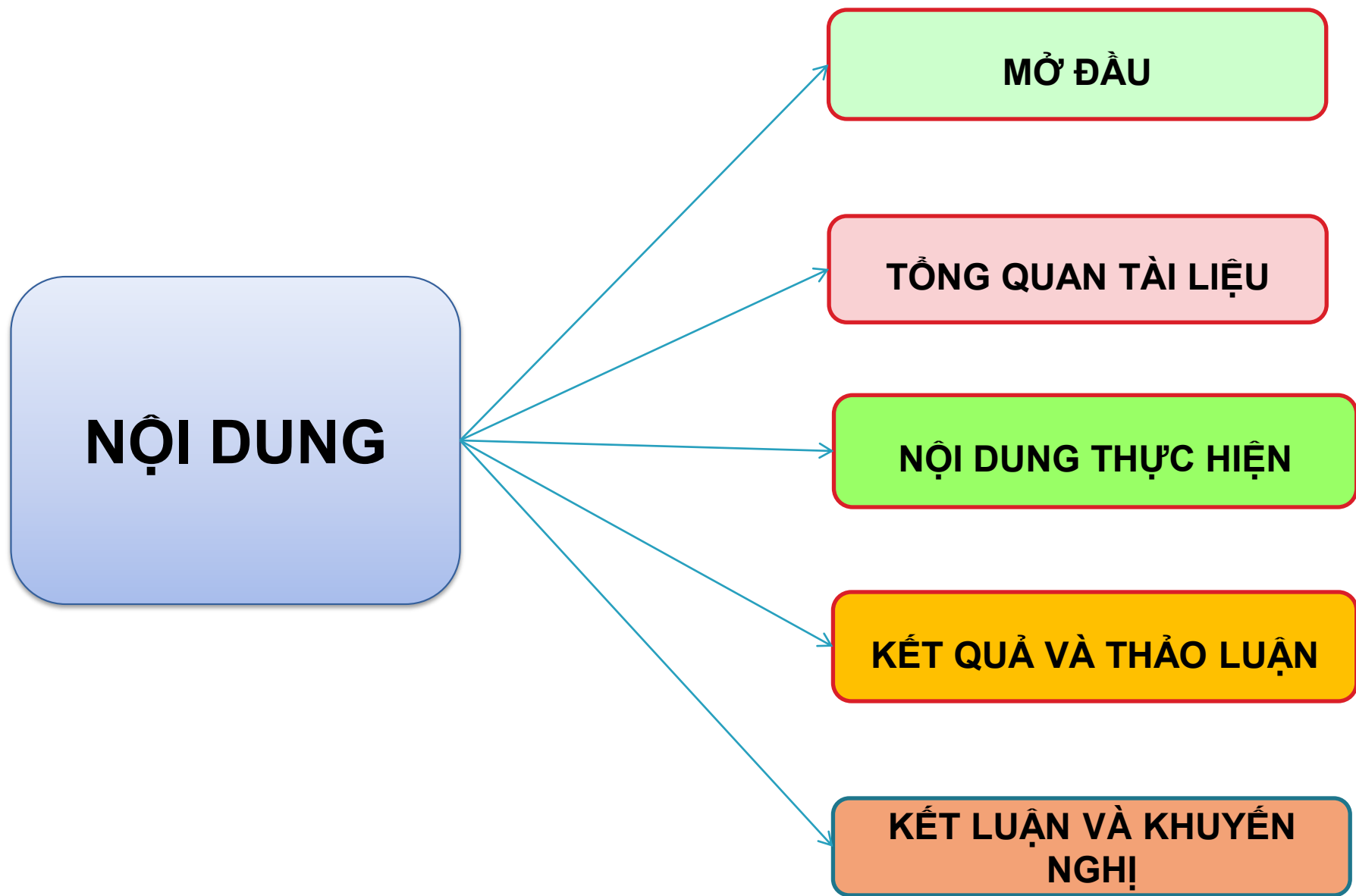


**SỞ Y TẾ ĐỒNG NAI**

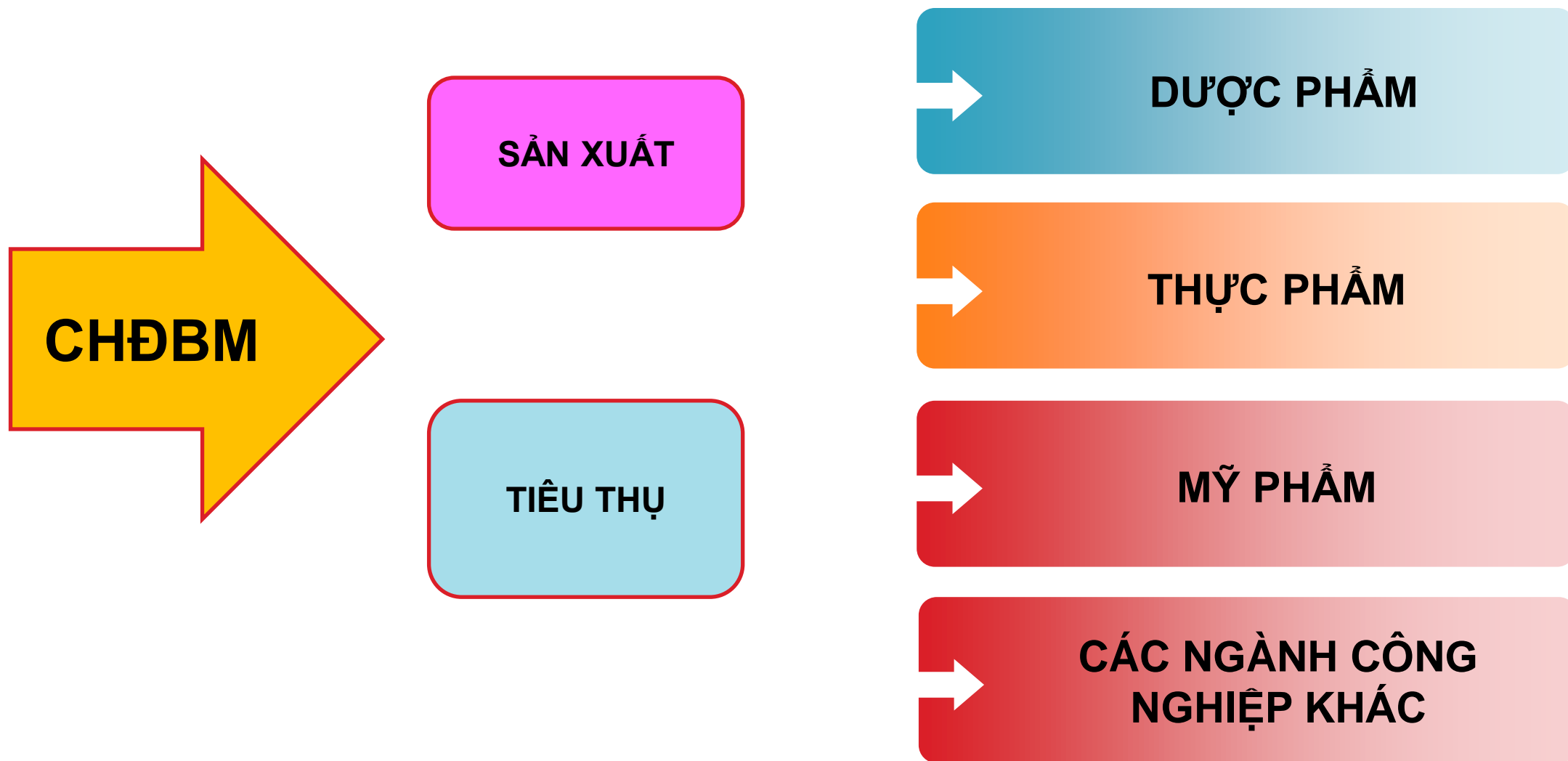
**HỘI NGHỊ  
KHOA HỌC & KỸ THUẬT NGÀNH Y TẾ ĐỒNG NAI  
LẦN THỨ VII - NĂM 2019**

**TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH LÊN MEN *Candida bombicola*  
ĐỂ THU NHẬN SOPHOROLIPID  
TỪ MẬT RỈ ĐƯỜNG**

**Báo cáo viên: TÔNG THU HÀ**

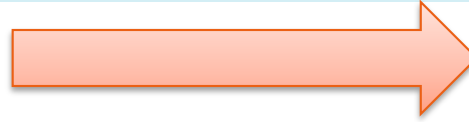


# MỞ ĐẦU



# MỞ ĐẦU

**CHĐBM hóa học**



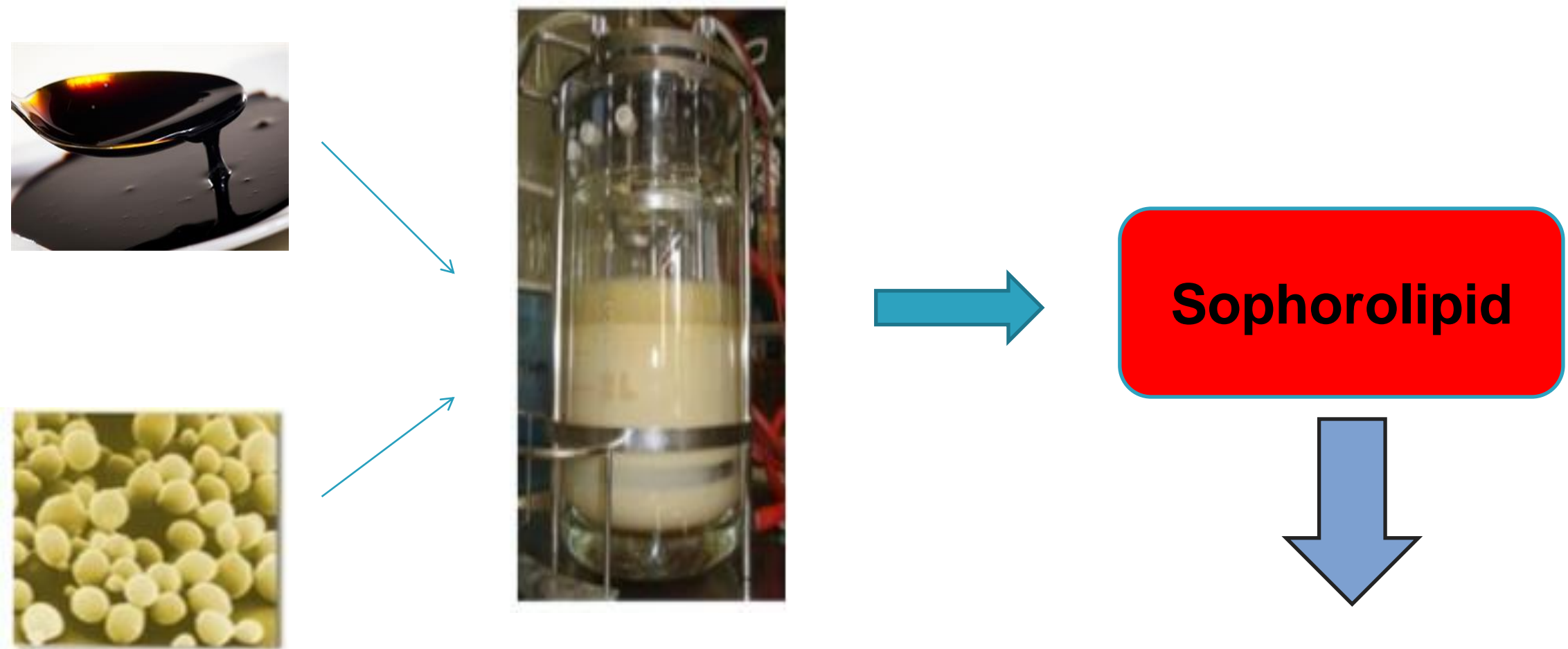
**CHĐBM sinh học**

- Nguồn gốc từ dầu hỏa qua quá trình tổng hợp hóa học
- Cạn kiệt nguồn tài nguyên
- Khả năng phân hủy kém
- Ô nhiễm môi trường nghiêm trọng



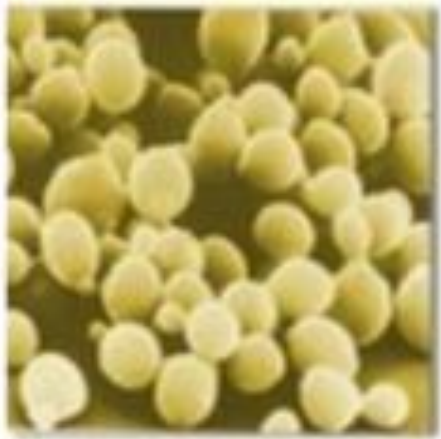
- Khả năng phân hủy sinh học tốt hơn
- Độc tính thấp
- Thân thiện với môi trường
- Hoạt tính chuyên biệt cao

# MỞ ĐẦU



**Tối ưu hóa quy trình lên men *Candida bombicola* để thu nhận sophorolipid từ mật rỉ đường**

# TỔNG QUAN TÀI LIỆU



***Candida  
bombicola***

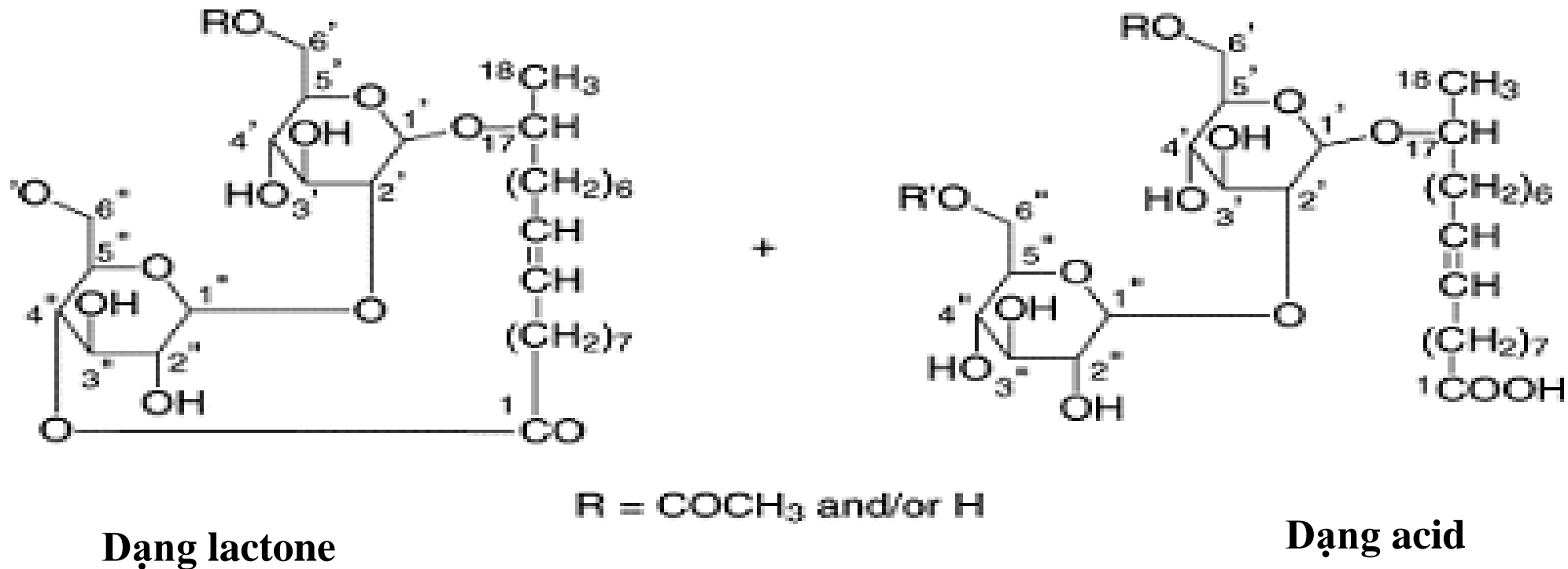
*Torulopsis (Candida) bombicola* được phân lập từ mật của loài ong nghệ thuộc chi *Bombus* sp. bởi Spencer và cs, 1970

Khả năng sản xuất SLs - một glycolipid ngoại bào.

Lên men glucose, sucrose và có khả năng đồng hóa với một số loại đường.

Chúng không có khả năng gây bệnh cho người và động vật.

# CẤU TRÚC HÓA HỌC SOPHOROLIPID



Cấu trúc lactonic và acidic của hỗn hợp sophorolipid được tạo ra bởi  
*Candida bombicola*

# ỨNG DỤNG CỦA SOPHOROLIPID

- ➡ Nước rửa chén
- ➡ Bột giặt
- ➡ Dầu gội
- ➡ Thu hồi các hydrocarbon từ cặn bã và bùn, loại bỏ kim loại nặng, tăng khả năng thu hồi dầu
- ➡ Các sản phẩm chăm sóc da, dưỡng thể
- ➡ Kháng lại một số loại nấm: *Phytophthora*, *Pythium*, và một số loài tảo biển gây hại
- ➡ Chống lại sự suy giảm miễn dịch do virus gây ra



# **NỘI DUNG THỰC HIỆN**

# NỘI DUNG THỰC HIỆN

➡ **Tối ưu** đơn và đa yếu tố điều kiện lên men SLs từ nấm men *Candida bombicola* từ nguồn dầu dừa và mật rỉ đường ở quy mô phòng thí nghiệm và bằng phần mềm Design Expert® 7.0

➡ **Thu nhận** SLs từ mật rỉ đường ở quy mô bioreactor 5 lít

➡ **Định tính** SLs (TLC và HPLC), **xác định** thành phần acid béo (GC)

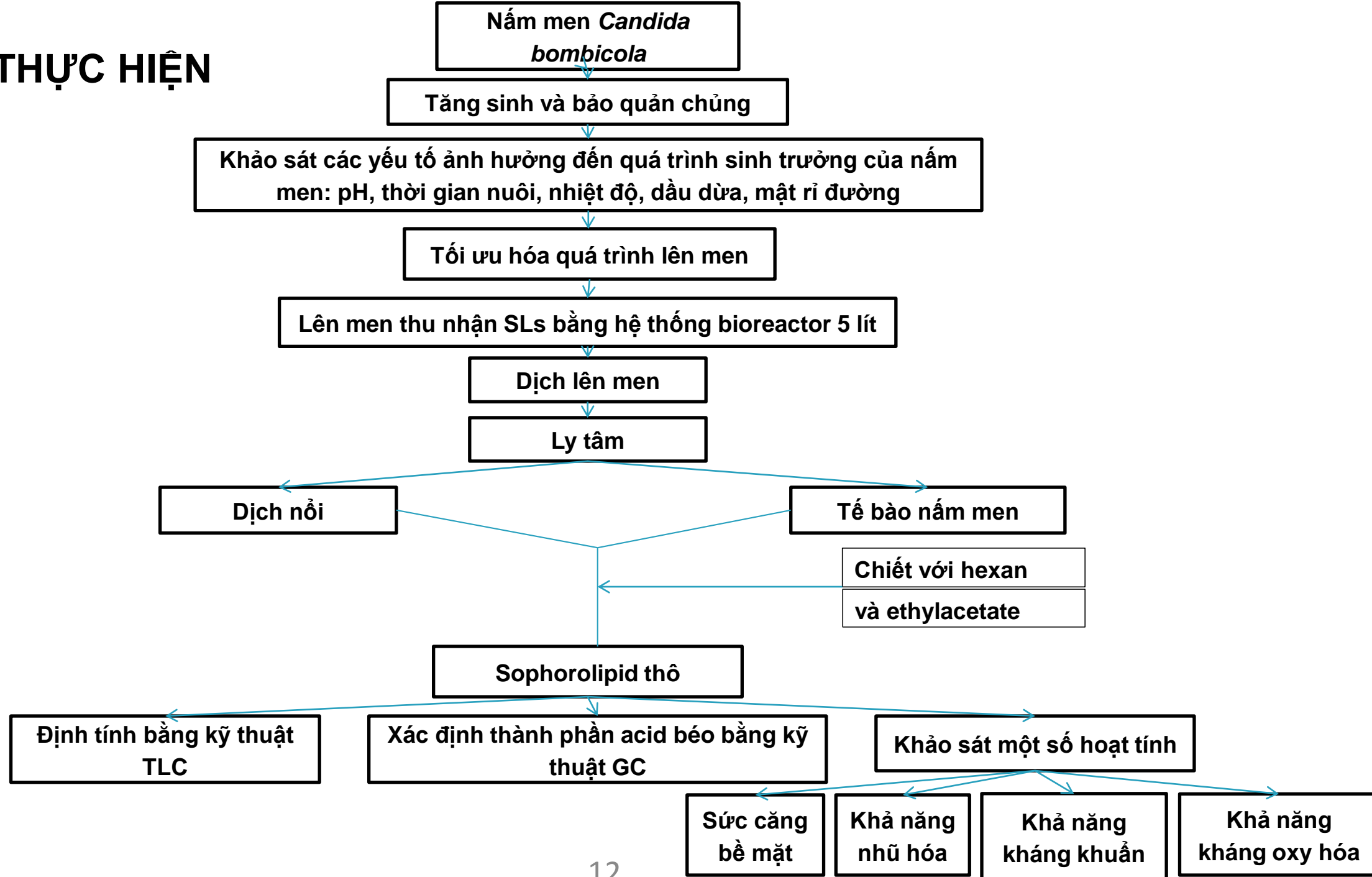
➡ **Khảo sát** một số hoạt tính của SLs:

- Khả năng hoạt động bề mặt (phương pháp vòng Du Nouy)
- Khả năng nhũ hóa
- Khả năng kháng khuẩn (phương pháp khuếch tán trên đĩa, MIC)
- Khả năng kháng oxy hóa (phương pháp DPPH)

## VẬT LIỆU

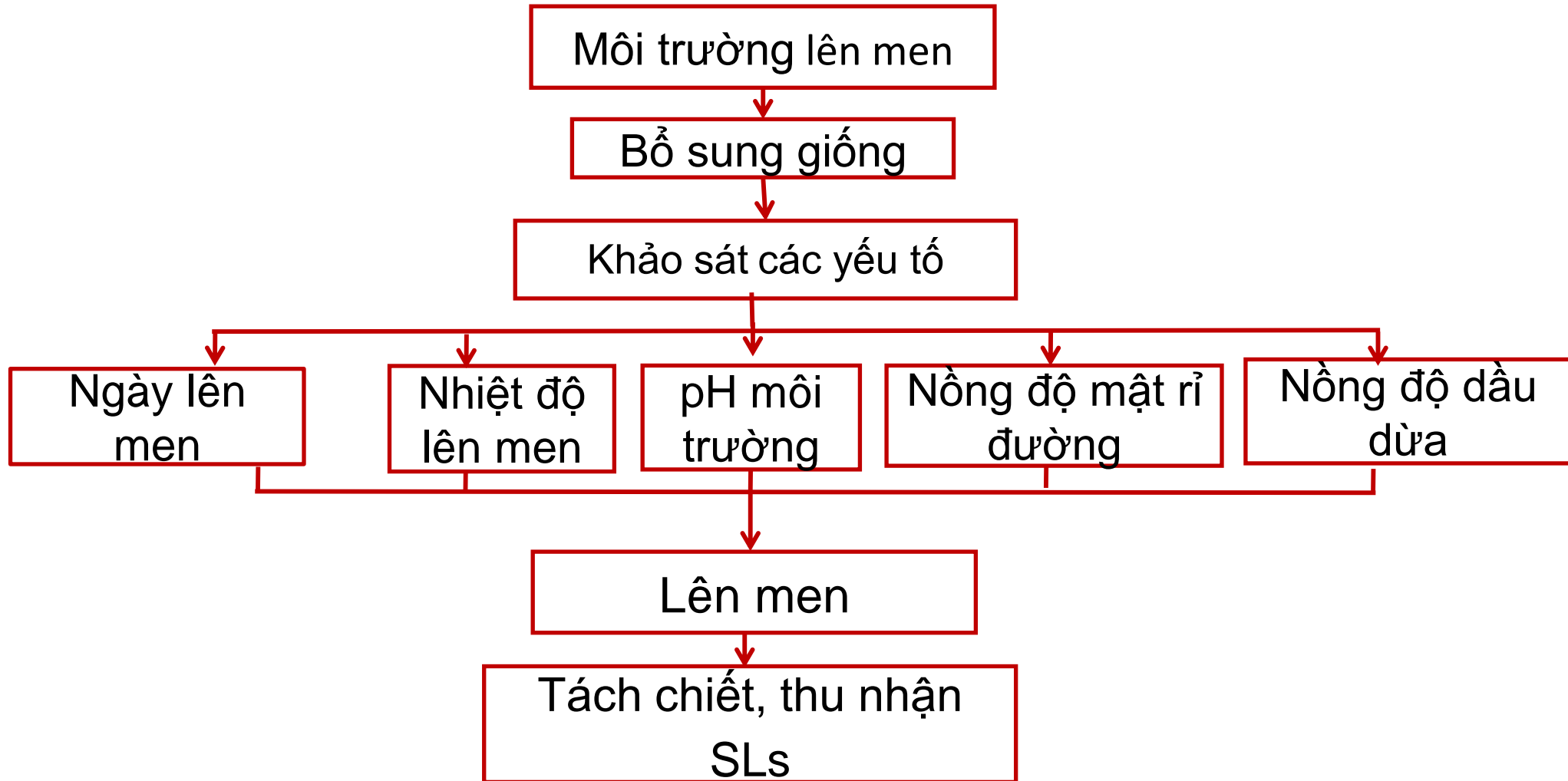
- **Chủng giống:** *Candida bombicola* ATCC 22214 (Đại học Inha, Hàn Quốc)
- **Môi trường hoạt hóa giống:** 3g malt extract; 10g glucose, 3g yeast extract và 5g peptone
- **Môi trường sản xuất sophorolipid (g/l):** 100 g glucose; 5 g yeast extract; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ ; 0,1 g NaCl; 0,1g  $\text{CaCl}_2$ ; 0,7 g peptone và 100g dầu dừa
- **Hóa chất:** n-hexane, ethyl acetate, DPPH, ethanol, chloroform...
- **Chủng thử hoạt tính kháng khuẩn:** *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*

# SƠ ĐỒ THỰC HIỆN



# PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

## Ảnh hưởng của các yếu tố đến lượng SLs



# Thu nhận sophorolipid sau lên men



Dịch sau khi lên men



Ly tâm thu sinh khối tế bào



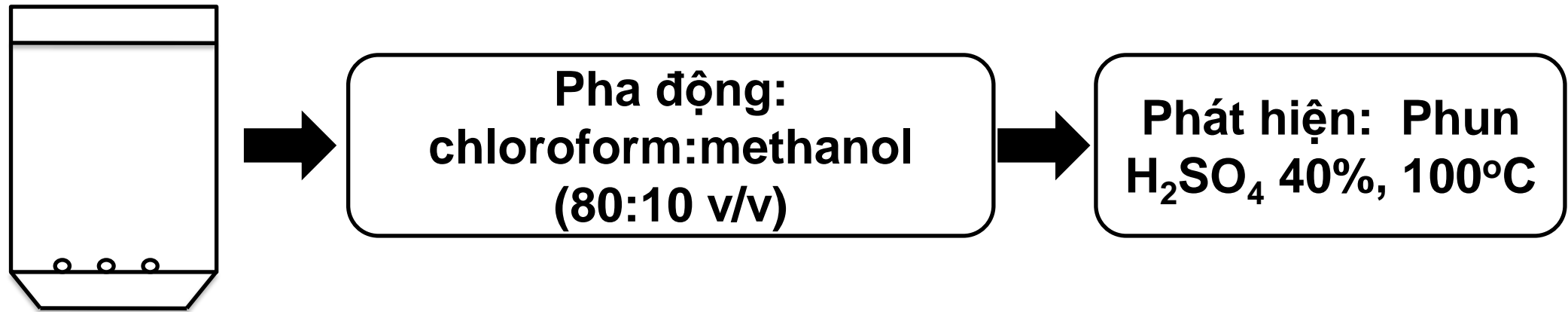
Dịch ly tâm và sinh khối được chiết với:

- Hexane: loại dầu thừa.
- Ethylacetate: hòa tan SLs.

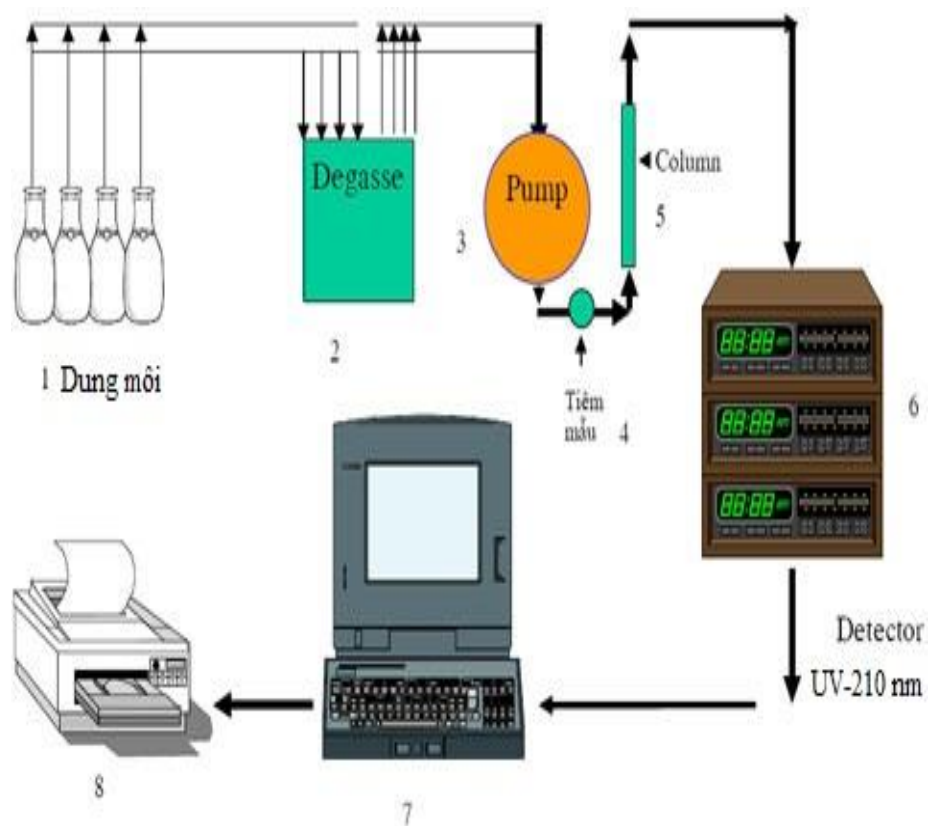


Cô quay loại dung môi, thu nhận SLs

## Định tính sophorolipid bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (TLC)



## Xác định thành phần SLs bằng kỹ thuật HPLC



- Pha tĩnh: cột C18, kích thước 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m.
- Pha động: Methanol/H<sub>2</sub>O
- Đầu dò: UV 210 nm
- Tốc độ dòng: 1ml/phút
- Nhiệt độ: 25  $\pm$  2°C

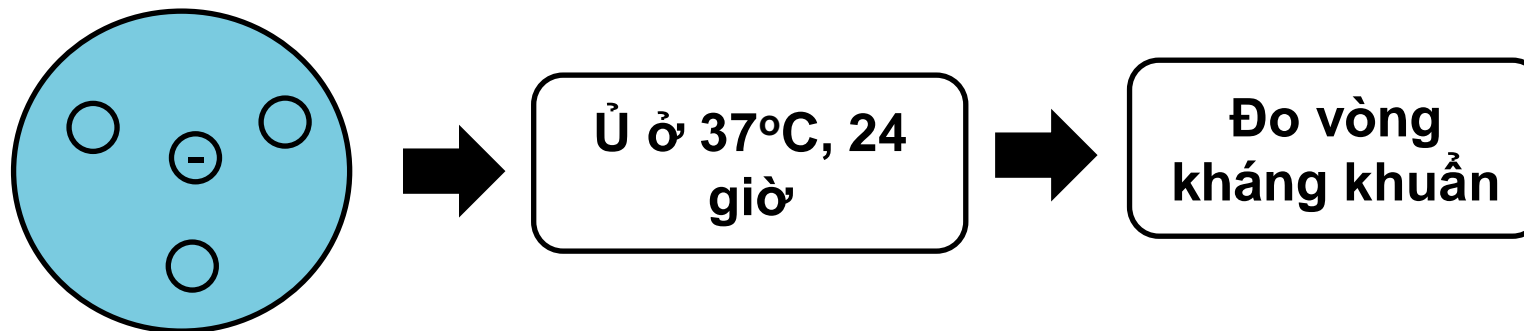


## **Phân tích thành phần acid béo của SLs bằng kỹ thuật sắc ký khí (GC)**

- Gửi mẫu SLs tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TP.HCM (Địa chỉ: 02 Nguyễn Văn Thủ, Phường ĐaKao, Quận 1, TP.HCM).

## Khảo sát khả năng kháng khuẩn

- Các chủng: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*
- Mẫu SLs hòa trong DMSO 10% đạt nồng độ 20 mg/ml
- Đối chứng (-): DMSO 10%

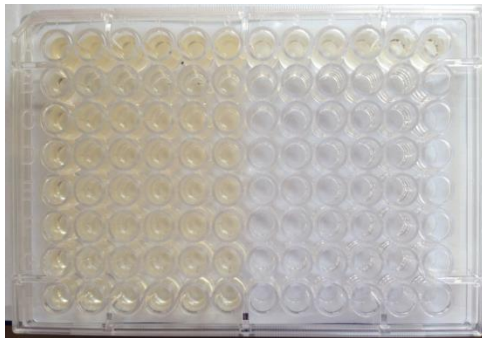


# Xác định nồng độ ức chế tối thiểu bằng phương pháp MIC

- Dịch vi khuẩn → đo OD<sub>600nm</sub>
- Bổ sung dịch SLs ở các nồng độ

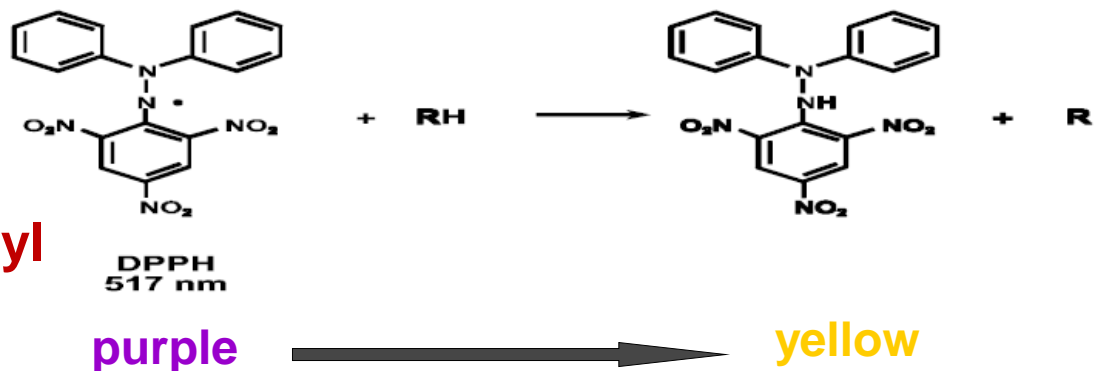
Ủ 37°C, 24 giờ

Đo OD<sub>600nm</sub>



# Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH

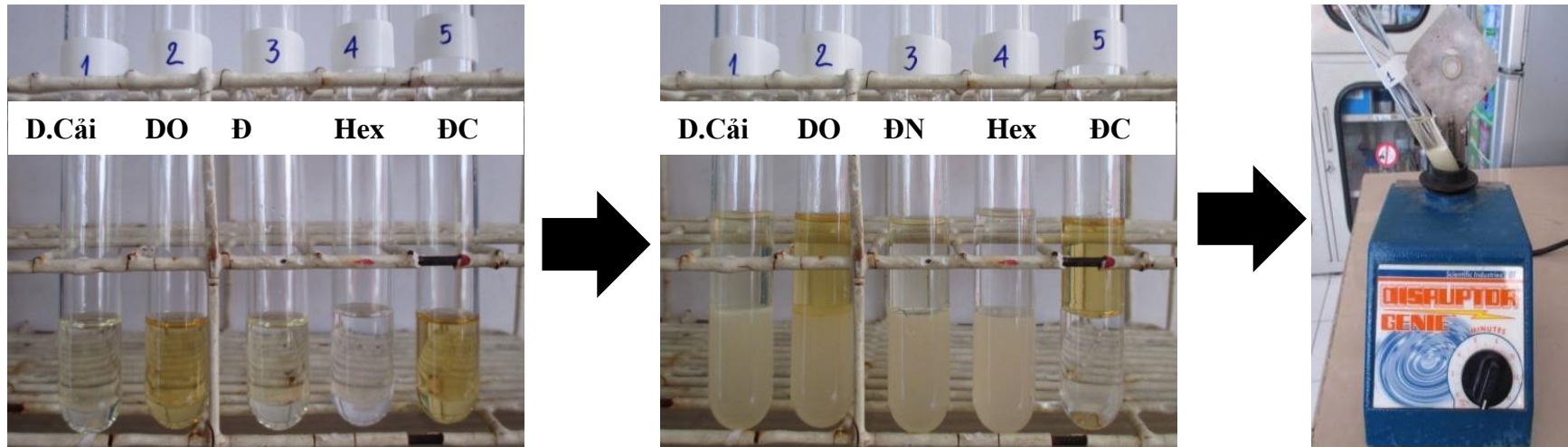
**DPPH**  
**1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl**



$$\% \text{ Chống oxy hóa} = \left(1 - \frac{OD \text{ mẫu}}{OD \text{ đối chứng}}\right) \times 100$$

# VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

## Khảo sát hoạt tính nhũ hóa của SLs



$$\text{Chỉ số nhũ hóa (\%)} (E_{24}) = \frac{\text{Chiều cao của lớp nhũ tương tạo thành}}{\text{Tổng chiều cao của dung dịch}} \times 100$$

## Khảo sát sức căng bề mặt của SLs

- Sử dụng phương pháp vòng Du Nouy, được hỗ trợ tiến hành bởi PTN các hợp chất có hoạt tính sinh học, Đại học Inha, Hàn Quốc.

# VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

## Thử nghiệm lên men ở quy mô bioreactor 5 lít



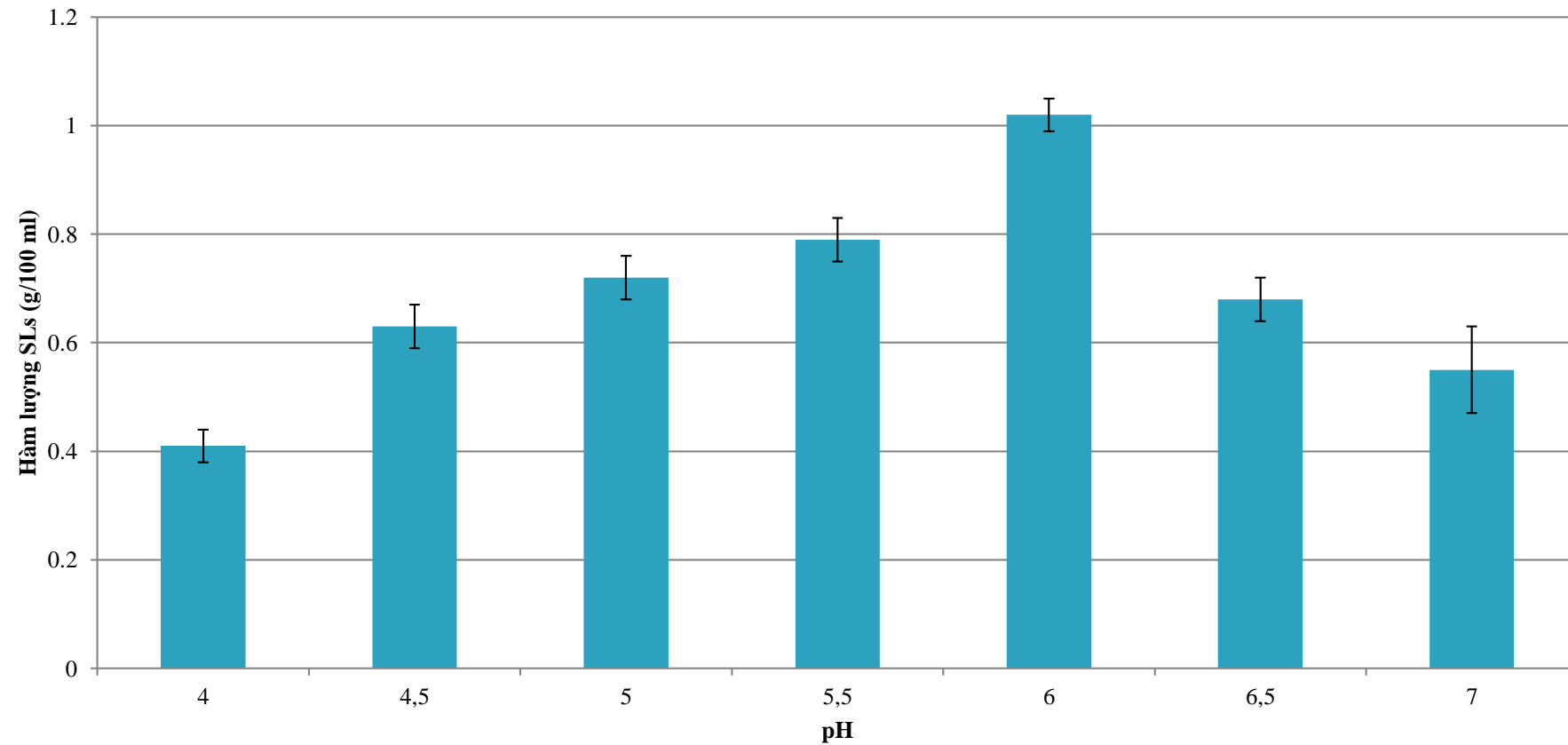
# KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



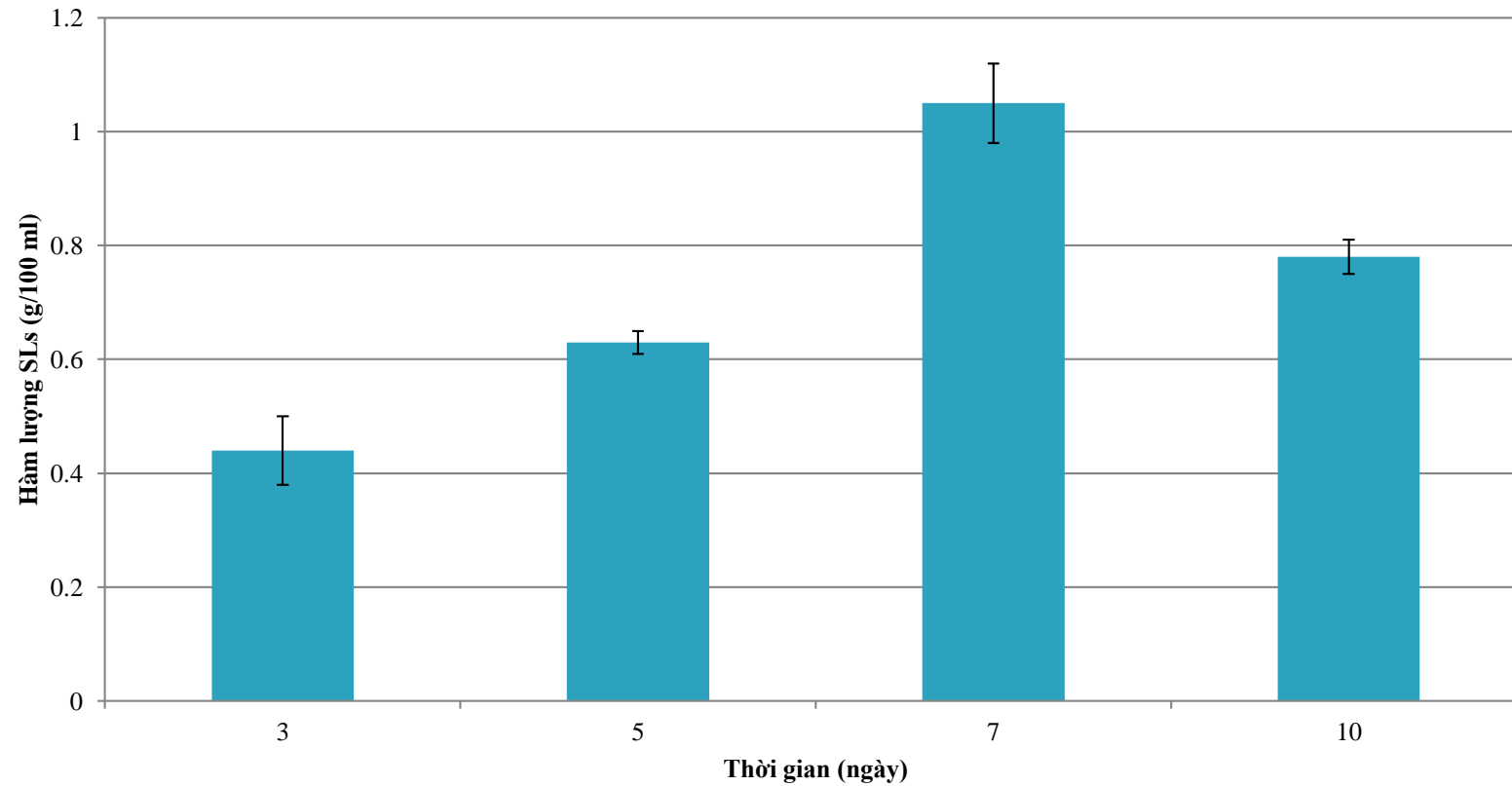
# TỐI ƯU ĐƠN YẾU TỐ

-  pH
-  Thời gian lên men
-  Nhiệt độ
-  Hàm lượng dầu dừa
-  Hàm lượng mật rỉ đường

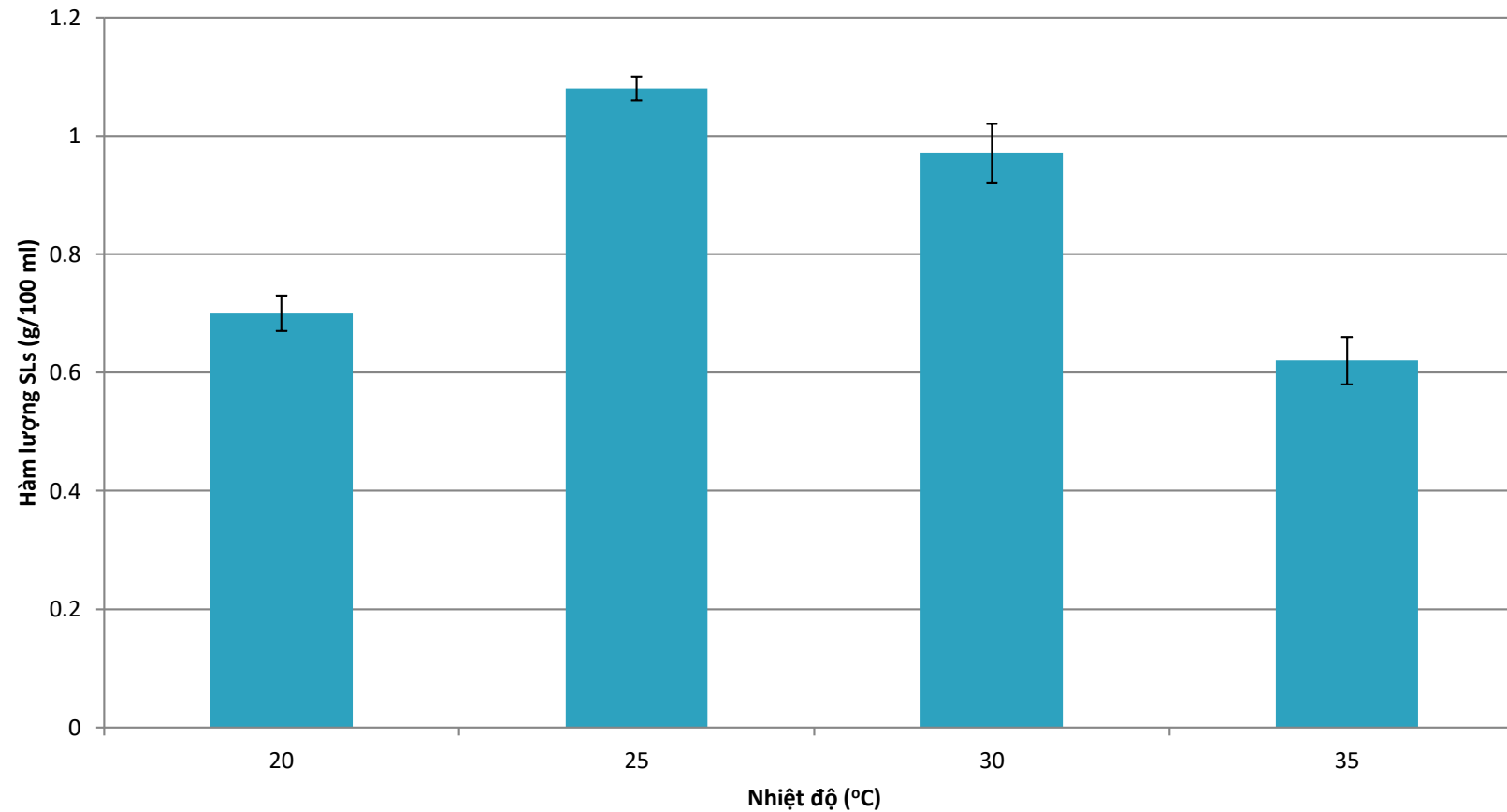
# Ảnh hưởng của pH đến lượng SLs



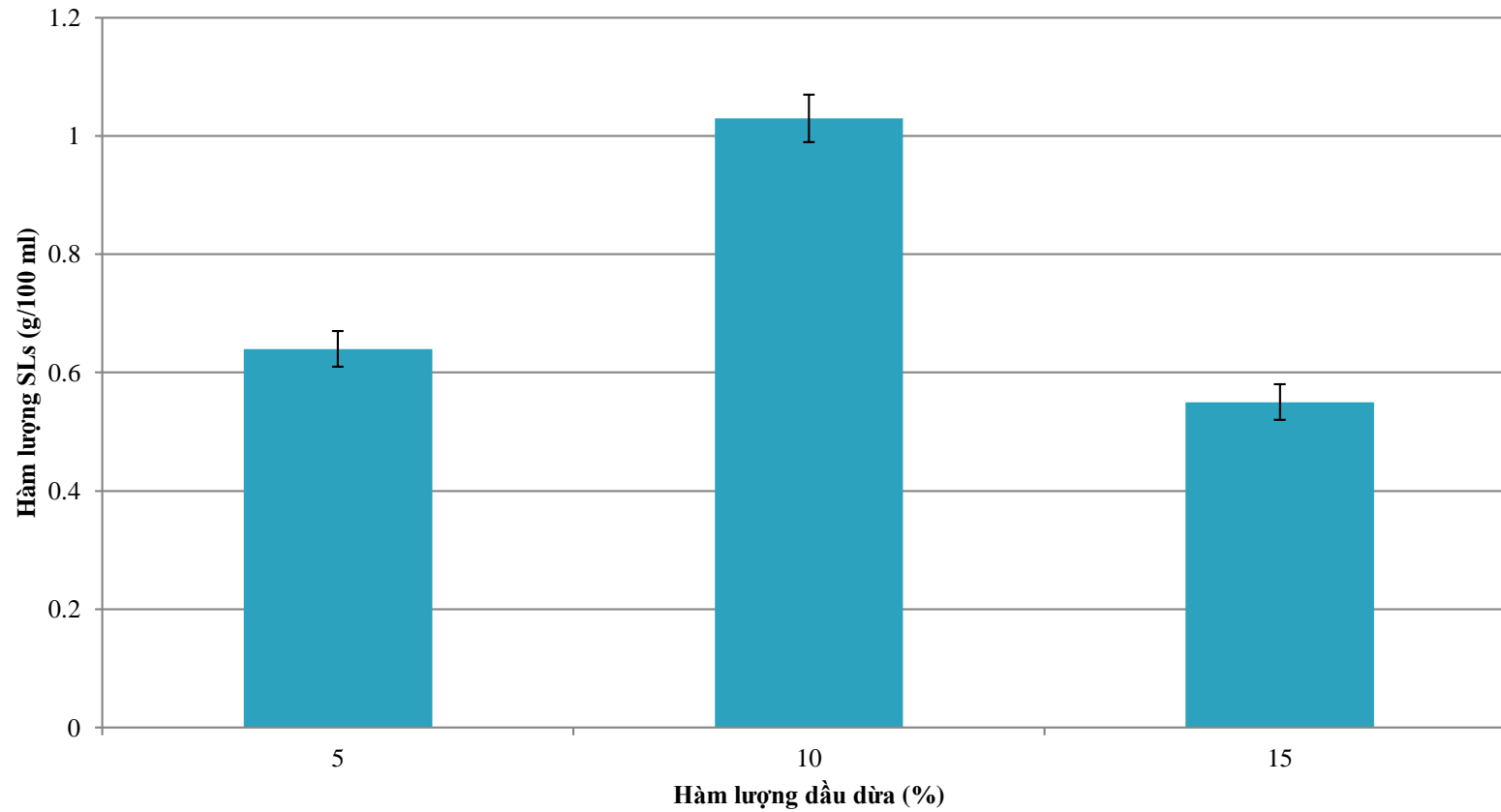
# Ảnh hưởng của thời gian lên men đến lượng SLs



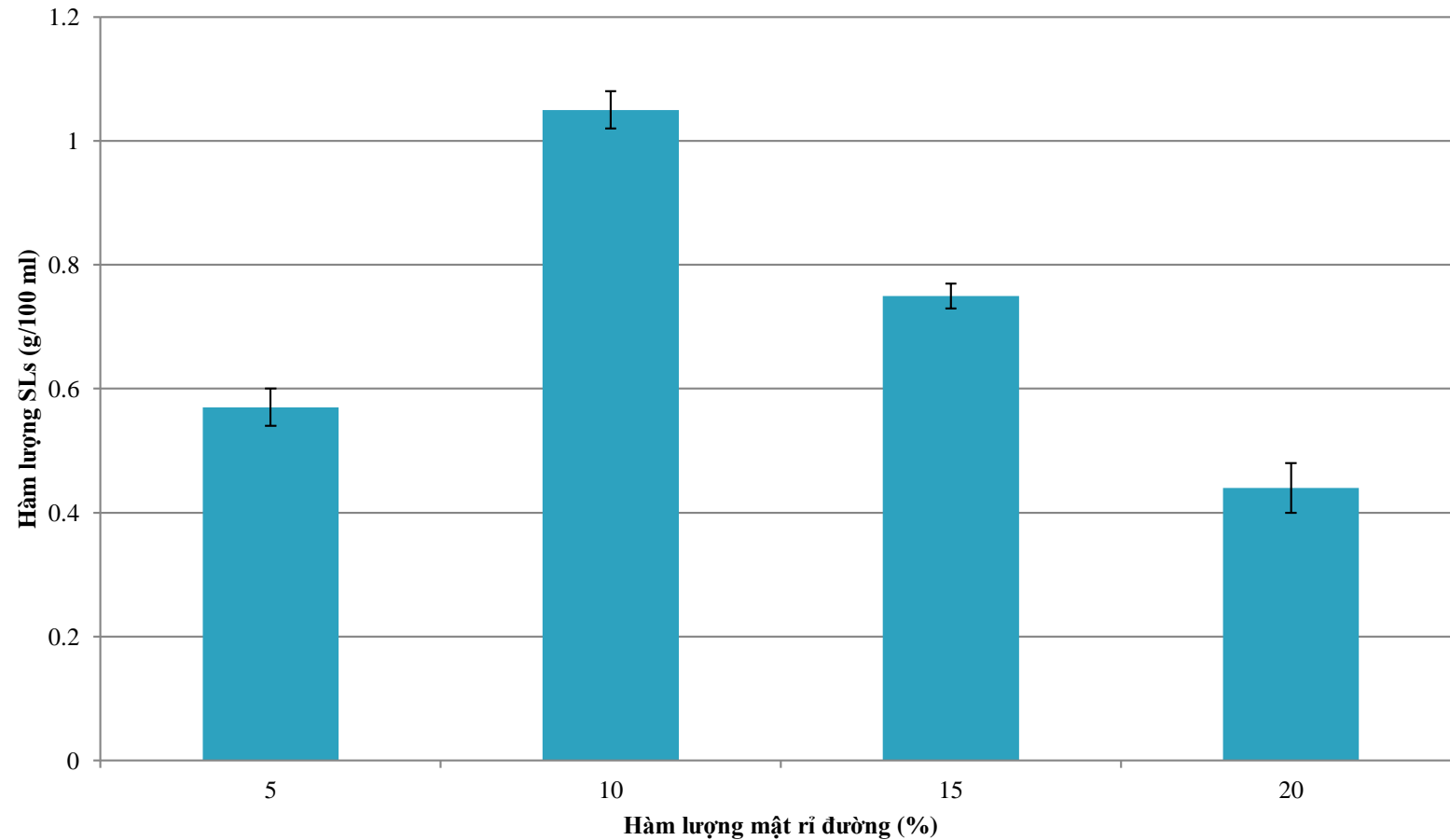
# Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến lượng SLs



# Ảnh hưởng của hàm lượng dầu dừa đến lượng SLs



# Ảnh hưởng của hàm lượng mật rỉ đường đến lượng SLs



# KẾT QUẢ THU NHẬN

- ➔ Nhiệt độ 25°C
- ➔ pH=6
- ➔ Thời gian lên men 7 ngày
- ➔ Hàm lượng mật rỉ đường 10%
- ➔ Hàm lượng dầu dừa 10%

# Kết quả tối ưu hóa các điều kiện lên men thu nhận SLs

Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa theo thiết kế Plackett – Burman.

Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng full factorial design.



# Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa theo thiết kế Plackett – Burman

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		Mức độ ảnh hưởng đến năng suất SLs	
			Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	Prob>F
pH	g/100ml	X <sub>1</sub>	4	7	0,075	0,061
Nhiệt độ	g/100ml	X <sub>2</sub>	20	30	0,044	0,227
Thời gian nuôi	g/100ml	X <sub>3</sub>	3	10	0,168	0,002
Mật rỉ đường	g/100ml	X <sub>4</sub>	5	15	0,108	0,016
Dầu dừa	g/100ml	X <sub>5</sub>	5	15	0,002	0,961

**Kết quả các biến trong ma trận Plackett - Burman**

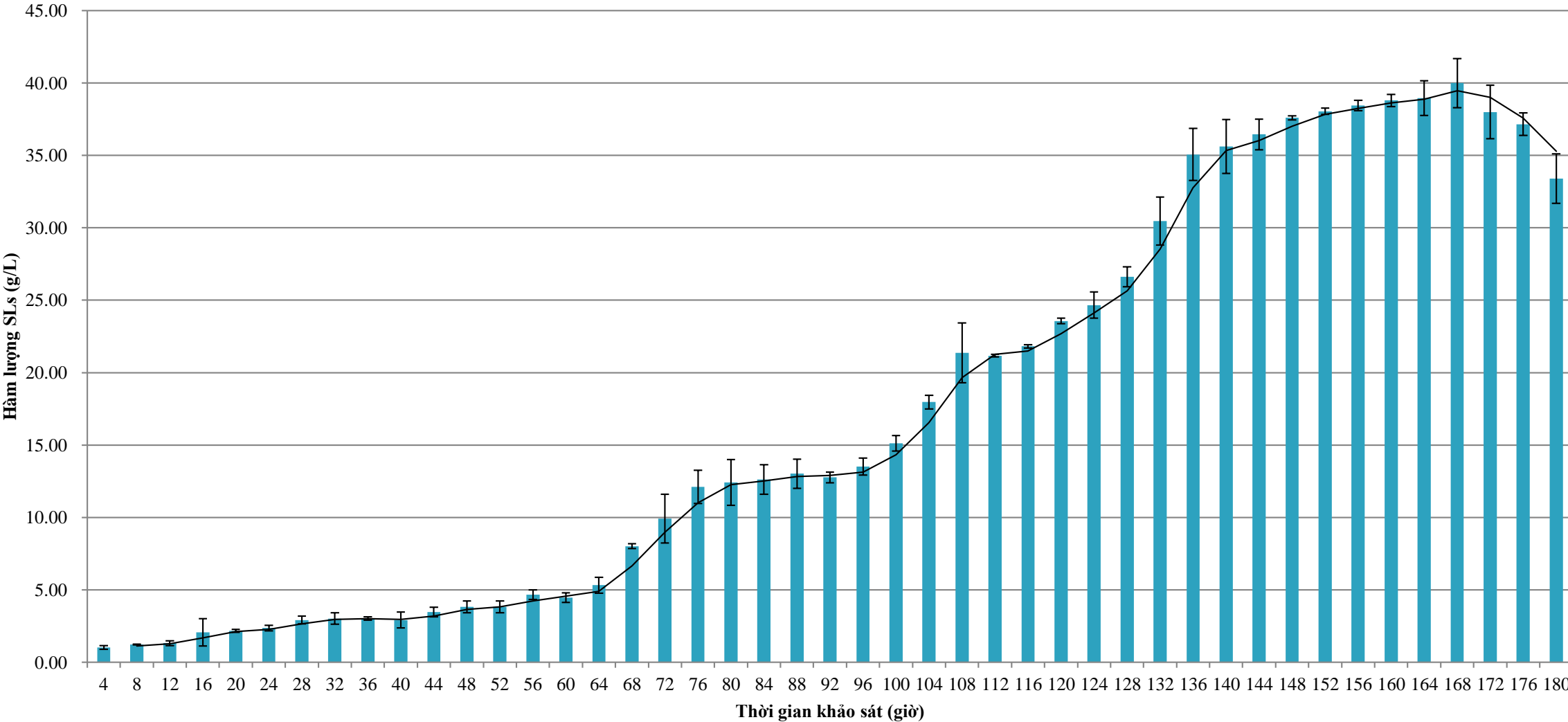
# Kết quả ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett – Burman

Thí nghiệm	Các biến					Lượng SLs thô (g/100ml)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	+1	-1	+1	-1	-1	0,64	0,62
2	+1	+1	-1	+1	-1	0,66	0,61
3	-1	+1	+1	-1	+1	0,67	0,59
4	+1	-1	+1	+1	-1	0,75	0,73
5	+1	+1	-1	+1	+1	0,57	0,61
6	+1	+1	+1	-1	+1	0,65	0,67
7	-1	+1	+1	+1	-1	0,65	0,70
8	-1	-1	+1	+1	+1	0,62	0,65
9	-1	-1	-1	+1	+1	0,54	0,49
10	+1	-1	-1	-1	+1	0,42	0,46
11	-1	+1	-1	-1	-1	0,40	0,42
12	-1	-1	-1	-1	-1	0,37	0,38
13	0	0	0	0	0	1,03	1,03

# Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng full factorial design

Nghiệm thức	Thời gian	Mật rỉ đường	pH	Lượng SLs thô (g/100 ml)	Dự đoán (g/100 ml)
1	5	8	4	0,35	0,35
2	7	8	4	0,58	0,575
3	5	12	4	0,4	0,435
4	7	12	4	0,6	0,63
5	5	8	6	0,87	0,865
6	7	8	6	1,13	1,13
7	5	12	6	0,75	0,75
8	7	12	6	1,14	1,13
9	5	8	4	0,35	0,35
10	7	8	4	0,57	0,575
11	5	12	4	0,47	0,435
12	7	12	4	0,66	0,63
13	5	8	6	0,86	0,865
14	7	8	6	1,12	1,13
15	5	12	6	0,75	0,75
16	7	12	6	1,12	1,13

# Thu lượng SLs sử dụng mật rỉ đường ở quy mô bioreactor



# Kết quả định tính và xác định thành phần của SLs



Định tính bằng kỹ thuật  
TLC và HPLC

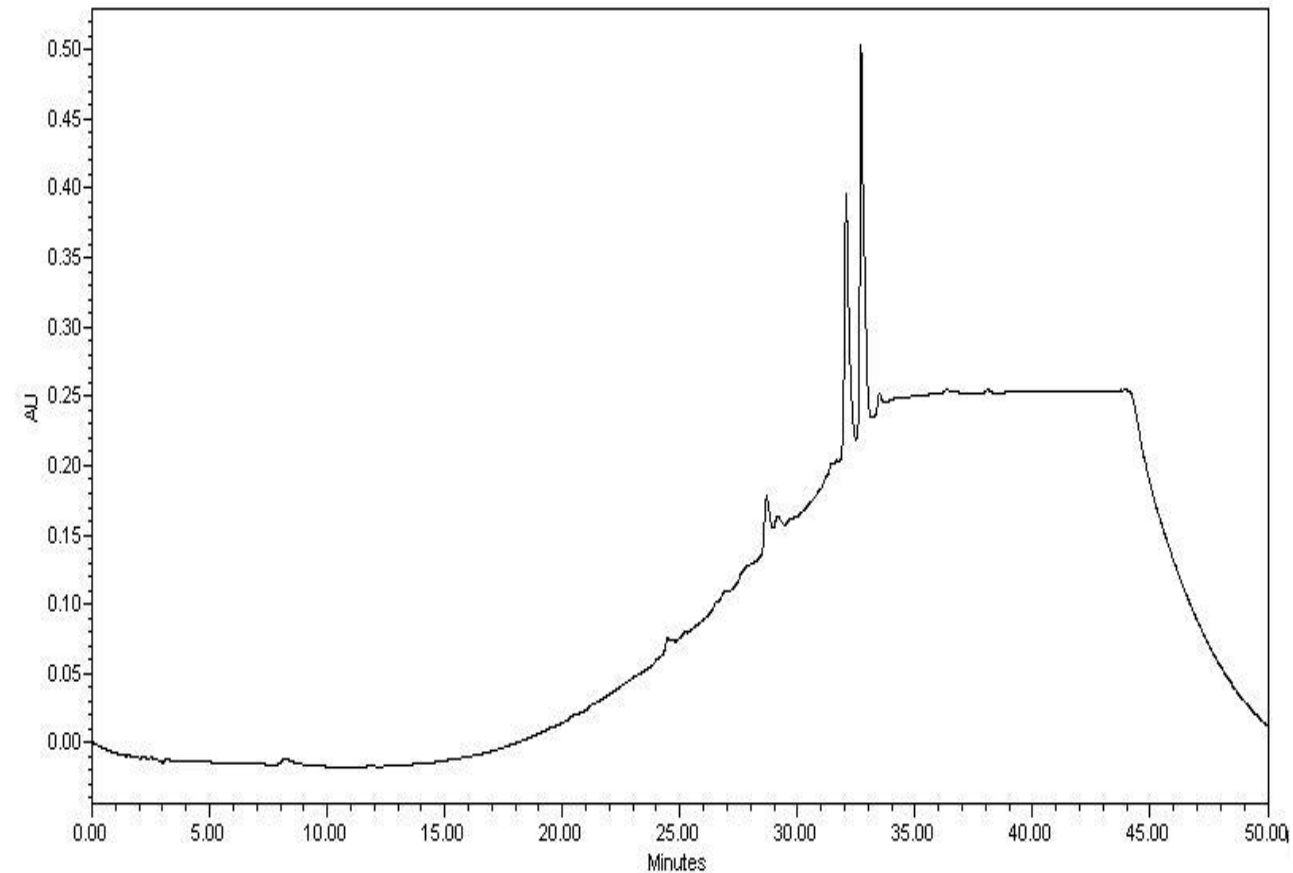
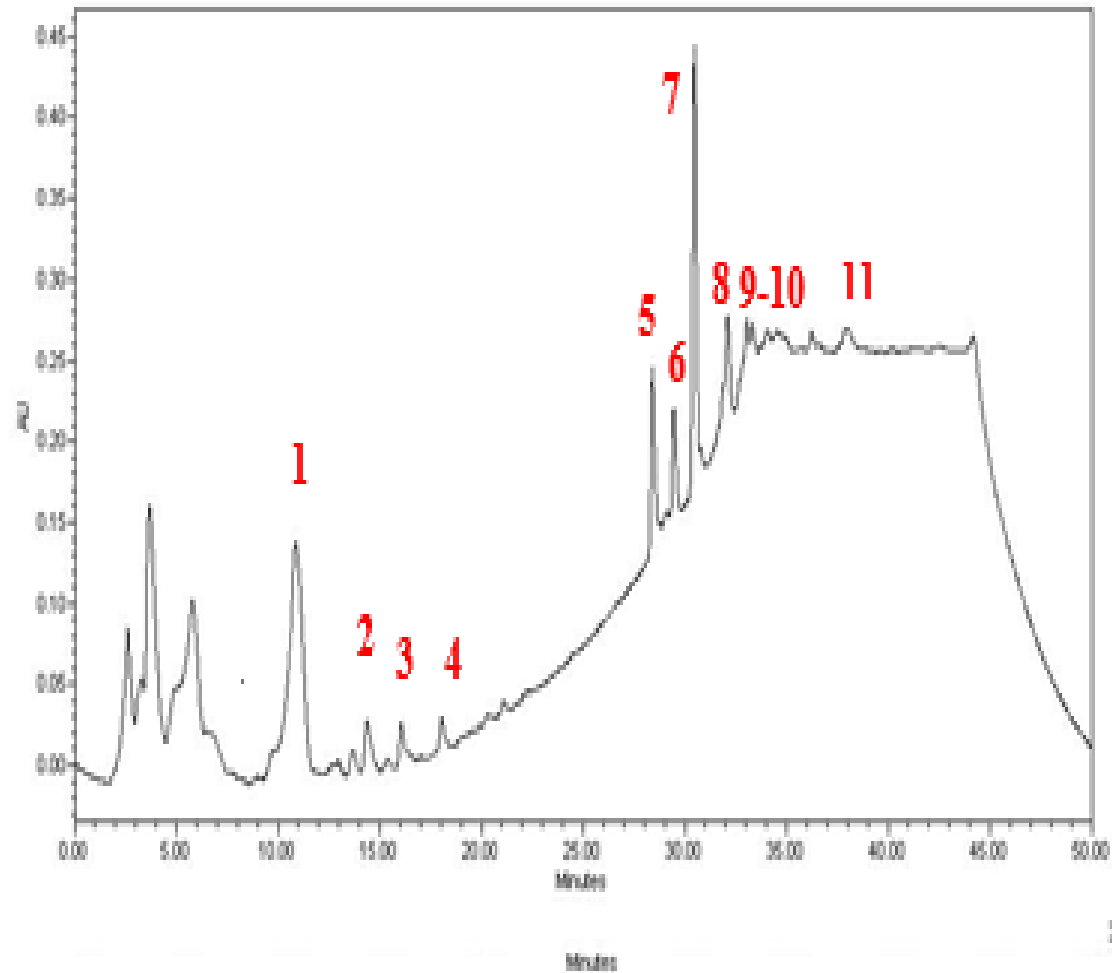


Phân tích thành phần acid  
béo bằng kỹ thuật GC

# Kết quả định tính SLs thô bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (TLC)



# Kết quả định tính SLs thô bằng kỹ thuật HPLC




# Kết quả phân tích thành phần acid béo của SLs thô bằng kỹ thuật sắc ký khí (GC)

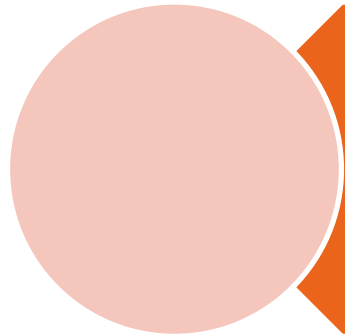
Thành phần acid béo	Đơn vị (% sắc ký đồ)
Caproic acid (C6:0)	0,49
Caprylic acid (C8:0)	6,89
Capric acid (C10:0)	5,99
<b>Lauric acid (C12:0)</b>	<b>48,5</b>
Tridecanoic acid (C13:0)	0,04
<b>Myristic acid (C14:0)</b>	<b>18,96</b>
Palmitic acid (C16:0)	8,91
Stearic acid (C18:0)	3,54
Oleic acid (C18:1)	5,45
Arachidic acid (C20:0)	0,09
Cetelaidic acid (C20:1)	0,04
Behenic acid (C22:0)	0,07



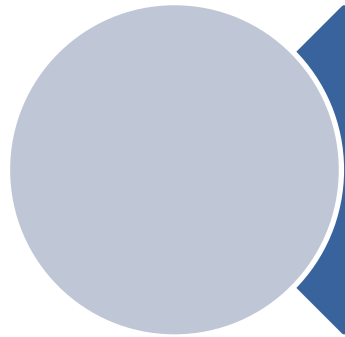
# Kết quả khảo sát một số hoạt tính của SLs

- 
- Khả năng hoạt động bề mặt của SLs thô
  - Khả năng nhũ hóa của SLs thô
  - Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch
  - Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

# Kết quả về khả năng hoạt động bề mặt của SLs thô



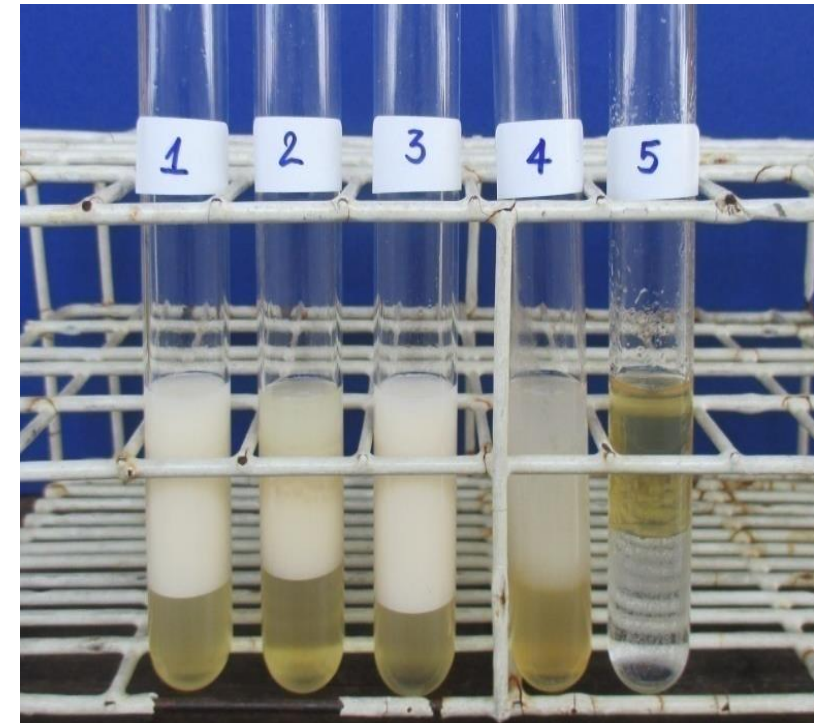
Sử dụng phương pháp vòng Du Nouy được thực hiện bởi phòng thí nghiệm các hợp chất có hoạt tính sinh học, Đại học Inha.



SLs làm giảm sức căng bề mặt của nước từ 72 mN/m xuống còn 40 mN/m với nồng độ SLs từ 1 – 20 mg/ml.

# Kết quả khảo sát khả năng nhũ hóa của hỗn hợp SLs thô

Cơ chất được khảo sát	Chỉ số nhũ hóa ( $E_{24}$ ) (%)
Hexan	$62,5 \pm 0,89$
Dầu DO	$59,23 \pm 0,51$
Dầu hạt cải dầu	$65,18 \pm 0,89$
Dầu đậu nành	$69,64 \pm 0,90$
Nước cất	$0,0 \pm 0,0$



(1) Dầu hạt cải dầu; (2) Dầu DO (0,05% S);  
(3) Dầu đậu nành; (4) Hexan;  
(5) Đối chứng âm: nước cất

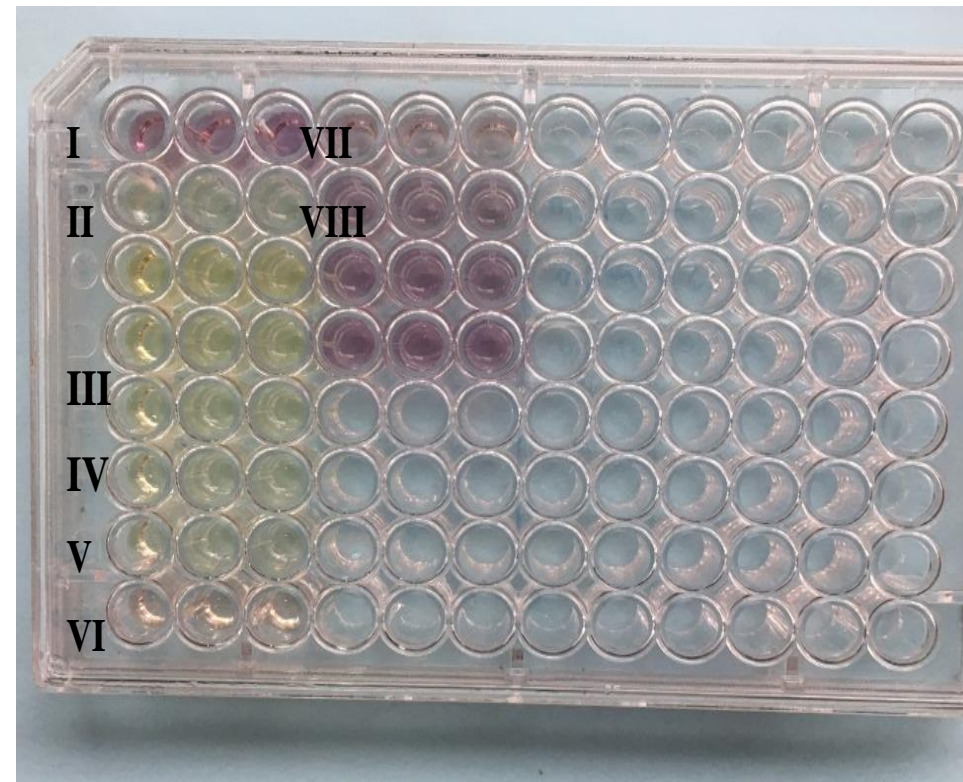
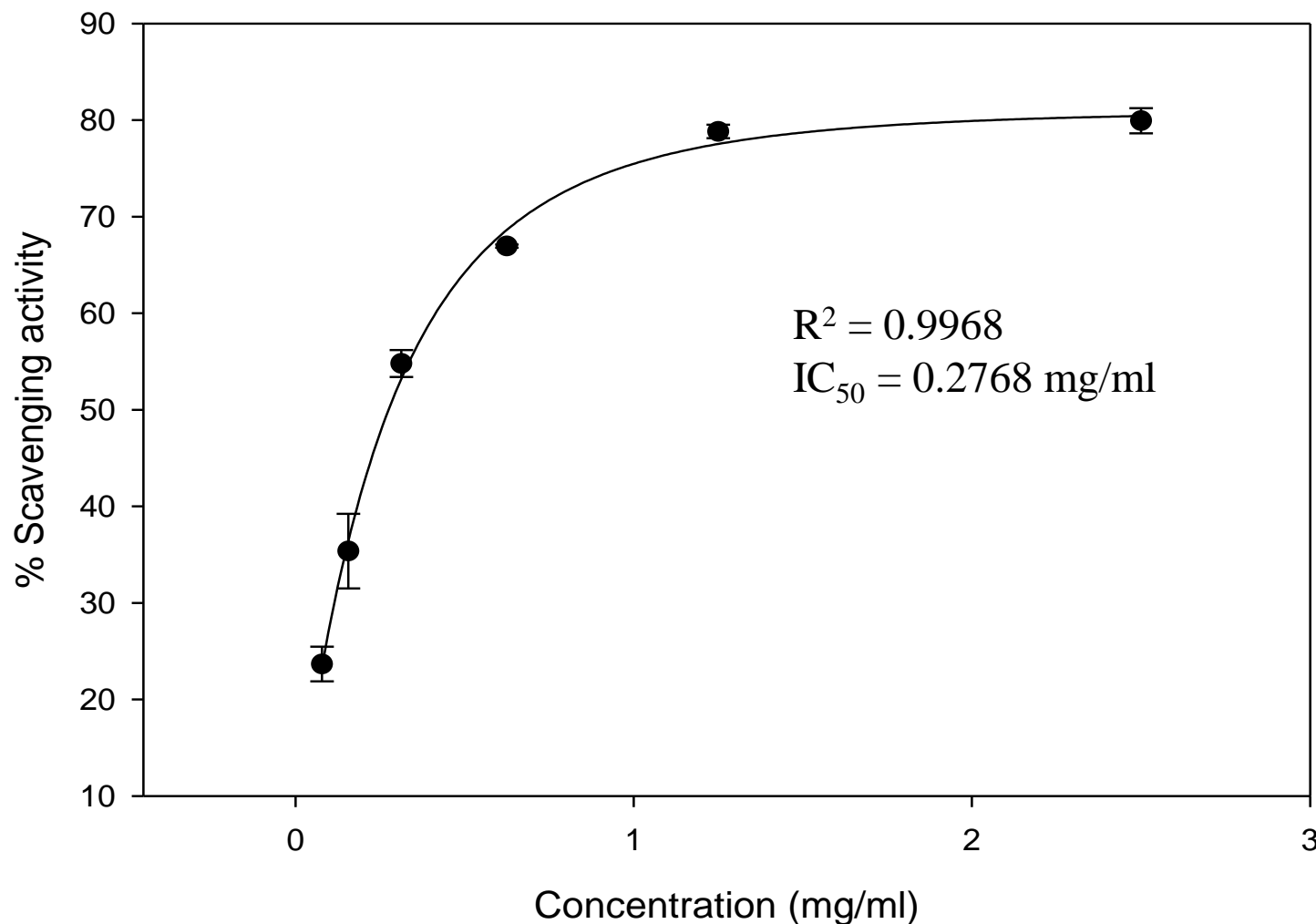
# Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của SLs thô trên đĩa thạch

STT	Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,7 ± 0,57
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	13,0
3	<i>Bacillus subtilis</i>	12,3 ± 0,57
4	<i>Escherichia coli</i>	11,7 ± 0,57

# Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của SLs thô bằng phương pháp MIC

STT	Chủng vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu (mg/ml)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,5
2	<i>Bacillus subtilis</i>	5
3	<i>Escherichia coli</i>	10
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10

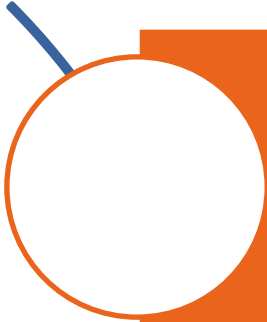
# Kết quả về khả năng kháng oxy hóa của SLs thô



(I) Đối chứng âm; (II) Đối chứng dương;  
Nồng độ SLs thô: (III) 2,5 mg/ml; (IV) 1,25 mg/ml; (V) 0,625 mg/ml;  
(VI) 0,3125 mg/ml ; (VII) 0,15625 mg/ml;  
(VIII) 0,078125 mg/ml.

# **KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ**

# KẾT LUẬN



Điều kiện lên men tối ưu 7 ngày, pH=6, mật rỉ đường là 12% (w/v). Lượng SLs cao nhất khi lên men với hệ thống bioreactor 5 lít là 40 g/l.



SLs thô thu được có sự hiện diện của chuẩn 1', 4'' - Sophorolactone 6', 6'' – diacetate.



Thành phần acid béo trong SLs thô chiếm tỷ lệ chủ yếu là các acid béo có mạch carbon C12 và C14.



# KẾT LUẬN

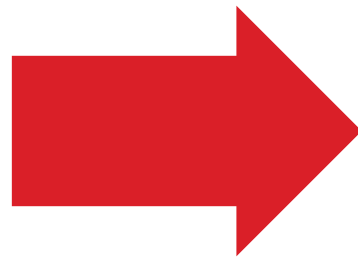
Ước chế sự phát triển của *S. aureus* (4,5 mg/ml), *B. subtilis* (5 mg/ml), *E. coli* và *P. aeruginosa* (10 mg/ml).

SLs thô có hoạt tính chống oxy hóa với  $IC_{50}$  được xác định là 0,2768 mg/ml, có khả năng tạo nhũ với các loại dầu và hexan.

SLs làm giảm sức căng bề mặt của nước từ 72 mN/m xuống 40 mN/m ở nồng độ 20 mg/ml.

# KHUYẾN NGHỊ

Nghiên cứu các cơ chất khác thay thế nguồn cung cấp carbon khác ngoài mật rỉ đường để tìm ra nguồn phế phụ phẩm rẻ tiền khác mang lại hiệu quả cao trong việc làm tăng sản lượng của SLs thu được.



Tinh sạch và xác định cấu trúc của các SLs thu nhận từ hỗn hợp.

**Cám ơn quý Đại biểu và Hội nghị!**