thiếu hụt các loại dầu ăn và giá thực phẩm tăng cao. Việc sử dụng dầu động thực vật giá rẻ, dầu thải hay dầu chiên đã qua sử dụng làm nguyên liệu là một chiến lược tốt để giảm chi phí. Tuy nhiên, những nguồn này có sản lượng hạn chế, không thể đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng cho việc sản xuất. Vì vậy, việc tìm ra nguồn dầu nguyên liệu rẻ cho quá trình sản xuất diesel sinh học rất đáng được quan tâm.

Một vài loài vi sinh vật có khả năng tích lũy chất béo trên 20% khối lượng tế bào khô, được gọi là vi sinh vật cho dầu. Dầu đơn bào (single cell oil, SCO) là loại dầu thu được từ vi sinh vật, là lựa chọn thay thế tiềm năng để sản xuất dầu diesel sinh học do chúng có chứa acid béo chủ yếu là C16 và C18, thành phần tương tự với các loại dầu thực vật (Kumar *et al.*, 2012). Trong các loài vi sinh vật cho dầu, nấm men *Yarrowia lipolytica* có khả năng tích lũy chất béo trên 50% trọng lượng tế bào khô và được xem là một loại nấm men cho dầu tiềm năng (Beopoulos *et al.*, 2009). Sau khi qua biến đổi gen, chủng *Y. lipolytica* Po1g sinh trưởng tốt môi trường sucrose, glucose, xylose; có khả năng tổng hợp chất béo và protein có chất lượng tốt do không sinh ra các protease ngoại bào (Economou *et al.*, 2011). Những đặc tính này làm cho *Y. lipolytica* Po1g được quan tâm nhiều hơn trong các quá trình sản xuất protein và chất béo.

Để giảm chi phí sản xuất chất béo từ vi sinh vật cho dầu, nhiều nghiên cứu đã tận dụng phụ phẩm nông nghiệp giàu lignocellulose làm chất nền để nuôi cấy như là rơm rạ (Huang *et al.*, 2009), vỏ trấu (Economou *et al.*, 2011), và bã mía (Tsigie *et al.*, 2011). Trong đó, lignocellulose từ các nguồn phụ phẩm được tiến hành thủy phân trong môi trường acid loãng nhằm thu dịch đường thủy phân và đây là nguồn carbon sử dụng để nuôi các vi sinh vật cho dầu. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hiệu

quả chuyển hoá thành đường từ nguồn phụ phẩm này là khá cao và sinh vật cho dầu phát triển rất tốt và tích lũy lượng dầu cao trong môi trường này mà không cần phải bổ sung các nguồn dinh dưỡng khác (Tsigie *et al.*, 2012).

Theo báo cáo của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, năm 2015, sản lượng lúa ở Việt Nam là 45,22 triệu tấn. Trong đó, với cám gạo được tạo ra trong quá trình chế biến chiếm 10% tương đương với 4,522 triệu tấn là nguồn phụ phẩm có giá trị cao. Ngày nay, ngoài việc sử dụng trong chăn nuôi cám gạo còn được dùng để trích ly thu được nguồn dầu có giá trị cao trong sản xuất dầu ăn thương mại. Cám gạo sau khi trích ly dầu, còn gọi là cám gạo tách béo (CGTB) chứa một lượng lớn polysaccharide có khả năng thủy phân thành đường bằng acid loãng. Dung dịch đường thủy phân thu được từ quá trình thủy phân là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho nuôi cấy vi sinh vật, đặc biệt là *Yarrowia lipolytica* Po1g. Vì thế, nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm ra điều kiện thủy phân cám gạo đã tách béo thích hợp và tận dụng nguồn dịch đường thu được để nuôi cấy nấm men *Y. lipolytica* Po1g nhằm sản xuất chất béo vi sinh vật.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên liệu và hoá chất

CGTB được cung cấp bởi công ty TNHH Wilmar Agro Việt Nam tại Cần Thơ và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để sử dụng. Nấm men *Y. lipolytica* Po1g từ công ty YEASTERN Biotech Co. Ltd., được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Kỹ thuật Sinh học, Đại học Khoa học Công nghệ Quốc gia Đài Loan.

Hoá chất chính dùng trong quá trình nuôi cấy nấm men yeast extract, peptone, D-glucose, và agar (Merck, Đức). Ngoài ra, còn các hoá chất dùng trong quá trình thủy phân như  $H_2SO_4$ ,  $Ca(OH)_2$ , thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), và các dung môi sử dụng trích ly dầu như hexane, methanol và acetone.

### 2.2 Thủy phân CGTB

CGTB được thủy phân với dung dịch  $H_2SO_4$  loãng theo phương pháp của Chanel (Chandel *et al.*, 2012) với một vài thay đổi nhỏ ở các thông số khảo sát như nồng độ acid (2 - 5%), nhiệt độ (60 - 90°C) và thời gian thủy phân (2 - 8 giờ). Thiết kế thí nghiệm được trình bày trong Bảng 1. Sau khi thủy phân, hỗn hợp được làm nguội ở nhiệt độ phòng, dung dịch CGTB thủy phân (CGTBTP) thu được bằng phương pháp lọc chân không và sau đó được tiến hành khử độc.

**Bảng 1: Các yếu tố cần khảo sát trong quá trình thủy phân**

Yếu tố khảo sát	Khoảng khảo sát	Yếu tố cố định
Thời gian (giờ)	2 - 8	Nồng độ acid, nhiệt độ, tỉ lệ
Nồng độ acid (% v/v)	2 - 5	Thời gian, nhiệt độ, tỉ lệ
Nhiệt độ (°C)	60 - 90	Nồng độ acid, thời gian, tỉ lệ
Tỉ lệ CGTB/DD acid (g/mL)	1/4 - 1/12	Nồng độ acid, nhiệt độ, thời gian

### 2.3 Khử độc dung dịch CGTBTP

Thành phần như furfural, hydroxymethylfurfural (HMF) và pH thấp trong dung dịch CGTBTP gây ức chế sự phát triển của nấm men được xử lý bằng phương pháp vôi hoá.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  được thêm từ từ vào dung dịch CGTBTP đến pH 9 - 10 và sau đó pH được điều chỉnh xuống pH 6,5, trong đó máy đo pH (Melter Toledo, Mỹ) được sử dụng để xác định giá trị pH. Sau khi khử độc, dung dịch được loại bỏ kết tủa bằng phương pháp lọc chân không và được bảo quản ở 4°C để dùng nuôi cấy nấm men.

### 2.4 Nuôi cấy nấm men

*Y. lipolytica* Polg được trù trên môi trường YPGA với yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L, D-glucose 20 g/L, agar 20 g/L, được bảo quản ở 4°C. Nấm men được nuôi sơ bộ trong môi trường YPD có chứa yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L, D-glucose 20 g/L trong 24 giờ, ở 26°C, tốc độ lắc 160 vòng/phút và sau đó nuôi cấy nhân rộng trong các môi trường nuôi cấy khác nhau nhằm khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự phát triển và tích lũy chất béo của nấm men. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong tủ nuôi cấy vi sinh JSSI 100C (JSR, Mỹ). Trong đó, nấm men (từ quá trình nuôi sơ bộ) được nhân rộng trong 300 mL môi trường nuôi cấy với tỉ lệ 1:10 (v/v), với điều nhiệt 26°C, tốc độ lắc 160 vòng/phút. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phát triển và tích lũy chất béo được khảo sát theo thiết kế Bảng 2.

**Bảng 2: Các yếu tố khảo sát trong quá trình nuôi cấy**

Yếu tố khảo sát	Khoảng khảo sát
Thời gian (ngày)	1 - 6
NĐĐT (g/L)	20 - 40
Nguồn nitơ	60 - 100
pH	4 - 9
Nguồn carbon	Đường mía, D-glucose, CGTBTP KĐ, CGTBTP KKĐ
Phương pháp nuôi cấy	Có BS nguồn carbon, không BS nguồn carbon

CGTBTP KĐ - cám gạo tách béo thủy phân khử độc;  
CGTBTP KKĐ - cám gạo tách béo thủy phân không khử độc

### 2.5 Phương pháp phân tích

#### 2.5.1 Xác định NĐĐT

NĐĐT trong dung dịch CGTBTP được xác định bằng máy quang phổ UV-Vis Cary 50 (Varian, Mỹ) dựa theo phương pháp DNS (Marsden *et al.*, 1982; Miller, 1959).

#### 2.5.2 Xác định nồng độ sinh khối

Nồng độ sinh khối được xác định bằng cách đo mật độ quang của mẫu sinh khối pha loãng bởi máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 600 nm. Kết quả được tính dựa vào đường chuẩn sinh khối tế bào khô.

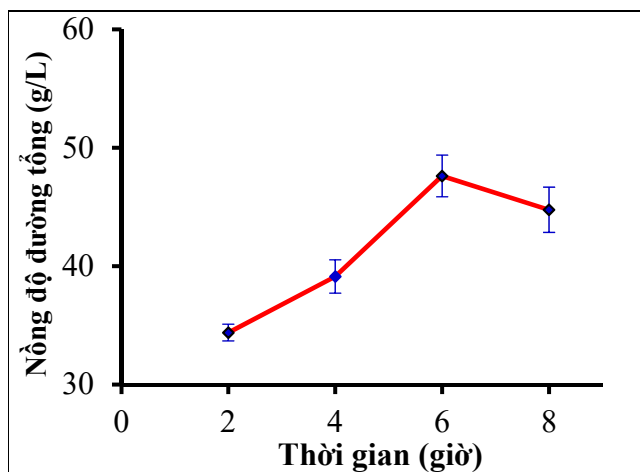
#### 2.5.3 Xác định hàm lượng chất béo

Sau khi nuôi cấy, sinh khối được thu bằng phương pháp ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút và sấy khô ở 50°C đến khối lượng không đổi. Chất béo thu được bằng phương pháp chiết Soxhlet với dung môi sử dụng là hỗn hợp hexane và methanol với tỉ lệ 2:1 (v/v). Chất béo sau đó được loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay chân không. Thành phần chất béo được phân tích bằng sắc ký khí (GC-2010 Plus). Mẫu chất béo sau khi đã khử sáp và nhựa được loại bỏ hết phần dung môi và được chuẩn bị với nồng độ 20 mg/mL dung môi ethyl acetate. Điều kiện phân tích: nhiệt độ buồng tiêm và đầu dò là 365 °C, nhiệt độ cột bắt đầu ở 80°C tăng lên 365°C với tốc độ 15 °C/phút và giữ trong 10 phút (Tsigie *et al.*, 2012).

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến NĐĐT

Ảnh hưởng của thời gian thủy phân được khảo sát trong khoảng thời gian từ 2 đến 8 giờ, ở điều kiện nhiệt độ 90°C, nồng độ acid 3%, tỉ lệ cám gạo đã tách béo/dung dịch acid (CGTB/DDA) là 1/8 g/mL. Kết quả cho thấy rằng NĐĐT tăng dần theo thời gian và đạt giá trị cao nhất 47,62 g/L, tương ứng 6 giờ thủy phân. Tuy nhiên, NĐĐT giảm nhẹ xuống 44,76 g/L khi thời gian thủy phân tăng lên đến 8 giờ (Hình 1). Nồng độ các chất ức chế tăng lên nhanh chóng khi thủy phân trong thời gian dài (Tsigie *et al.*, 2012). Do đó, thời gian thủy phân CGTB thích hợp là 6 giờ.

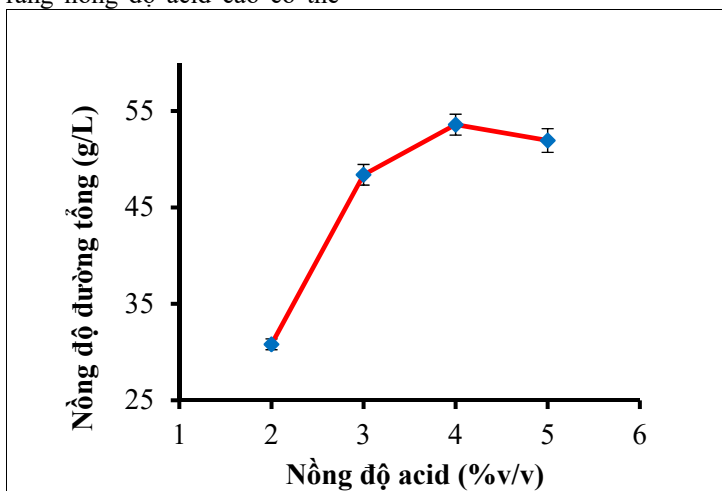


**Hình 1: Ảnh hưởng của thời gian đến NĐĐT.** Thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện cố định là 90°C, nồng độ acid 3%, tỉ lệ của CGTB/DDA là 1/8 g/mL

### 3.2 Ảnh hưởng của nồng độ acid đến NĐĐT

Nồng độ acid  $H_2SO_4$  được khảo sát trong khoảng từ 2% đến 5%, với điều kiện thủy phân cố định: nhiệt độ 90°C, tỉ lệ CGTB/DDA là 1/8 (g/L) và thời gian 6 giờ. Kết quả được thể hiện trên Hình 2, NĐĐT tăng khá nhanh từ 30,80 g/L đến 48,39 g/L khi nồng độ acid 2% lên 3%, và đạt giá trị cực đại ở nồng độ acid 4% với NĐĐT là 53,59 g/L. Điều này cho thấy rằng nồng độ acid cao có thể

phá vỡ dễ dàng cấu trúc polymer của hemicellulose và cellulose của CGTB. Tuy nhiên, NĐĐT giảm xuống còn 51,94 g/L ở nồng độ acid 5%. Điều này được giải thích, khi tăng nồng độ acid đồng thời cũng làm cho các loại đường như glucose và xylose chuyển thành các hợp chất ức chế HMF, furfural ảnh hưởng xấu đến quá trình nuôi cấy (Tsogie *et al.*, 2011).

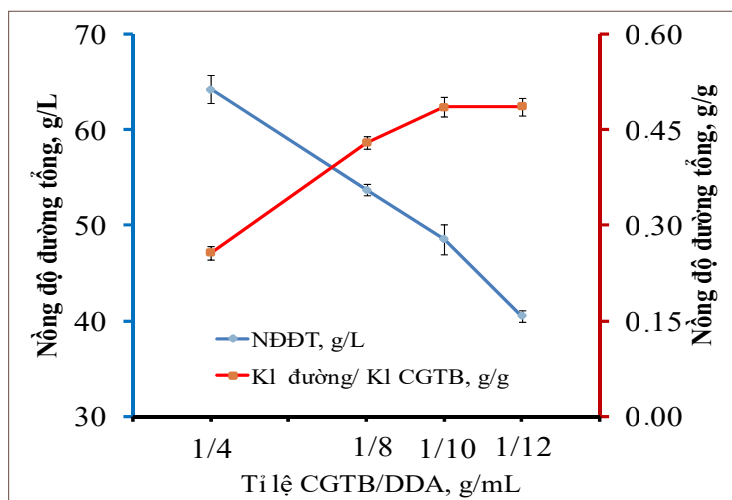


**Hình 2: Ảnh hưởng của nồng độ acid đến NĐĐT.** Phản ứng được thực hiện ở điều kiện cố định nhiệt độ 90°C, tỉ lệ CGTB/DDA là 1/8 (g/L) và thời gian 6 giờ

### 3.3 Ảnh hưởng của tỉ lệ CGTB/DDA đến NĐĐT

CGTB được thủy phân trong môi trường acid loãng với các tỉ lệ CGTB/DDA thay đổi từ 1/4 đến 1/12 g/mL, trong điều kiện nhiệt độ thủy phân 90°C, nồng độ acid 4%, thời gian thủy phân 6 giờ. Kết quả thí nghiệm cho thấy NĐĐT trong dung dịch thủy phân giảm từ 64,23 g/L, 53,59 g/L, 48,55 g/L và 40,51 g/L tương ứng khi tăng tỉ lệ

CGTB/DDA từ 1/4, 1/8, 1/10 g/mL đến 1/12 g/mL (Hình 3). Ngược lại, lượng đường sinh ra tính trên 1 gam CGTB tăng lên từ 0,26, 0,43, 0,49 và 0,49 g/g, tương ứng các tỉ lệ trên. Như vậy, mặc dù tỉ lệ 1/8 g/L cho lượng đường hơi thấp hơn các tỉ lệ 1/10 và 1/12 g/L nhưng lượng acid sử dụng trong trường hợp này ít hơn nên tỉ lệ 1/8 g/L được cho là thích hợp để thủy phân CGTB.

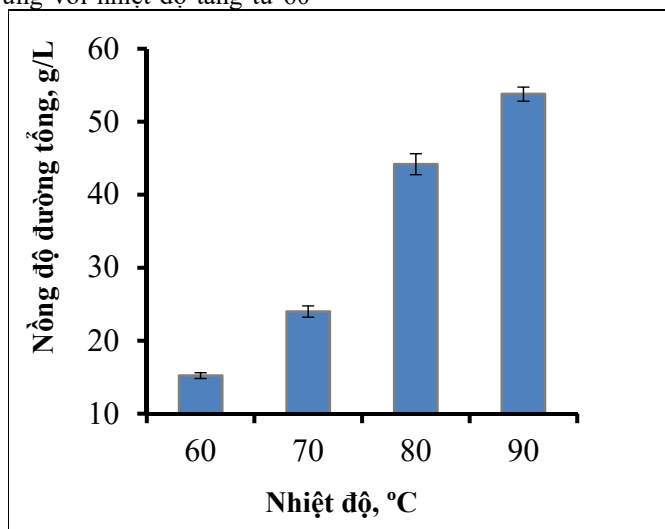


**Hình 3:** Ảnh hưởng của tỉ lệ CGTB/DDA đến NĐĐT. Phản ứng được thực hiện ở điều kiện cố định nhiệt độ 90°C, thời gian 6 giờ và nồng độ dung dịch acid 4%

### 3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến NĐĐT

Nhiệt độ thủy phân được khảo sát trong khoảng 60°C đến 90°C ở điều kiện cố định thời gian 6 giờ, nồng độ acid 4%, tỉ lệ CGTB/DDA 1/8 g/mL. Kết quả cho thấy rằng, NĐĐT tăng tuyến tính từ 15,22 đến 53,59 g/L, tương ứng với nhiệt độ tăng từ 60

đến 90°C (Hình 4). Ngoài ra, tác giả đã thử sử dụng nhiệt độ 100°C để thủy phân, tuy nhiên dung dịch thủy phân chuyển sang màu nâu đen do đường bị caramen hóa. Vì vậy, nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân là ở 90°C.

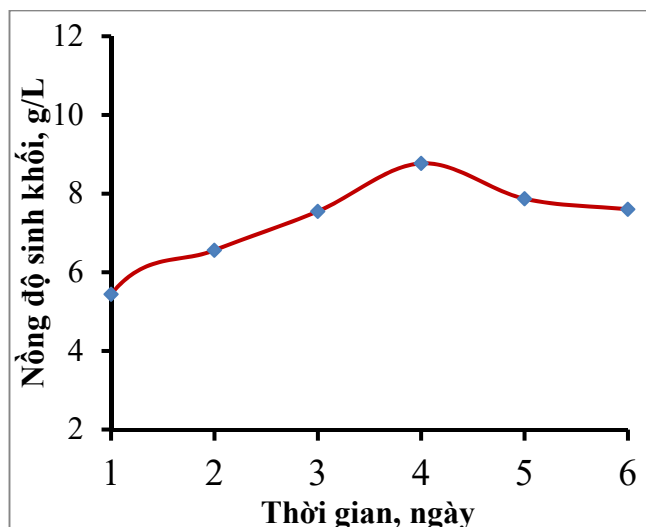


**Hình 4:** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến NĐĐT. Phản ứng được thực hiện ở điều kiện cố định thời gian 6 giờ, nồng độ dung dịch acid 4% và tỉ lệ CGTB/DDA là 1/8 (g/L)

### 3.5 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự phát triển của nấm men

CGTBTP được khử độc có NĐĐT 20 g/L và pH = 6,5 được sử dụng là môi trường để khảo sát thời gian nuôi cấy, trong điều kiện cố định nhiệt độ nuôi cấy là 26°C, tốc độ lắc của tủ nuôi cấy là 160 vòng/phút. Kết quả cho thấy rằng, nồng độ sinh

khối thu được tăng dần và đạt giá trị cao nhất vào ngày thứ 4 (8,77 g/L) và bắt đầu giảm xuống ở ngày thứ 5, thứ 6 (7,87; 7,60 g/L). Điều này có thể giải thích rằng sau ngày thứ 4 nồng độ đường còn lại không cung cấp đủ nguồn dinh dưỡng cho nấm men sinh trưởng.

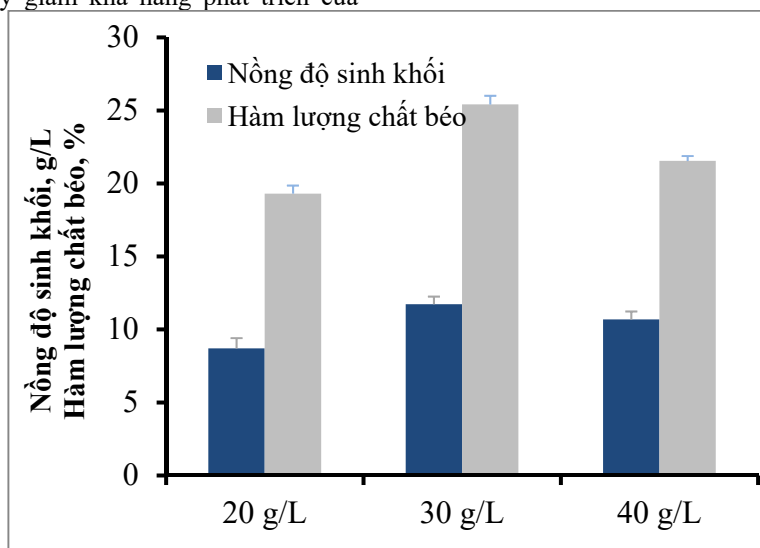


**Hình 5:** Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự sinh trưởng của nấm men. CGTBTP được khử độc có NĐĐT 20 g/L, pH = 6,5 được sử dụng nuôi cấy trong điều kiện cố định nhiệt độ là 26°C, tốc độ lắc của tủ ủ là 160 vòng/phút và không bổ sung nitơ

### 3.6 Ảnh hưởng của NĐĐT đến sự phát triển của nấm men

Các thí nghiệm được thực hiện trong thời gian nuôi cấy 4 ngày, không bổ sung nguồn nitơ, pH 6,5, nhiệt độ 26 °C và NĐĐT của CGTBTP được thay đổi từ 20-40 g/L. Kết quả khảo sát cho thấy rằng nồng độ sinh khối tăng 8,8 g/L (có 19,3% chất béo) lên 11,79 g/L (có 25,41% chất béo) tương ứng với tăng NĐĐT từ 20 g/L đến 30 g/L (Hình 6). Tuy nhiên, khi sử dụng môi trường nuôi cấy có NĐĐT là 40 g/L làm suy giảm khả năng phát triển của

nấm men, với nồng độ sinh khối là 10,73 g/L và chất béo 21,54%. Điều này chứng tỏ rằng, ở nồng độ đường 20 g/L chưa đủ để các tế bào nấm men phát triển tốt trong thời gian dài. Ngược lại, nếu nồng độ đường quá cao hay nguồn carbon dư thừa sẽ tạo điều kiện tiết ra các acid hữu cơ vào môi trường sinh trưởng của nấm men (Tsigie *et al.*, 2012). Như vậy, trong trường hợp này, môi trường nuôi cấy có NĐĐT là 30 g/L thích hợp cho việc sử dụng nuôi cấy nấm men.



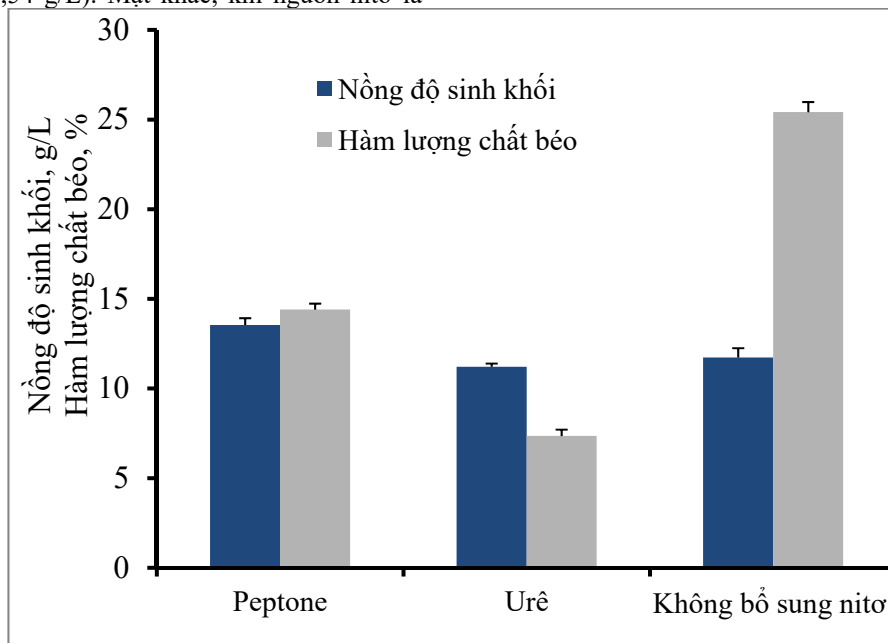
**Hình 6:** Ảnh hưởng của NĐĐT đến sự phát triển sinh khối và hàm lượng chất béo. CGTBTP được khử độc có pH = 6,5 được sử dụng nuôi cấy trong điều kiện cố định nhiệt độ là 26°C, tốc độ lắc của tủ ủ là 160 vòng/phút và thời gian nuôi là 4 ngày



### 3.7 Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự phát triển nấm men

Sử dụng CGTBTP khử được có nồng độ đường 30 g/L để khảo sát sự ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau đến sự phát triển nấm men. Kết quả thí nghiệm (Hình 7) cho thấy rằng nồng độ sinh khối thu được cao nhất khi sử dụng nguồn nitơ là peptone (13,54 g/L). Mặt khác, khi nguồn nitơ là

urê hoặc không sử dụng nguồn nitơ thì nồng độ sinh khối tương đương nhau (11,21 và 11,73 g/L). Ngoài ra, số liệu cũng chỉ ra rằng, khi không sử dụng nguồn nitơ thì hàm lượng chất béo thu được là cao hơn rõ rệt (25,41%) so với khi sử dụng peptone và urê (14,4% và 7,35%). Vì vậy, khi sử dụng nguồn nitơ hạn chế, quá trình tích lũy chất béo của *Y. lipolytica* Polg có hiệu quả hơn.

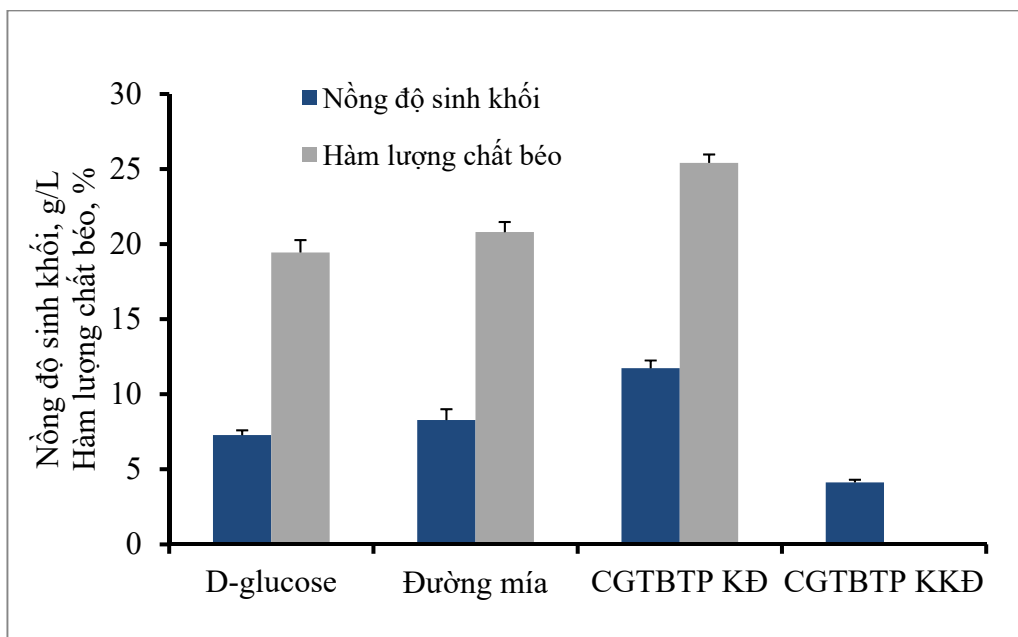


Hình 7: Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự phát triển nấm men. Sử dụng CGTBTP có NĐDT 30 g/L, pH 6,5, nuôi cấy trong thời gian 4 ngày, nhiệt độ 26°C và tốc độ lắc của tủ ủ là 160 vòng/phút

### 3.8 Ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau đến sự phát triển nấm men

So sánh sự phát triển của nấm men *Y. lipolytica* Polg trong môi trường CGTBTP đã khử độc với các nguồn carbon khác nhau như CGTBTP chưa khử độc (30 g/L), D-glucose (30 g/L), đường mía (30 g/L). Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng khi sử dụng nguồn carbon là CGTBTP đã khử độc thu được sinh khối có nồng độ cao nhất (11,73 g/L, chiếm 25,4% chất béo). CGTBTP không khử độc có chứa các chất ức chế HMF, furfural làm hạn chế sự phát triển của nấm men nên sinh khối thu được thấp nhất (4,12g/L) và chất béo tích lũy được là rất

thấp. Khi sử dụng nguồn carbon là D-glucose, sinh khối thu được là 7,27 g/L (19,44% chất béo) thấp hơn so với CGTBTP đã khử độc. Điều này là do trong môi trường CGTBTP ngoài đường glucose còn có đường xylose và arabinose. Kích thước các phân tử đường xylose nhỏ đủ để dễ dàng thẩm thấu qua màng tế bào của nấm men, dẫn đến sự tăng trưởng tế bào trong môi trường xylose nhanh hơn trong môi trường glucose (Tsigie *et al.*, 2011). Ngoài ra, khi sử dụng đường mía làm nguồn carbon, thu được sinh khối 8,28 g/L và trong đó 20,8% là hàm lượng chất béo. Điều này cho thấy rằng nấm men *Y. lipolytica* Polg cũng có khả năng sinh trưởng trong môi trường sucrose.

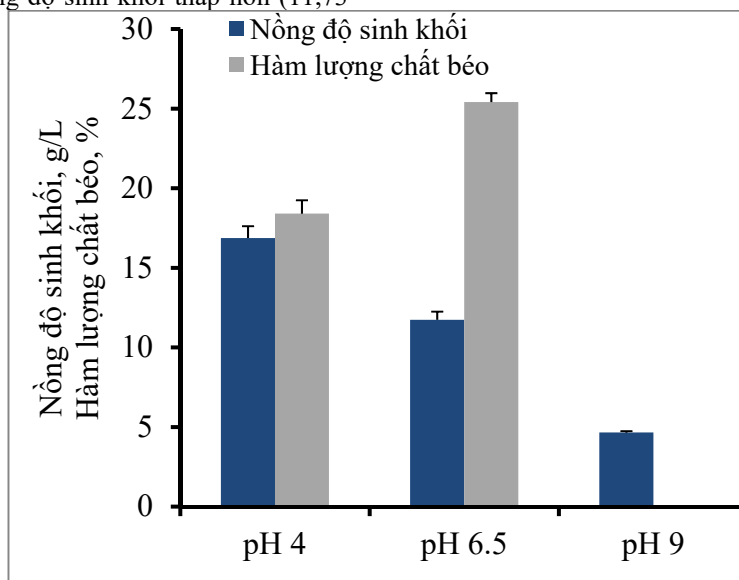


**Hình 8:** Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự phát triển sinh khối và hàm lượng chất béo. Nấm men được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ đường 30 g/L, pH 6,5, thời gian 4 ngày, nhiệt độ 26°C và tốc độ lắc của tủ ủ là 160 vòng/phút

### 3.9 Ảnh hưởng của môi trường pH đến sự phát triển của nấm men

Ngoài nguồn carbon và nguồn nitơ thì môi trường pH cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm men. Kết quả cho thấy ở pH 4 nồng độ sinh khối là cao nhất (16,87 g/L), ở pH 6,5 nồng độ sinh khối thấp hơn (11,73

g/L) nhưng chất béo thu được là cao nhất (25,41%). Trong môi trường base pH 9 nấm men phát triển thấp nhất với nồng độ sinh khối là 4,65 g/L. Như vậy, khi sử dụng nguồn carbon là CGTBTP thì pH thích hợp để nấm men phát triển là 6,5 (Barth & Gaillardin, 1997).



**Hình 9:** Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển sinh khối và hàm lượng chất béo. Nấm men được nuôi cấy trong môi trường CGTBPT có NĐDT 30 g/L, thời gian 4 ngày, nhiệt độ 26°C và tốc độ lắc của tủ ủ là 160 vòng/phút



Nấm men sau khi nuôi cấy trong môi trường CGTBTP được trích ly và phân tích thành phần chất béo. Kết quả được trình bày trong Bảng 3 cho thấy rằng thành phần chủ yếu của chất béo là acid béo tự do và các glyceride. Trong đó, 82,53% chất béo là các acid béo tự do (FFA) và monoacylglyceride (MAG) 11,45%, diacylglyceride (DAG) 1,41%, triacylglyceride (TAG) 3,05% và 1,56% các thành phần khác.

**Bảng 3: Thành phần chất béo từ nấm men *Yarrowia lipolytica* Po1g được nuôi cấy trong môi trường CGTBTP**

Thành phần	% khối lượng
Acid béo tự do (FFA)	82,53
Mono-acylglycerides (MAG)	11,45
Di-acylglycerides (DAG)	1,41
Tri-acylglycerides (TAG)	3,05
Các thành phần khác	1,56

Thành phần cấu trúc mạch carbon của chất béo cũng được phân tích bằng sắc ký khí (GC). Kết quả được trình bày trong Bảng 4 cho thấy thành phần cơ bản trong chất béo tích lũy từ nấm men *Y. lipolytica* Po1g là acid oleic (C18:1) 56,02%, acid palmitic (C16:0) 27,42%, acid stearic (C18:0) 9,05% và một số thành phần khác. Kết quả cho thấy thành phần chất béo thu được tương tự với dầu thực vật. Vì vậy, có thể đây là nguồn chất béo lý tưởng trong việc sản xuất dầu diesel sinh học.

**Bảng 4: Thành phần mạch carbon cấu trúc nên chất béo của nấm men**

Thành phần	% khối lượng
Acidpalmitic (C16:0)	27,42
Acidstearic (C18:0)	9,05
Acidoleic (C18:1)	56,02
Thành phần khác	7,51

#### 4 KẾT LUẬN

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân CGTB được khảo sát và cho thấy rằng điều kiện thích hợp để thực hiện phản ứng thời gian là 6 giờ, nồng độ acid sulfuric 4% (v/v), nhiệt độ 90°C, tỉ lệ CGTB/DDA 1/8 g/mL. NĐĐT thu được trong từ quá trình thủy phân CGTB là 53,59 g/L và đây là nguồn carbon có giá trị các quá trình lên men vi sinh vật. Lượng đường trong dung dịch CGTBTP được sử dụng làm nguồn carbon để nuôi cấy nấm men *Y. lipolytica* Po1g phát triển sản xuất chất béo. Kết quả cho thấy nồng độ sinh khối cao nhất là 11,73 g/L, chiếm 25,41% chất béo khi được nuôi cấy trong điều kiện nguồn nitơ hạn chế, NĐĐT là 30 g/L, pH 6,5 và thời gian nuôi cấy tối ưu là 4

ngày. Kết quả phân tích sắc ký khí cho thấy thành phần chất béo thu được trong nghiên cứu này có cấu trúc mạch carbon chủ yếu là C16 và C18, tương tự như thành phần trong dầu thực vật và đây là nguyên liệu tiềm năng dùng để sản xuất biodiesel.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barth, G. and C. Gaillardin, 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS microbiology reviews, 19(4): 219-237.
- Beopoulos, A., J. Cescut, R. Haddouche, J.L. Uribealrrea, C.M. Jouve and J.M. Nicaud, 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. Progress in Lipid Research, 48(6): 375-387.
- Chandel, A.K., F.A.F. Antunes, P.V.d. Arruda, T.S.S. Milessi, S.S.D. Silva and M.d.G.d.A. Felipe, 2012. Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State of the art. In D-Xylitol, Springer Berlin Heidelberg, pp. 39-61.
- Economou, C.N., G. Aggelis, S. Pavlou and D.V. Vayenas, 2011. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. Bioresource Technology, 102(20): 9737-9742.
- Huang, C., M.H. Zong, H. Wu and Q.P. Liu, 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresour Technol, 100(19): 4535-4538.
- Kumar, V., R. Nouaille, G. Gaudet, P. Fontanille, A. Pandey, C.R. Soccol and C. Larroche, 2012. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? Brazilian Archives of Biology and Technology, 55(1): 29-46.
- Ma, F. and M.A. Hanna, 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology, 70(1): 1-15.
- Marsden, W.L., P.P. Gray, G.J. Nippard and M.R. Quinlan, 1982. Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 32(7-12): 1016-1022.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31(3): 426-428.
- Tsigie, Y.A., C.Y. Wang, N.S. Kasim, Q.D. Diem, L.H. Huynh, Q.P. Ho, C.T. Truong and Y. H. Ju, 2012. Oil production from *Yarrowia lipolytica* Po1g using rice bran hydrolysate. J Biomed Biotechnol, 2012: 378384.
- Tsigie, Y.A., C.Y. Wang, C.T. Truong and Y.H. Ju, 2011. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresource Technology, 102(19): 9216-9222.