

# Khảo sát điều kiện tách chiết sophorolipid từ dịch lên men *Candida bombicola* và thử nghiệm hoạt tính sinh học

Lê Phước Thọ<sup>1</sup>, Trần Tấn Phát<sup>1</sup>, Dương Thị Thanh Thảo<sup>1</sup>, Lê Thị Thu Hương<sup>1</sup>,  
Nguyễn Hoàng Dũng<sup>2</sup>, Đinh Minh Hiệp<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Bạch Huệ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Sinh học Nhiệt đới

<sup>3</sup>Khu Nông nghiệp Công nghệ cao, TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 29/10/2018; ngày gửi phản biện 1/11/2018; ngày nhận phản biện 30/11/2018; ngày chấp nhận đăng 18/12/2018

## Tóm tắt:

Sophorolipid (SL) là chất hoạt động bề mặt sinh học tiềm năng với khả năng phân giải sinh học cao, độc tính thấp và thân thiện với môi trường, được sản xuất bởi quá trình lên men từ loài nấm men an toàn *Candida bombicola*. Để tách chiết SL từ dịch lên men có hiệu suất và hoạt tính sinh học cao, quy trình tách chiết phù hợp đã được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy, điều kiện phù hợp để tách chiết SL từ dịch lên men *Candida bombicola* là sử dụng hệ dung môi ethyl acetate:dịch lên men 1:1 (v:v); petroleum ether:methanol:dịch lên men 1:1:1 (v:v:v) đạt hiệu suất tách chiết SL từ 90% trở lên và khả năng loại béo đạt 97% trở lên khi tổng hàm lượng SL và dầu đậu nành có trong dịch lên men không vượt quá 20%. Hiệu suất thu hồi các dung môi ethyl acetate (EtAc), methanol (MeOH), petroleum ether (PE) trong quá trình tách chiết SL từ dịch lên men có tổng hàm lượng SL và dầu đậu nành từ 2-20% lần lượt là từ 91-92%, 78-83%, 32-43%. SL có nồng độ 100 mg/ml có khả năng kháng khuẩn tốt nhất đối với *Bacillus spizizenii* (13,67±0,58 mm), tiếp theo là *Staphylococcus aureus* (12,67±1,15 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (11,33±0,58 mm) và *Escherichia coli* (9,67±0,58 mm). Khả năng chống oxy hóa của SL đạt giá trị IC<sub>50</sub> là 6,024 mg/ml. Các kết quả trên cho thấy tiềm năng cao của SL cho các ứng dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm, chất tẩy rửa và các ứng dụng thương mại khác liên quan đến chất hoạt động bề mặt.

**Từ khóa:** *Candida bombicola*, chống oxy hoá, dung môi, kháng khuẩn, sophorolipid, tách chiết.

**Chỉ số phân loại:** 2.8

## Đặt vấn đề

SL là chất hoạt động bề mặt sinh học thuộc nhóm glycolipid, là những phân tử lưỡng cực gồm một nhóm disaccharide sophorose liên kết với gốc hydroxyl của carbon kề cuối mạch trong chuỗi acid béo C16-C18 [1]. Tác dụng chính của SL là khả năng làm giảm sức căng bề mặt giữa chất lỏng và chất lỏng, chất rắn hoặc chất khí, do đó chúng có thể kết hợp và phân tán dễ dàng trong nước hoặc các chất lỏng khác. SL có những ưu điểm so với các chất hoạt động bề mặt hóa học đang được sử dụng như: khả năng phân hủy sinh học, có độc tính thấp, có tính dung hợp sinh học và tính tiêu hóa được, tính hiệu quả ở các điều kiện cực đoan về nhiệt độ, pH và muối [2]. Thông thường SL thu nhận được sẽ tồn tại ở dạng hỗn hợp chính là lactone và acid. SL dạng lactone có khả năng làm giảm sức căng bề mặt và hoạt tính kháng khuẩn tốt, trong khi đó dạng acid có thể tạo bọt và hòa tan tốt. Hơn nữa, gốc acetyl làm cho các phân tử SL ít tan trong nước nhưng lại tăng cường hiệu quả kháng virus và kháng cytokine của chúng [3].

SL được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực như thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm, chất tẩy rửa [4]. Những nghiên cứu gần đây ghi nhận một số ứng dụng cụ thể của SL. SL được bổ sung

vào trong bột giặt với vai trò là chất tẩy rửa [5], khả năng tạo nhũ của SL được ứng dụng trong các ngành hóa dầu. Chúng được sử dụng trong việc thu hồi các sản phẩm dầu thứ cấp, loại bỏ thành phần hydrocarbon trong dầu thô. SL được sử dụng để xử lý đất và nước bề bị nhiễm hydrocarbon, hấp thu các kim loại nặng có trong trầm tích và cải thiện chất lượng bột mì trong thực phẩm [5, 6]. SL có khả năng kháng khuẩn trong việc trị mụn, trị gàu và mùi hôi cơ thể, bảo vệ da và tóc, kích thích sự biến dưỡng của các tế bào fibroblast trong biểu mô, kích thích quá trình tổng hợp collagen làm cho da săn chắc [7, 8]. SL còn có khả năng ức chế các gốc tự do, ức chế hoạt động của enzyme elastase gây lão hóa, thúc đẩy quá trình làm liền da và làm trắng da [9]. Các SL diacetyl lactone có khả năng tiêu diệt nhiều dòng tế bào khác nhau như dòng tế bào ung thư gan H7402, giảm tỷ lệ chết do shock nhiễm khuẩn trên mô hình chuột [10, 11], ức chế quá trình phát triển của tế bào ung thư bạch cầu [12].

Nhờ vào những đặc tính ưu việt và tiềm năng ứng dụng SL trong nhiều lĩnh vực khác nhau, trên thế giới, việc nghiên cứu phát triển sản phẩm từ SL hiện nay đang được nhiều nhóm nghiên cứu tiến hành đăng ký sáng chế và một số đã được thương mại hóa. Tuy nhiên, tại Việt Nam, những công trình liên

\*Tác giả liên hệ: Email: ntbhue@hcmus.edu.vn

# Study on effective conditions for sophorolipid extraction from *Candida bombicola* fermentation broth and testing its biological activity

Phuoc Tho Le<sup>1</sup>, Tan Phat Tran<sup>1</sup>, Thi Thanh Thao Duong<sup>1</sup>,  
Thi Thu Huong Le<sup>1</sup>, Hoang Dung Nguyen<sup>2</sup>,  
Minh Hiep Dinh<sup>3</sup>, Thi Bach Hue Nguyen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh city

<sup>2</sup>Institute of Tropical Biology

<sup>3</sup>Agricultural Hi-tech Park of Ho Chi Minh city

Received 29 October 2018; accepted 18 December 2018

## Abstract:

Sophorolipid (SL) is a potential biosurfactant due to its biodegradability, low toxicity and eco-friendly criteria, produced by *Candida bombicola*, a non-pathogenic yeast. To extract SL from fermentation broth efficiently, a study on effective conditions for SL extraction from *Candida bombicola* fermentation broth was conducted. The result showed that the optimal conditions for extracting SL from the fermentation broth included ethyl acetate:fermentation broth 1:1 (v:v) and petroleum ether:methanol:fermentation broth 1:1:1 (v:v:v) with the SL extraction efficiency and fat removal capacity from 90% and 97%, respectively, while the total SL and soybean oil in the fermentation broth did not exceed 20%. The recovery performance of such solvents as ethyl acetate (EtAc), methanol (MeOH), petroleum ether (PE) in SL extraction process were from 91-92%, 78-83%, 32-43%, respectively (with the contents of SL and soybean oil from 2 to 20%). The obtained SL at the concentration of 100 mg/ml showed a high antimicrobial activity, the highest resistance to *Bacillus spizizenii* (13.67±0.58 mm), then relatively high resistance to *Staphylococcus aureus* (12.67±1.15 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (11.33±0.58 mm) and *Escherichia coli* (9.67±0.58 mm). The antioxidant capacity of SL was performed with an IC<sub>50</sub> of 6.024 mg/ml. These results indicate that SL is one of the most promising microbial biosurfactant with highly potential applications in cosmetics, detergents and other commercial applications related to surfactants.

**Keywords:** antibacterial, antioxidant, *Candida bombicola*, extraction, solvent, sophorolipid.

**Classification number:** 2.8

quan đến việc sản xuất các chất hoạt động bề mặt có nguồn gốc sinh học nói chung và SL nói riêng vẫn chưa được nghiên cứu thấu đáo. Hiện nay, chưa có nhóm nghiên cứu nào nghiên cứu xây dựng quy trình tách chiết để thu nhận SL từ quá trình lên men *C. bombicola* với hiệu suất thu nhận SL cao, chi phí thấp, SL thu được có độ an toàn, không độc hại, có hoạt tính sinh học tốt. Chính vì vậy nghiên cứu này sẽ tập trung nghiên cứu điều kiện tách chiết SL đáp ứng được các yêu cầu trên.

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Vật liệu

Chủng gốc nấm men *C. bombicola* ATCC 22214 được cung cấp ở dạng đông khô bởi GS Kim Eun-Ki, Đại học Inha, Hàn Quốc. Chủng được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường yeast malt extract (YM); 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 1',4"-sophorolactone 6',6"-diacetate được cung cấp bởi Công ty hóa chất Sigma (St. Louis, Mỹ). Các dung môi hữu cơ: MeOH, EtAc, PE, hexan được cung cấp bởi Công ty hóa chất Xilong (Trung Quốc). Nguồn dầu đậu nành Simply được sản xuất bởi Công ty TNHH dầu thực vật Cái Lân; các chủng vi sinh vật để làm thử nghiệm kháng khuẩn được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Tạo nguồn nguyên liệu để nghiên cứu:

Hoạt hóa chủng *C. bombicola* trước khi lên men: nấm men *C. bombicola* dạng đông khô được hoạt hóa trong môi trường yeast malt extract (YM), sau 48 giờ dịch nhân giống cấp 1 được cấy chuyển để nhân giống cấp 2; điều kiện hoạt hóa chủng *C. bombicola*: nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút, thời gian 48 giờ. Dịch giống cấp 2 được sử dụng cho việc lên men tạo nguồn nguyên liệu nghiên cứu.

Lên men *C. bombicola* trong erlen 250 ml: giống *C. bombicola* được cấy vào erlen 250 ml chứa 50 ml dịch môi trường; thành phần trong 1 lít môi trường gồm: glucose 100 g, cao nấm men 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 g, NaCl 0,1 g, peptone 0,7 g, dầu ăn 5% (v/v) để lên men trong 7 ngày, tốc độ lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ là 28°C.

*Xây dựng quy trình phù hợp để tách chiết SL từ dịch lên men C. bombicola:*

Thí nghiệm khảo sát hệ dung môi và tỷ lệ dung môi để tách chiết SL từ dịch lên men *C. bombicola* (bảng 1): tiến hành bố trí thí nghiệm 2 yếu tố kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên để khảo sát hệ dung môi và tỷ lệ dung môi để tách chiết SL từ dịch lên men *C. bombicola* (mỗi erlen chứa 50 ml dịch lên men đã chuẩn bị trước). Dịch nuôi cấy được thêm EtAc (theo 5 tỷ lệ như bảng 1, lặp lại 2 lần), sau đó được ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch nổi rồi đem cô quay chân không ở 40°C để loại EtAc ở áp suất 240 mPa. Tiếp theo, thêm hỗn hợp dung dịch PE:MeOH hoặc Hexan:MeOH (theo 5 tỷ lệ như bảng 1,

lặp lại 2 lần) thu nhận lớp dưới (gồm SL thô và MeOH), sau đó đem cô quay chân không ở 40°C để loại bỏ MeOH ở áp suất 330 mPa và cân xác định khối lượng SL thô thu được.

**Bảng 1. Các nghiệm thức của thí nghiệm khảo sát hệ dung môi và tỷ lệ dung môi để tách chiết SL từ dịch lên men *C. bombicola*.**

Yếu tố B (hệ dung môi)	Yếu tố A (tỷ lệ dung môi:dịch lên men)				
	A1 (1:3)	A2 (1:2)	A3 (1:1)	A4 (2:1)	A5 (3:1)
B1 (EtAc:Hexan/MeOH)	A1B1	A2B1	A3B1	A4B1	A5B1
B2 (EtAc:PE/MeOH)	A1B2	A2B2	A3B2	A4B2	A5B2

Định tính SL bằng sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography - TLC): mẫu SL thô được chấm lên bản sắc ký, pha động được sử dụng là chloroform:MeOH:H<sub>2</sub>O với tỷ lệ 80:10:2 (v:v:v) khoảng 30 phút. Hợp chất 1',4"-sophorolactone 6',6"diacetate được sử dụng làm chất chuẩn. Sau khi giải ly, bản sắc ký được phun acid sulphuric 90% và sấy khô ở 100°C nhằm quan sát và xác định các vết trên bản mỏng.

Định tính SL bằng phương pháp phân tích phổ hồng ngoại (Infrared spectroscopy - IR): các mẫu SL dạng acid và dạng lactone đã phân tách qua sắc ký cột silicagel (240-400 mesh, 40-63 μm) theo cơ chế sau: dạng lactone là các phân tử mạch vòng, kém phân cực so với dạng acid tự do, nên dạng acid sẽ có ái lực mạnh hơn so với dạng lactone. Khi sử dụng hệ dung môi cloroform:MeOH với tỷ lệ 9,4:0,6 (v:v) dạng lactone dễ dàng được dung môi kéo theo, sau một thời gian, thu được dạng lacton trước, sau đó đến dạng acid. Cả 2 dạng được làm khô dung môi, đựng trong các vial được gửi đi phân tích phổ hồng ngoại bằng máy đo quang phổ hồng ngoại tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

Thí nghiệm khảo sát sự ảnh hưởng của hàm lượng SL và dầu đậu nành có trong dịch lên men đến hiệu suất tách chiết SL và hiệu suất thu hồi dung môi của quy trình (bảng 2): tiến hành bố trí thí nghiệm 2 yếu tố kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên để khảo sát sự ảnh hưởng của hàm lượng SL và dầu đậu nành có trong dịch lên men đến hiệu suất tách chiết SL và hiệu suất thu hồi dung môi của quy trình. Dịch nuôi cấy (đã loại bỏ SL và dầu đậu nành) được thêm SL từ 1-15% và dầu đậu nành từ 1-10%, tiến hành quy trình tách chiết như thí nghiệm trước đã xây dựng. Chỉ tiêu theo dõi là hiệu suất thu nhận SL, khả năng loại bỏ dầu đậu nành, hiệu suất thu hồi các dung môi.

**Bảng 2. Các nghiệm thức của thí nghiệm khảo sát sự ảnh hưởng của hàm lượng SL và dầu đậu nành có trong dịch lên men đến hiệu suất tách chiết SL và hiệu suất thu hồi dung môi của quy trình.**

Yếu tố D (hàm lượng dầu đậu nành)	Yếu tố C (hàm lượng SL)			
	C1 (1%)	C2 (5%)	C3 (10%)	C4 (15%)
D1 (1%)	C1D1	C2D1	C3D1	C4D1
D2 (5%)	C1D2	C2D2	C3D2	C4D2
D3 (10%)	C1D3	C2D3	C3D3	C4D3

Xác định hoạt tính kháng khuẩn: hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spizizenii*, *Pseudomonas aeruginosa* được cấy trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB), chứng dương sử dụng là kháng sinh gentamicin (100 μg/ml), chứng âm là MeOH 90% hút 20 μl mẫu SL 100 mg/ml cho vào các đĩa giấy đã được đặt sẵn trên đĩa môi trường và ủ ở 37°C trong 1-2 ngày rồi quan sát vòng kháng khuẩn.

Xác định hoạt tính chống oxy hóa: hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [13]. Mẫu SL thô được hòa trong MeOH thành nhiều nồng độ, hút 100 μl mẫu nạp vào các giếng trên đĩa 96 giếng, thêm 100 μl dung dịch DPPH 300 μM và trộn đều. Mẫu được ủ ở 37°C trong 30 phút, sau đó tiến hành xác định màu bằng máy đọc ELISA và ghi nhận phần trăm chống oxy hóa tương ứng với mỗi nồng độ. Từ đó, xác định đường biểu diễn thể hiện mối liên hệ giữa nồng độ chất và phần trăm chống oxy hóa tương ứng của SL. Phần trăm bắt gốc tự do được tính theo công thức: % chống oxy hóa = (1 - OD mẫu/OD đối chứng) x 100. Sử dụng chứng dương là vitamin C (200 μg/ml), chứng âm là MeOH.

**Kết quả và thảo luận**

*Kết quả xây dựng quy trình phù hợp để tách chiết SL từ dịch lên men C. bombicola và kết quả khảo sát hệ dung môi và tỷ lệ dung môi để tách chiết SL từ dịch lên men C. bombicola* (bảng 3)

Quy trình tách chiết sử dụng hệ dung môi EtAc-MeOH:PE hoặc EtAc-MeOH:Hexan cho kết quả tương tự nhau ở các nghiệm thức, trong khi đó n-hexan là dung môi khá độc, được phân loại là chất gây ô nhiễm môi trường bởi Cơ quan Bảo vệ môi trường Hoa Kỳ (Environmental Protection Agency - EPA) và là chất độc thần kinh bởi Trung tâm Phòng chống dịch bệnh Hoa Kỳ (Center for Disease Control and Prevention - CDC), vì vậy dung môi PE sẽ được lựa chọn cho quy trình tách chiết SL từ dịch lên men. Các tỷ lệ dung môi:dịch lên men 1:1; 2:1; 3:1 (v:v) cho hiệu quả tách chiết SL là tương tự nhau, nên để tiết kiệm lượng dung môi sử dụng thì tỷ lệ dung môi:dịch lên men 1:1 (v:v) là phù hợp.

Nghiệm thức A3B2 sử dụng hệ dung môi EtAc-MeOH:PE trong quá trình tách chiết, tỷ lệ dung môi:dịch lên men với tỷ lệ 1:1 (v:v) có khả năng tách chiết SL cao nhất với khối lượng là 2,1722 g/50 ml dịch lên men, tuy nhiên các nghiệm thức A3B1, A4B2 có khối lượng SL thu được không có sự khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức A3B2. Tuy nhiên, để tiết kiệm lượng dung môi sử dụng, cũng như để đảm bảo SL thu nhận được là an toàn, không độc hại thì nghiệm thức A3B2 là phù hợp nhất để tách chiết SL từ dịch lên men.

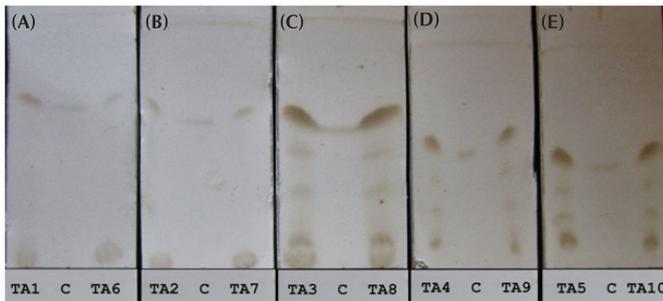
**Bảng 3. Kết quả khảo sát hệ dung môi và tỷ lệ dung môi để tách chiết SL từ dịch lên men *C. bombicola*.**

Nghiệm thức	Khối lượng SL (g/50 ml dịch lên men)	Nghiệm thức	Khối lượng SL (g/50 ml dịch lên men)
A1B1 (TA1)	0,1074 <sup>±</sup> 0,0179	A1B2 (TA6)	0,0898 <sup>±</sup> 0,0169
A2B1 (TA2)	1,4911 <sup>±</sup> 0,0826	A2B2 (TA7)	1,7504 <sup>±</sup> 0,1044
A3B1 (TA3)	2,1259 <sup>±</sup> 0,0240	A3B2 (TA8)	2,1722 <sup>±</sup> 0,0433
A4B1 (TA4)	2,0757 <sup>±</sup> 0,0342	A4B2 (TA9)	2,1290 <sup>±</sup> 0,0270
A5B1 (TA5)	1,9908 <sup>±</sup> 0,0376	A5B2 (TA10)	2,0532 <sup>±</sup> 0,0312

Các giá trị trung bình có chữ theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD<sub>0,01</sub>.

**Kết quả định tính SL**

Để có thể khẳng định quy trình tách chiết là phù hợp để tách chiết SL, cao chiết thu được là chính xác hỗn hợp SL, tiến hành định tính SL thu nhận bằng sắc ký lớp mỏng và phương pháp phân tích phổ hồng ngoại.



**Hình 1. Kết quả sắc ký lớp mỏng để định tính SL. TA1, TA2... , TA10: 10 nghiệm thức với số thứ tự tương ứng trong thí nghiệm khảo sát hệ dung môi và tỷ lệ dung môi để tách chiết SL từ dịch lên men *C. Bombicola*; C: chuẩn 1',4"-sophorolactone 6',6"diacetate.**

Kết quả hình 1 cho thấy, trong sản phẩm SL thô thu nhận được từ các nghiệm thức đều có sự hiện diện của 1',4"-sophorolactone 6',6"diacetate với hệ số R<sub>f</sub> lần lượt ở các hình 1A, 1B, 1C, 1D, 1E là 0,625; 0,632; 0,600; 0,525; 0,450. Điều này chứng tỏ phương pháp tách chiết SL thô là hoàn toàn phù hợp để thu nhận hỗn hợp SL có trong dịch lên men. Ngoài ra, các vạch sắc ký xuất hiện ở những vị trí khác cũng cho thấy có sự hiện diện của các dạng cấu trúc khác trong hỗn hợp SL thu nhận.

Do chỉ có chuẩn SL dạng lactone nên phương pháp sắc ký lớp mỏng mới khẳng định được là trong SL thu nhận có sự hiện diện của dạng lactone, để kiểm tra thêm SL thu nhận được có chứa dạng acid hay không, tiến hành phân tích phổ hồng ngoại SL dạng acid và dạng lactone sau khi đã phân tách qua sắc ký cột silicagel.

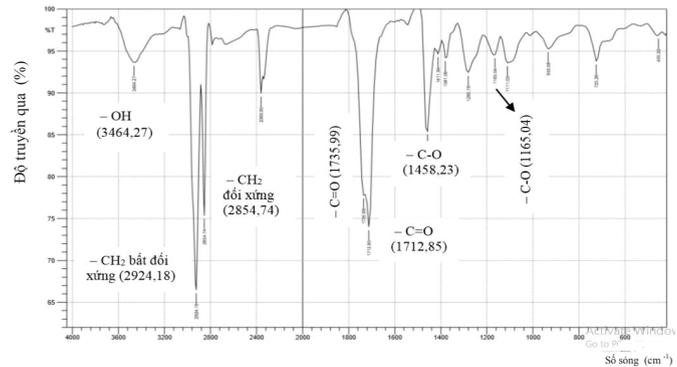
Hai dạng lactone và acid thu được chủ yếu khác nhau ở liên kết -C=O-R của nhóm carboxylic (trong acid R tương ứng với nhóm -OH, lactone R là nguyên tử oxy được liên kết với phân

tử đường) [3]. Do đó, với hai kết quả phân tích thu được, tập trung phân tích sự xuất hiện, hình dạng và độ hấp thụ của các mũi phổ điển hình tại các số sóng tương ứng với các liên kết tạo nên sự khác biệt giữa hai dạng phân tử acid và lactone:

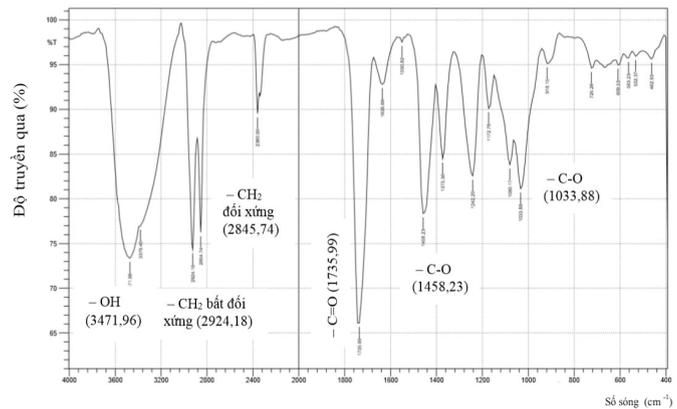
- Ở vùng 2500-4000 cm<sup>-1</sup>, tại vị trí 3471,89 cm<sup>-1</sup> cho biết trong phân tử có nhóm -OH. Tuy nhiên lại có sự khác biệt về độ hấp thụ của hai mũi giữa kết quả của dạng lactone và acid (hình 2 và 3), chứng tỏ trong phân tử lactone tuy có nhóm -OH nhưng lại ít hơn so với dạng acid. Đây cũng là điểm khác biệt lớn giữa hai loại phân tử này. Ngoài ra, còn quan sát thấy nhóm -CH<sub>2</sub> bất đối xứng và -CH<sub>2</sub> đối xứng lần lượt tại các vị trí 2924,18 và 2854,74 cm<sup>-1</sup>.

- Ở vùng 2000-1500 cm<sup>-1</sup>, đều có sự xuất hiện của mũi 1735,99 cm<sup>-1</sup> tương ứng với liên kết -C=O trong nhóm carboxyl với độ hấp thụ lớn ở dạng acid và nhỏ hơn ở dạng lactone. Vì vậy có thể thấy rõ ràng sự có mặt của nhóm carboxyl trong kết quả phân tích phổ của dạng acid. Một điểm đáng chú ý thêm là sự xuất hiện của mũi phổ tại 1712,85 cm<sup>-1</sup> tương ứng với -C=O trong cấu trúc phân tử lacton ở hình 2.

- Vùng 1500-500 (vùng vân tay), hình 3 quan sát thấy độ hấp thụ lớn của mũi tại vị trí 1458,23 cm<sup>-1</sup> tương ứng với liên kết -C-O trong -C-OH của nhóm carboxyl. Ở kết quả của lactone cũng thấy mũi này nhưng lại kém hơn nhiều. Liên kết -C-O trong -CO-O-C của phân tử lactone được tìm thấy tại 1165 cm<sup>-1</sup>.



**Hình 2. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại của SL dạng lactone.**



**Hình 3. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại của SL dạng acid.**

Bằng phương pháp phân tích phổ hồng ngoại xác định được trong cấu trúc của lactone tách được có các liên kết -CO-OC- khác với liên kết trong nhóm carboxyl của acid. Cùng với sự khác biệt về số lượng nhóm -OH, liên kết -C=O của nhóm carboxyl giúp khẳng định rằng hỗn hợp SL thu nhận được có cả dạng acid và dạng lactone.

SL thu nhận được có cả dạng lactone và dạng acid, điều này là một thuận lợi lớn cho việc ứng dụng SL vào các lĩnh vực khác nhau. SL dạng lactone sẽ phù hợp cho mục đích chế tạo kem, serum dưỡng da, trong khi SL dạng acid lại phù hợp để sản xuất sữa rửa mặt, các chất tẩy rửa, bổ sung vào xà bông do đặc tính tạo bọt tốt của SL dạng này.

**Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của hàm lượng SL và đầu đậu nành có trong dịch lên men đến hiệu suất tách chiết SL và hiệu suất thu hồi dung môi của quy trình**

Từ bảng 4 nhận thấy, hiệu suất tách chiết SL của quy trình cao từ 90% trở lên khi hàm lượng tổng SL và đầu đậu nành có trong dịch lên men không vượt quá 20%, hiệu suất tách chiết SL giảm mạnh xuống còn 77,46 và 75,06% khi tổng hàm lượng SL và đầu đậu nành trong dịch lên men lần lượt là 20% và 25%. Khả năng loại béo của quy trình là rất tốt, đạt từ trên 97% trở lên ở tất cả các nghiệm thức, điều này chứng tỏ sản phẩm SL thu nhận được sẽ không còn lẫn dầu, SL sẽ có độ tinh sạch cao.

**Bảng 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng hàm lượng SL và đầu đậu nành trong dịch lên men đến hiệu suất tách chiết SL và hiệu suất thu hồi dung môi của quy trình.**

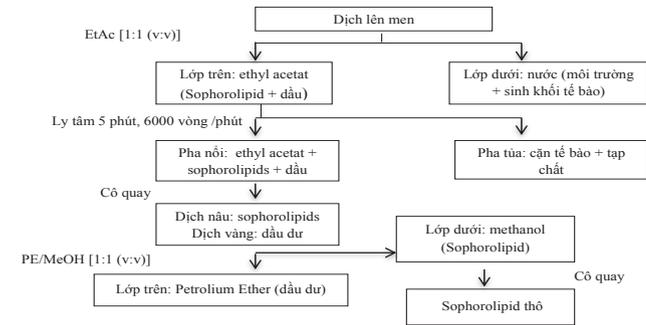
Nghiệm thức	Hiệu suất tách chiết SL (%)	Hiệu suất loại bỏ dầu (%)	Hiệu suất thu hồi dung môi (%)		
			EtAc	MeOH	PE
C1D1	99,20 <sup>a</sup> ±3,52	98,51±1,88	91,33±1,15	81,67±2,89	41,67±2,89
C2D1	99,98±0,63	97,41±1,10	92,00±0,00	80,00±0,00	40,00±10,00
C3D1	92,59 <sup>a</sup> ±1,08	99,13±1,16	91,33±1,15	83,33±2,89	38,33±12,58
C4D1	98,71 <sup>a</sup> ±0,28	97,99±1,99	91,33±1,15	81,67±2,89	41,67±7,64
C1D2	100,21 <sup>a</sup> ±3,85	98,95±0,47	92,00±0,00	81,67±2,89	40,00±13,23
C2D2	99,40±0,42	99,81±0,21	92,00±0,00	80,00±0,00	41,67±7,64
C3D2	95,00 <sup>c</sup> ±0,63	99,39±0,84	91,33±1,15	80,00±0,00	31,67±7,64
C4D2	77,46±1,96	99,91±0,83	92,00±0,00	78,89±1,92	34,33±5,09
C1D3	98,77 <sup>a</sup> ±2,10	97,81±0,65	92,00±0,00	81,67±2,89	41,67±2,87
C2D3	98,57 <sup>a</sup> ±0,59	97,11±0,89	92,00±0,00	80,00±0,00	43,33±5,77
C3D3	90,52 <sup>a</sup> ±1,48	97,23±0,90	91,33±1,15	81,67±2,89	33,33±5,77
C4D3	75,06 <sup>c</sup> ±1,36	98,08±1,67	92,00±0,00	77,78±1,92	37,67±3,85

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có chữ theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD<sub>0,01</sub>.

Hiệu suất thu hồi các loại dung môi sử dụng trong quá trình tách chiết cũng khá biến động. Dung môi EtAc và MeOH có hiệu suất thu hồi khá ổn định ở tất cả các nghiệm thức, lần lượt là 91-92% và 78-83%. Trong khi đó, dung môi PE có hiệu suất thu hồi khá thấp, đạt từ 33-43%, có sự biến động lớn giữa các nghiệm thức và trong các lần lặp lại, nguyên nhân là do dung môi PE sử dụng có nhiệt độ bay hơi khá thấp (từ 30-60°C), nên khi tiến hành thí nghiệm trong điều kiện nhiệt độ phòng, tốc độ

bay hơi của dung môi PE diễn ra nhanh. Chính vì vậy, dẫn đến sự hao hụt PE trong quá trình tách chiết.

Từ những kết quả thu được, có thể xây dựng quy trình thích hợp để tách chiết SL từ dịch lên men có hiệu suất cao, ổn định như hình 4.



**Hình 4. Quy trình để tách chiết thu nhận SL từ dịch lên men.**

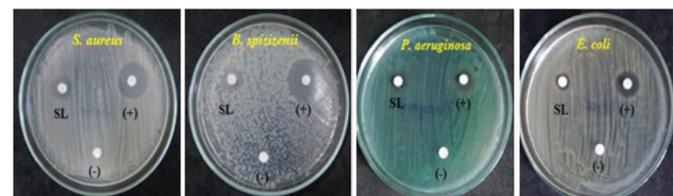
Như vậy, để tách chiết SL từ dịch lên men *C. bombicola* thì sử dụng hệ dung môi EtAc:dịch lên men 1:1 (v:v); sử dụng hệ dung môi PE:MeOH:dịch lên men 1:1:1 (v:v:v) nhằm loại bỏ lượng dầu dư trong quá trình lên men *C. bombicola* để thu được SL có độ tinh sạch cao. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Bogaert (2008) [3] khi cho rằng SL có thể được chiết xuất từ dịch lên men với các dung môi hữu cơ như EtAc. Tuy nhiên, nguồn carbon lipid dư cũng có thể được tách chiết đồng thời, gây khó khăn trong quá trình ứng dụng sau này. Vì lý do này, cần thêm dung môi hexane hoặc các dung môi khác như pentane hay t-butyl methyl ether, PE để loại nguồn carbon lipid dư.

**Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của SL**

**Bảng 5. Kết quả đường kính vòng kháng của SL đối với vi sinh vật.**

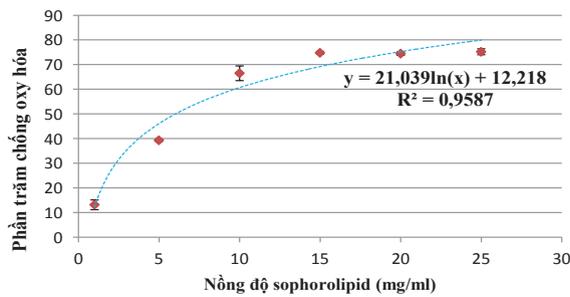
Chủng vi sinh vật	Đường kính vòng kháng khuẩn của SL (mm)
<i>B. spizizenii</i>	13,68±0,58
<i>E. coli</i>	9,67±0,58
<i>P. aeruginosa</i>	11,33±0,58
<i>S. aureus</i>	12,67±1,15

Từ bảng 5 và hình 5 có thể thấy, SL kháng tốt nhất đối với chủng *B. spizizenii*, rồi đến *S. aureus*; kháng yếu đối với chủng *P. aeruginosa* và *E. coli*. Như vậy bước đầu có thể kết luận, SL thu nhận cho khả năng kháng vi khuẩn Gram (+) mạnh hơn vi khuẩn Gram (-). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Jose và cs (1999) [14], Kim và cs (2005) [11].



**Hình 5. Kết quả kháng khuẩn của SL với phương pháp đĩa giấy, (+): chủng dương; (-): chủng âm.**

**Kết quả khảo sát khả năng chống oxy hóa của SL bằng gốc tự do DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)**



**Hình 6. Đồ thị biểu diễn phần trăm chống oxy hóa của SL bằng phương pháp DPPH.**

Từ hình 6, tính được giá trị  $IC_{50}$  là 6,024 mg/ml, so với các nghiên cứu của Loan và cs (2016) giá trị  $IC_{50}$ =1,4063 mg/ml [13] thì ở nghiên cứu này giá trị  $IC_{50}$  có cao hơn nhưng độ chênh lệch không nhiều, chỉ cần lượng nhỏ SL để ức chế các gốc tự do bất lợi. Điều này cho thấy có thể ứng dụng SL để làm thành phần chống oxy hóa hữu ích trong lĩnh vực mỹ phẩm như kem dưỡng da, nhằm mục tiêu chăm sóc, bảo vệ da, ngăn ngừa sự lão hóa, chất chống oxy hóa trong thực phẩm, trong ngành thức ăn chăn nuôi, bột giặt, xà phòng...

**LỜI CẢM ƠN**

Chúng tôi xin cảm ơn GS Kim Eun-Ki, Đại học Inha, Hàn Quốc đã cung cấp chủng nấm men *C. bombicola*; cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ TP Hồ Chí Minh đã tài trợ cho nghiên cứu này.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

[1] A.C. Jose and G.O. Felix (1999), "SL production by *Candida bombicola*: medium composition and culture method", *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, pp.488-494.

[2] Phạm Thành Hồ (2006), "Chương 8: các sản phẩm của công nghệ lên men", *Nhập môn Công nghệ sinh học*, tái bản lần 1, Nhà xuất bản Giáo dục, tr.191-194.

[3] I.N.V. Bogaert (2008), *Literature review on microbial production and application of the biosurfactant SLs, in Microbial synthesis of SLs by the yeast Candida bombicola*, PhD-thesis, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium, pp.1-40.

[4] I.N.V. Bogaert, K. Saerens, C. De Muynck, D. Develter, W. Soetaert, and E.J. Vandamme (2007), "Microbial production and application of SLs", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, pp.23-34.

[5] U. Gobbert, S. Lang, and F. Wagner (1984), "Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*", *Biotechnol. Lett.*, **6**, pp.225-230.

[6] H.J. Daniel, M. Reuss, and C. Syldatk (1998), "Production of SLs in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509", *Biotechnol. Lett.*, **20**, pp.1153-1156.

[7] D.G. Cooper and D.A. Paddock (1984), "Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, pp.173-176.

[8] P.A.J. Gorin, J.F.T. Spencer, and A.P. Tulloch (1961), "Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnolia*", *Can. J. Chem.*, **39**, pp.846-855.

[9] H. Isoda, D. Kitamoto, H. Shinmoto, M. Matsumura, and T. Nakahara (1997), "Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, pp.609-614.

[10] A. Daverey and K. Pakshirajan (2009), "Production, characterization, and properties of SLs from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **158**, pp.663-674.

[11] H.S. Kim, Y.B. Kim, B.S. Lee, and E.K. Kim (2005), "SL production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing byproduct", *J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, pp.55-58.

[12] J.F.T. Spencer, P.A.J. Gorin, and A.P. Tulloch (1970), "*Torulopsis bombicola* sp.", *Antonie Van Leeuwenhoek*, **36(1)**, pp.129-133.

[13] Lê Quỳnh Loan, Ngô Đức Duy, Hoàng Quốc Khánh, Nguyễn Hoàng Dũng, Nguyễn Lương Hiếu Hòa, Nguyễn Thị Bạch Huệ (2016), "Nghiên cứu thu nhận và khảo sát một số hoạt tính của SL từ quá trình lên men chủng *Candida bombicola* từ dầu dừa", *Tạp chí Phát triển KH&CN*, **19**, tr.15-25.

[14] A.C. Jose and G.O. Felix (1999), "SL production by *Candida bombicola*: medium composition and culture method", *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, pp.488-494.