

Nghiên cứu thu nhận và khảo sát một số hoạt tính của sophorolipid từ quá trình lên men chủng *Candida bombicola* từ dầu dừa

- Lê Quỳnh Loan
- Ngô Đức Duy
- Hoàng Quốc Khánh
- Nguyễn Hoàng Dũng
Viện sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam
- Nguyễn Hoàng Dũng
- Nguyễn Lương Hiếu Hòa
Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành
- Nguyễn Thị Bạch Huệ
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 15 tháng 10 năm 2015, nhận đăng ngày 02 tháng 12 năm 2016)

TÓM TẮT

Chất hoạt động bề mặt có nguồn gốc sinh học đang ngày càng được quan tâm bởi những ứng dụng rộng rãi của chúng trong nhiều lĩnh vực và những đặc tính ưu việt so với các chất có nguồn gốc hóa học như khả năng phân hủy sinh học tốt hơn, độc tính thấp, thân thiện với môi trường. Sophorolipid là một dạng chất hoạt động bề mặt thuộc nhóm glycolipid được sản xuất từ quá trình lên men bởi chủng nấm men không gây bệnh như *Candida bombicola* và đang nhận được nhiều sự quan tâm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thu nhận và khảo sát một số hoạt tính của sophorolipid từ quá trình

lên men chủng *C. bombicola* sử dụng nguồn nguyên liệu dầu dừa. Kết quả cho thấy ở quy mô phòng thí nghiệm, sau 7 ngày nuôi cấy, sản lượng sophorolipid thu nhận là 14,6 g/L với sức căng bề mặt là 40 mN/m. Sophorolipid thu nhận có khả năng kháng lại một số vi khuẩn như *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* và tạo nhũ với các loại dầu. Thông qua thí nghiệm DPPH, sophorolipid cho thấy có khả năng bắt gốc tự do theo nồng độ tăng dần. Các kết quả trên cho thấy sophorolipid có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực hóa mỹ phẩm.

Từ khóa: sophorolipid, *Candida bombicola*, kháng khuẩn, DPPH, dầu dừa

MỞ ĐẦU

Sophorolipid (SL), chất hoạt động bề mặt 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 [12]. Các SL được tổng hợp từ hai nguồn cơ chất bao gồm nguồn carbon ưa nước và kỵ nước thông qua quá trình lên men bởi các chủng nấm men không gây bệnh như *C. bombicola*, *C. magnolia*, *C. apicola*

và *C. bororiensis*, trong đó chủng *C. bombicola* được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất [7, 8]. Nguồn carbon ưa nước sử dụng phổ biến là glucose, nguồn carbon kỵ nước có thể là dầu, acid béo hoặc alkane [13]. Hai dạng cấu trúc chính của SL là dạng acid tự do và dạng vòng lactone [20]. Sự khác biệt trong cấu trúc dẫn đến sự khác biệt về đặc tính lý hóa của SL, các SL mang tính acid cho thấy khả năng tạo bọt và tính tan tốt

trong khi các SL có vòng lactone cho thấy hoạt tính kháng khuẩn và giảm sức căng bề mặt tốt [12].

Các SL có khả năng ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như: thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm, dệt may, sản xuất chất tẩy rửa [1]. Bên cạnh đó những nghiên cứu gần đây còn cho thấy SL có khả năng kháng khuẩn trong việc trị mụn, trị gàu, mùi hôi cơ thể và nhiều tác động hữu hiệu trong việc bảo vệ da và tóc [20]. Chúng kích thích sự biến dưỡng của các tế bào fibroblast trong lớp biểu mô và kích thích quá trình tổng hợp collagen, nhân tố làm cho da săn chắc, chống lại sự suy giảm miễn dịch do virus gây ra, ức chế quá trình phát triển của tế bào ung thư bạch cầu, tiêu diệt nhiều dòng tế bào khác nhau như dòng tế bào ung thư gan [20]. Khả năng tạo nhũ của sophorolipid cũng được ứng dụng trong các ngành hóa dầu. Chúng có thể được sử dụng trong việc thu hồi các sản phẩm dầu thứ cấp, loại bỏ thành phần hydrocarbon trong dầu thô [6, 16].

So với các chất hoạt động bề mặt được tổng hợp qua con đường hóa học từ dầu mỏ, SL cho thấy những đặc tính ưu việt hơn như khả năng phân hủy sinh học cao, độc tính thấp, thân thiện môi trường, có thể sản xuất từ nguồn nguyên liệu tái sử dụng [13, 16]. Việc sản xuất các chất hoạt động bề mặt sinh học như SL không chỉ góp phần hạn chế khai thác quá mức nguồn nguyên liệu dầu mỏ mà còn góp phần giảm thiểu vấn đề ô nhiễm môi trường hiện nay. Do đó SL đang ngày càng thu hút sự quan tâm của các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước. Tuy nhiên, ở Việt Nam những công trình liên quan đến sản xuất SL vẫn chưa được nghiên cứu thấu đáo. Đa số tập trung vào việc phân lập các chủng vi khuẩn tạo chất bề mặt từ môi trường mặn nhằm xử lý ô nhiễm dầu [18]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu khảo sát thu nhận sophorolipid ở quy mô phòng thí nghiệm từ quá trình lên men chủng *C.bombicola* sử dụng nguyên liệu dầu dừa và

khảo sát một số hoạt tính sinh học của sophorolipid thu nhận.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng gốc nấm men *C. bombicola* ATCC 22214 được cung cấp ở dạng đông khô bởi giáo sư Kim Eun-Ki, Đại học Inha, Hàn Quốc. Chủng được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường YM Broth (glucose 1 %, yeast extract 0,6 %, peptone 0,5 %); 1',4"-sophorolactone 6',6"-diacetate; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được cung cấp bởi công ty hóa chất Sigma (St. Louis, Mỹ). Các dung môi hữu cơ như hexane, methanol, ethyl acetate được cung cấp bởi công ty hóa chất Xilong (Trung Quốc). Nguồn dầu được cung cấp bởi công ty Thành Vinh (Huyện Châu Thành, Tỉnh Bến Tre).

Hoạt hóa chủng *C. bombicola* trước khi lên men

Nấm men *C. bombicola* dạng đông khô được hoạt hóa trong môi trường YM, sau 48 h dịch giống cấp 1 được cấy chuyển thành dịch giống cấp 2; dịch giống cấp 2 được sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát và lên men. Điều kiện hoạt hóa chủng *C. bombicola*: nhiệt độ 30 °C, tốc độ lắc 180 vòng/phút, thời gian 48 h.

Khảo sát một số đặc điểm sinh trưởng của nấm men

Chủng nấm men *C. bombicola* từ dịch giống cấp 2 được nuôi cấy trong môi trường YM, khảo sát khả năng sinh trưởng của nấm men ở các nhiệt độ và pH khác nhau, sau 48 h nuôi cấy sử dụng phương pháp đếm khuẩn lạc để tính mật độ tế bào và ghi nhận kết quả.

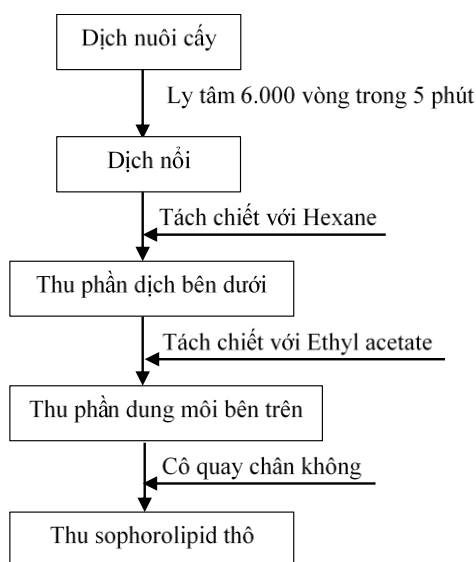
Lên men sản xuất sophorolipid

Thí nghiệm khảo sát lên men sophorolipid được thực hiện trong các bình erlen 250 ml. Thành phần môi trường lên men bao gồm: dầu dừa 10 % (v/v); glucose 10 % (w/v); yeast extract 0,5 %; KH₂PO₄ 0,1 %; MgSO₄.7H₂O 0,05 %, pH 5,0.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 %; NaCl 0,01 %; peptone 0,07 %; chủng *C. bombicola* 5 %. Điều kiện lên men: khối lượng lên men 100 mL, nhiệt độ lên men 30 °C, pH = 6, tốc độ lắc 180 vòng/phút, chủng giống bổ sung vào môi trường lên men 5 % (v/v).

Thu nhận sophorolipid thô

Dịch sau nuôi cấy được ly tâm với tốc độ 6.000 vòng trong 5 phút, thu dịch nổi. Dịch sau ly tâm được chiết với hexane (1: 1 v/v, 3 lần) nhằm loại các nguồn dầu thừa. Sau đó dịch tiếp tục được chiết với ethyl acetate (1: 1 v/v, 3 lần) để thu nhận sophorolipid. Sản phẩm thu được cô quay chân không ở 40 °C và cân xác định khối lượng sophorolipid thô (Hình 1).



Hình 1. Quy trình thu nhận sophorolipid thô từ quá trình lên men của chủng *C. bombicola*

Định tính sophorolipid thu nhận bằng sắc ký lớp mỏng TLC

Mẫu sophorolipid thô được chấm lên bản sắc ký, pha động được sử dụng là chloroform:methanol: H_2O (80:10:2 v/v/v) khoảng 30 phút. 1',4"-sophorolactone 6',6"-diacetate (Sigma) 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.

Xác định một số hoạt tính của sophorolipid

Xác định khả năng làm giảm sức căng bề mặt

Khả năng làm giảm sức căng bề mặt được xác định bằng phương pháp vòng Du Nouy (phương pháp này được hỗ trợ tiến hành bởi phòng thí nghiệm các hợp chất có hoạt tính sinh học, Đại học Inha, Hàn Quốc).

Xác định hoạt tính kháng khuẩn và nồng độ ức chế vi khuẩn tối thiểu

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* được cấy trên môi trường thạch LB đã được đục lỗ, hút mẫu sophorolipid cho vào các lỗ và ủ ở 37 °C trong 1 - 2 ngày rồi quan sát vòng kháng khuẩn. Nồng độ ức chế tối thiểu thực hiện theo phương pháp MIC thực hiện trên đĩa 96 giếng, dịch sophorolipid thô được pha loãng thành các nồng độ khác nhau, nồng độ ức chế tối thiểu được xác định là nồng độ có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn.

Xác định hoạt tính bắt gốc tự do

Hoạt tính bắt gốc tự do được xác định bằng phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Mẫu sophorolipid thô được hòa trong ethanol 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 đo OD ở bước sóng 517 nm. Phần trăm bắt gốc tự do được tính theo công thức: % chống oxy hóa = $(1 - \text{OD mẫu} / \text{OD đối chứng}) \times 100$.

Xác định khả năng nhũ hóa

Khả năng tạo nhũ của sophorolipid được khảo sát lần lượt với các dung môi như hexane

hoặc benzene và các nguồn dầu như DO, dầu đậu nành, dầu cải. Dịch sophorolipid pha loãng bằng nước cất ở các nồng độ 5, 10, 20 µg/mL, bổ sung vào dịch SL một lượng cùng thể tích nguồn cơ chất khảo sát tạo nhũ, vortex trong 2 phút, để yên 24 h và quan sát. Chỉ số nhũ hóa sau 24 h được tính theo công thức: $E_{24} = (\text{chiều cao lớp nhũ tạo thành}/\text{tổng chiều cao dung dịch}) \times 100$.

Xác định thành phần acid béo của SL

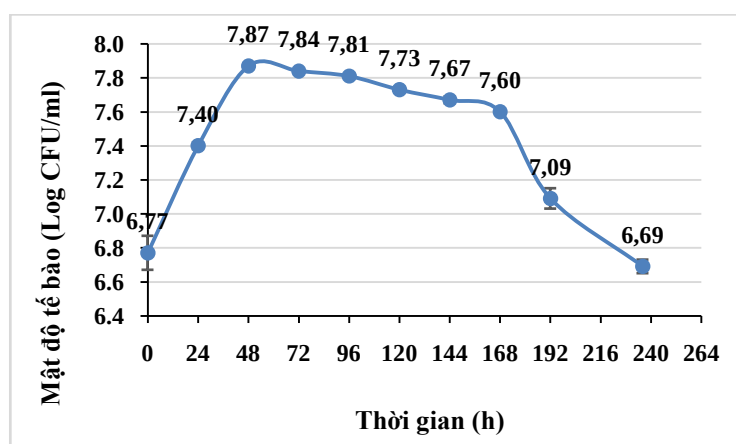
Sản phẩm SL thô thu nhận được gửi phân tích thành phần acid béo bằng kỹ thuật sắc ký khí (GC) tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TP.HCM.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của nấm men *C. bombicola*

Đường cong sinh trưởng của nấm men *C. bombicola*

Nấm men *C. bombicola* được nuôi trong môi trường YM ở 30 °C, tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau đó sử dụng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường YM và tính mật độ tế bào theo các mốc thời gian 12 h. Kết quả xây dựng đường cong sinh trưởng của *C. bombicola* được thể hiện ở Hình 2.



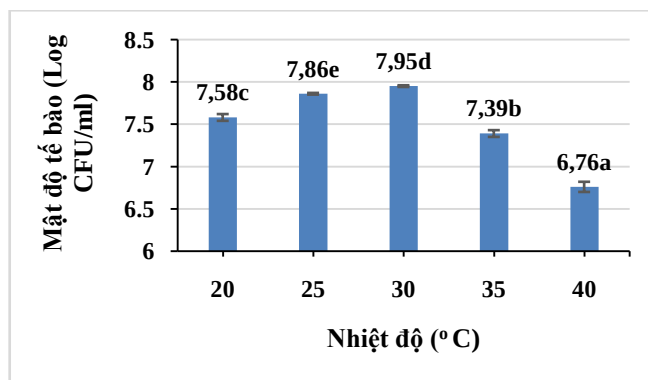
Hình 2. Biểu đồ đường cong sinh trưởng của nấm men *C. bombicola*

Kết quả ở Hình 2 cho thấy trong 24 h đầu, nấm men *C. bombicola* bước vào pha tăng trưởng, bắt đầu gia tăng về số lượng tế bào. Từ 24 - 48 h, tốc độ sinh trưởng của nấm men tiếp tục tăng nhanh theo cấp số nhân và số lượng tế bào đạt cực đại ở 48 h. Từ 48 - 168 h, bắt đầu có sự suy giảm về số lượng tế bào nấm men. Sau 168 h số lượng tế bào nấm men giảm mạnh, lúc này chất dinh dưỡng đã cạn kiệt làm cho số lượng tế bào giảm dần theo thời gian. Như vậy 48 h

được lựa chọn để khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố khác lên sự sinh trưởng của nấm men.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Chủng nấm men *C. bombicola* nuôi giữ trong môi trường YM, tốc độ lắc 180 vòng/phút, pH = 6 ở các nhiệt độ 20; 25; 30; 37 và 45 °C. Sau 48 h dịch nuôi cấy được trải trên môi trường PDA, ủ 30 °C trong 48 h và đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (Hình 3) cho thấy nhiệt độ thích hợp cho sự tăng trưởng của nấm men là 30 °C.

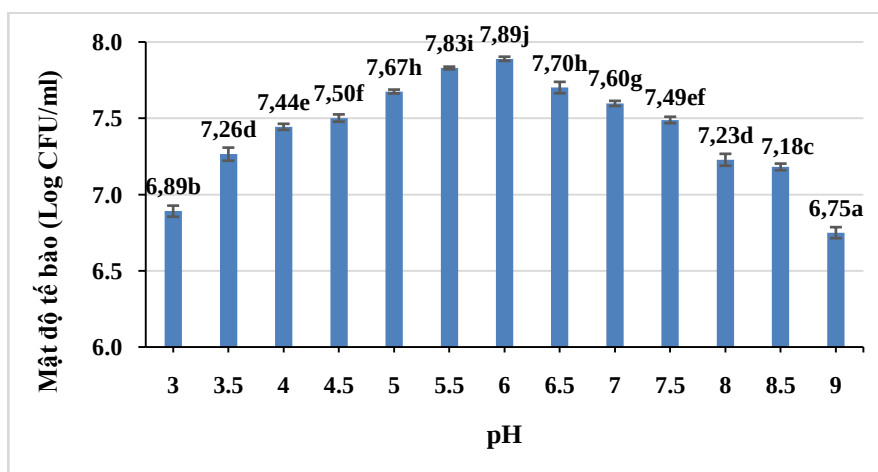


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của nấm men
Các chữ cái thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan

Ảnh hưởng của pH

Khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của nấm men lần lượt ở các giá trị pH từ 3 đến 9. Kết quả trình bày ở Hình 4 cho thấy giá trị pH thích hợp cho sự sinh trưởng của nấm men là pH = 6. Như vậy giá trị pH = 6 và 30 °C được lựa

chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Spencer và cs (1970) [19], Inoue và Kimura (1988) [11] về ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến sự sinh trưởng của nấm men *C. bombicola*.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của nấm men
Các chữ cái thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan

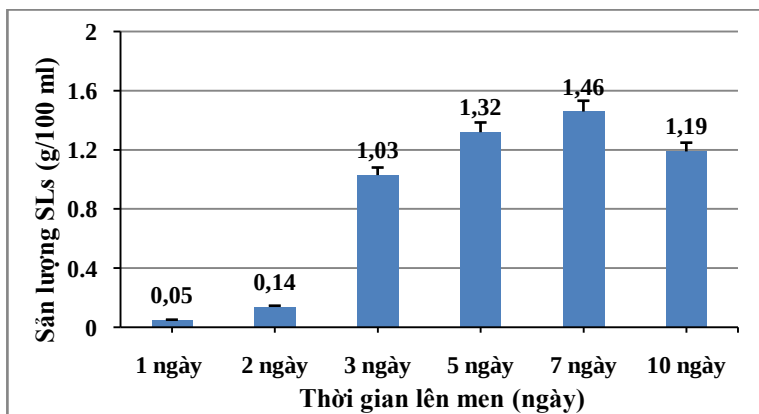
Lên men thu nhận sophorolipid từ nguồn cơ chất glucose và dầu dừa

Các yếu tố ảnh hưởng đến sản lượng sophorolipid từ quá trình lên men chủng *C. bombicola* cũng được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy pH = 6, nhiệt độ 30 °C, 10 % dầu dừa,

10 % glucose là các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men thu nhận sophorolipid (kết quả không trình bày). Các yếu tố này được áp dụng cho quá trình lên men thu nhận sophorolipid.

Sophorolipid được thu nhận từ quá trình lên men chủng *C. bombicola* với nguồn cơ chất là glucose và dầu dừa. Môi trường lên men được bổ sung 5 % (v/v) chủng giống và lên men ở 30 °C, pH = 6, tốc độ lắc 180 vòng/phút, thời gian lên men được khảo sát từ 1 - 10 ngày. Sophorolipid được thu nhận tại các ngày lên men khảo sát bằng cách thu dịch lên men, ly tâm loại sinh khối tế bào sau đó chiết với hệ dung môi hexane và ethyl acetate, cuối cùng cô quay chân không loại bỏ dung môi, thu nhận sophorolipid thô. Lượng sophorolipid thô sau khi cô quay đem cân xác định khối lượng, kết quả được trình bày ở Hình 5 và 6. Kết quả Hình 5 cho thấy sản lượng SL bắt đầu tăng mạnh từ ngày lên men thứ 3 và cho sản lượng cao nhất ở ngày lên men thứ 7, đến ngày thứ 10 lượng SL lại giảm. Điều này cũng tương đồng với nghiên cứu của Cavallero và Cooper (2003) [2] về SL được sản xuất bởi nấm men *C. bombicola* ATCC 22214. Kết quả nghiên cứu cho biết tế bào nấm men *C. bombicola* bắt đầu sản xuất SL khi tế bào bước vào pha cân bằng, SL là hợp chất ngoại bào được tiết ra từ quá trình sinh tổng hợp của nấm men sẽ được tích lũy trong môi trường và đạt sản lượng cao ở cuối pha cân bằng, đến pha suy vong sản lượng SL giảm có thể do sự

phân cắt của các enzyme. Hiện nay, các nghiên cứu về sản xuất các sophorolipid đang được tiến hành tập trung. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào việc sử dụng các acid béo mạch trung bình (C16 - C18) cho quá trình lên men [2, 12]. Các nghiên cứu về việc sử dụng nguồn carbon mạch ngắn (C12 - C14) cũng như mạch dài cho quá trình lên men sản xuất sophorolipid (C22) vẫn chưa được tiến hành nhiều. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nguồn dầu dừa như nguồn cung cấp carbon mạch ngắn cho quá trình lên men. Dầu dừa là một nguyên liệu khá phổ biến ở Việt Nam. Việc sử dụng nguồn dầu này góp phần làm giảm giá thành sản xuất cũng như đa dạng hóa các sản phẩm từ dầu dừa. Kết quả lên men ở quy mô phòng thí nghiệm cho thấy khi tiến hành lên men thu nhận sophorolipid, sản lượng cao nhất đạt được là 14,6 g/L. Kết quả này phù hợp với các kết quả trước đây khi tiến hành lên men từ các nguồn dầu khác nhau thì sản lượng sophorolipid thu được từ 10 - 25 g/L tùy loại dầu [3-6]. Để nâng cao hiệu suất quá trình lên men, quá trình lên men thu nhận sophorolipid từ dầu dừa đang được tiến hành thử nghiệm ở quy mô bioreactor.



Hình 5. Biểu đồ sản lượng sophorolipid thô thu được ở các thời gian lên men khác nhau



Hình 6. Sophorolipid thô sau 3, 5, 7 và 10 ngày lên men

Định tính sophorolipid bằng kỹ thuật TLC

Sophorolipid thu nhận được tiến hành phân tích sắc ký lớp mỏng TLC silica gel 60 F₂₅₄ với hệ dung môi chloroform:methanol:nước (tỷ lệ 80:10:2 v/v) và acid sulfuric được sử dụng để phát hiện sắc ký đồ, định tính sản phẩm thu được. Kết quả Hình 7 cho thấy, trong sản phẩm SL thô có sự hiện diện của 1',4''-sophorolactone 6',6''-diacetate. 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.



Hình 7. Sắc ký đồ định tính SL (2) và (3) SL thu được; (C) chất chuẩn (1',4''-sophorolactone 6',6''-diacetate)

Xác định thành phần acid béo của SL

Kết quả phân tích thành phần acid béo trong hỗn hợp SL thô thu nhận bằng kỹ thuật sắc ký khí

cho thấy trong hỗn hợp SL thu nhận chiếm chủ yếu là các acid béo có chiều dài mạch carbon C12 (24,7 %), C14 (10,09 %) và C16 (8,86 %). Các nghiên cứu trước về SL chủ yếu tập trung vào các nguồn carbon mạch dài như sử dụng dầu đậu nành, dầu hạt cải làm nguồn carbon chính. Trong nghiên cứu này sử dụng dầu dừa là nguồn carbon kỵ nước được biết đến là một trong những nguồn giàu acid béo mạch carbon trung bình như acid lauric C12:0 (48,7 %) và acid myristic C14:0 (17,7 %) (Gordon and Rahman, 1991) [9]. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy sự tương đồng về xu hướng tạo thành các acid béo mạch carbon trung bình C12 - C16 trong hỗn hợp SL thu nhận. SL giàu acid béo mạch carbon trung bình có một số ưu điểm như sức căng bề mặt tốt hơn, khả năng giữ ẩm và kháng virus tốt hơn [9].

Xác định khả năng làm giảm sức căng bề mặt của SL

Mẫu SL thu được có khả năng làm giảm sức căng bề mặt nước từ 72 mN/m xuống còn 40 mN/m. So với các chất hoạt động bề mặt khác như sodium lauryl sulfate và Pluronic F-28 khả năng làm giảm sức căng bề mặt tương ứng là 47,3 mN/m và 42,8 mN/m (Develter và cs, 2010) [6]. Kết quả này cho thấy SL có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chất tẩy rửa.

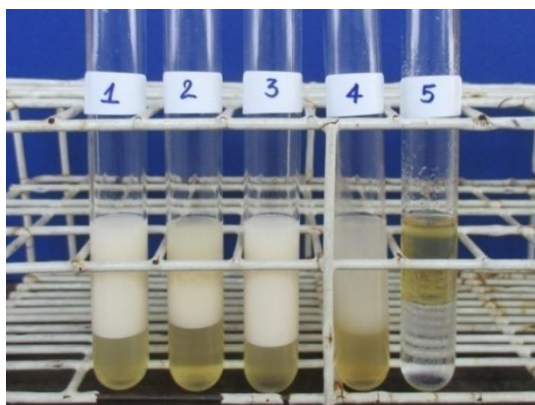
Xác định khả năng nhũ hóa

Kết quả khảo sát khả năng tạo nhũ của SL, Bảng 1 và Hình 8, cho thấy SL có khả năng nhũ

hóa hầu hết các loại dung môi khảo sát với chỉ số nhũ hóa từ 59,23 - 69,64 %. Kết quả này cũng cho thấy sự tương đồng với kết quả của Daverey và Pakshirajan (2009) [3] rằng SL thu nhận từ quá trình lên men chủng *C. bombicola* ATCC 22214 với cơ chất glucose và dầu cải cho khả năng tạo nhũ ổn định với dầu DO, benzene và hexadecane.

Bảng 1. Khả năng tạo nhũ của SL với các cơ chất khác nhau

Cơ chất khảo sát	Chỉ số nhũ hóa (E_{24}) (%)
Hexane	$62,50 \pm 0,89$
Dầu DO (0,05 % S)	$59,23 \pm 0,51$
Dầu hạt cải dầu	$65,18 \pm 0,89$
Dầu đậu nành	$69,64 \pm 0,9$



Hình 8. Khả năng nhũ hóa của SL (1) dầu cải; (2) dầu DO; (3) dầu đậu nành; (4) hexane; (5) nước

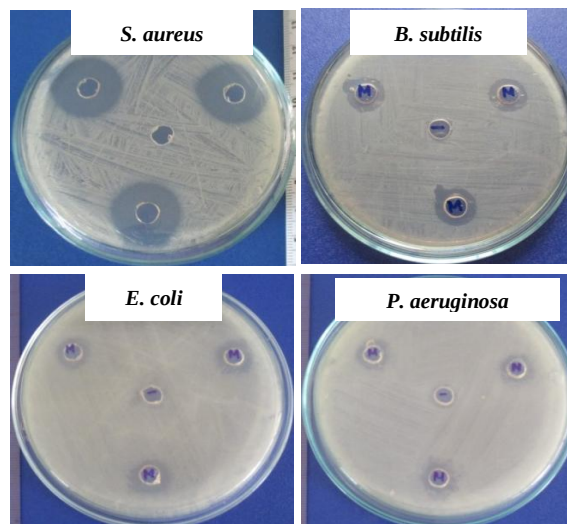
Khả năng kháng khuẩn của SL

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của SL (Bảng 2 và Hình 9) cho thấy SL có khả năng kháng cả 4 loại vi khuẩn kiểm tra với đường kính vòng kháng khuẩn từ 11 - 21 mm sau 24 h. Trong đó SL cho thấy khả năng kháng mạnh với *S. aureus* và *B. subtilis*. 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) [12], Kim và cs (2005) [13] kết

luận khả năng kháng khuẩn của SL đối với vi khuẩn Gram (+) mạnh hơn Gram (-).

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của SL

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$21,3 \pm 0,58$
<i>Bacillus subtilis</i>	$15,5 \pm 0,5$
<i>Escherichia coli</i>	$13,7 \pm 0,58$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$11,3 \pm 0,58$



Hình 9. Khả năng kháng khuẩn của SL

Để xác định nồng độ ức chế tối thiểu, thử nghiệm MIC được thực hiện. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của hỗn hợp SL thô thu nhận đối với các chủng vi khuẩn được trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy, SL có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn Gram (+) tốt hơn so với các chủng vi khuẩn Gram (-), trong đó hoạt tính ức chế có hiệu quả nhất là đối với *S. aureus* (3,5 mg/mL) và yếu hơn với *P. aeruginosa* (5 mg/mL). So sánh với các nghiên cứu trước thì nồng độ ức chế tối thiểu của SL thu nhận trong nghiên cứu này vẫn còn khá cao. Kim và cs (2005) [13] đã báo cáo rằng IC_{50} của SL thu nhận từ quá trình lên men chủng *C. bombicola* với cơ chất là glucose và dầu bắp sẫm màu đối với *B. subtilis* là 4 mg/L, *P. acne* là 0,5

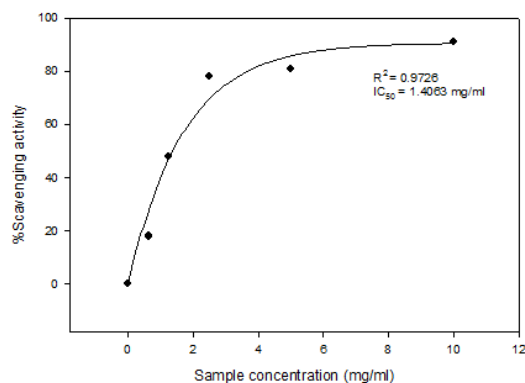
mg/L và *E. coli* là 10 mg/L. Mặc dù SL thu nhận thể hiện hoạt tính kháng khuẩn còn thấp nhưng vẫn cho thấy được tiềm năng ứng dụng SL trong sản xuất dung dịch làm sạch trái cây.

Bảng 3. Nồng độ ức chế vi khuẩn tối thiểu của SL

Chủng vi khuẩn	Nồng độ ức chế tối thiểu (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,5
<i>Bacillus subtilis</i>	4,5
<i>Escherichia coli</i>	4,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,0

Khả năng kháng oxy hóa của SL

Khả năng bắt gốc tự do của SL được thể hiện ở Hình 10. SL thu nhận có khả năng bắt gốc tự do tăng dần theo nồng độ từ 19,7 % ở nồng độ 0,625 mg/mL đến 90,5 % ở nồng độ 10 mg/mL. Nồng độ SL thô ức chế các gốc tự do DPPH ở 50 % (IC_{50}) cũng được xác định là 1,4063 mg/mL. Khả năng bắt gốc tự do hay kháng oxy hóa cũng như kháng khuẩn của SL thô thu được cho thấy tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực dược phẩm, mỹ phẩm.



Hình 9. Khả năng bắt gốc tự do của SL

KẾT LUẬN

Bước đầu nghiên cứu thu nhận sophorolipid từ quá trình lên men chủng *C. bombicola* sử dụng nguồn nguyên liệu dầu dừa và glucose ở quy mô phòng thí nghiệm, chúng tôi đã thu nhận được sản lượng SL cao nhất là 14,6 g/L sau 7 ngày lên men ở 30 °C, pH = 6, tốc độ lắc 180 vòng/phút. SL thu nhận có một số hoạt tính như: khả năng tạo nhũ với các loại dung môi, làm giảm sức căng bề mặt từ 72 mN/m xuống 40 mN/m, hoạt tính chống oxy hóa với IC_{50} = 1,4063 mg/mL và có khả năng kháng một số vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *P. Aeruginosa* và *B. subtilis*. Kết quả này cho thấy sophorolipid có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm và dược phẩm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

Production and characterization of sophorolipids produced by *Candida bombicola* from coconut oil

- Le Quynh Loan
- Ngo Duc Duy
- Hoang Quoc Khanh
- Nguyen Hoang Dung
Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology
- Nguyen Hoang Dung
- Nguyen Luong Hieu Hoa
NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University
- Nguyen Thi Bach Hue
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

The biosurfactants from microbial origin increasingly gained interests because of their application in many field and excellent properties compared to surfactants from chemical origin, such as the higher biodegradability, lower toxicity and environmentally friendly. Sophorolipids, biosurfactants of glycolipid groups are produced through the fermentation by nonpathogenic yeasts such as *Candida bombicola*. In this study, we investigated the production, surveyed properties of sophorolipids

through fermentation by *C. bombicola* from coconut oil. The results showed that the yield of sophorolipid obtained after 7 days of culture was 14.6 g/L, the surface tension was 40 mN/m. The obtained sophorolipid showed ability to be resistant to some bacteria such as *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. Through DPPH experiment, sophorolipids showed the scavenging activity with $IC_{50} = 1.4063$ mg/mL. These results showed that sophorolipids could be applied in cosmetics.

Keywords: sophorolipid, *Candida bombicola*, antibacterial, DPPH, coconut oil

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. I.M. Banat, R.S. Makkar, S.S. Cameotra, Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, 495–508 (2000).
- [2]. D.A. Cavaleiro, D.G. Cooper, The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214, *Journal of Biotechnology*, 103, 31–41 (2003).
- [3]. A. Daverey, K. Pakshirajan, Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium, *Appl Biochem Biotechnol*, 158, 663–674 (2009).
- [4]. J.D. Desai, I.M. Banat, Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 61, 47–64 (1997).
- [5]. D. Develter, S. Fleurackers, I.V. Bogaert, Method for the production of medium-chain sophorolipids, *US 8530206 B2* (2013).

- [6]. D.W.G. Develter, L.M.L. Lauryssen, Properties and industrial applications of sophorolipids, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 628–638 (2010).
- [7]. U. Gobbert, S. Lang, F. Wagner, Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*, *Biotechnol. Lett.*, 6, 225–230 (1984).
- [8]. P.A.J. Gorin, J.F.T. Spencer, A.P. Tulloch, Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnolia*, *Can. J. Chem.*, 39, 846–855 (1961).
- [9]. M.H. Gordon, I.A. Rahman, Effect of processing on the composition and oxidative stability of coconut oil, *JAOCs* 68, 574–576 (1991).
- [10]. R.K. Hommel, L. Weber, A. Weiss, U. Himmelreich, O. Rilke, H.P. Kleber, Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose, *J. Biotechnol.*, 33, 147–155 (1994).
- [11]. Inoue and Kimura, Novel microorganism. US Patent 4782025 (1988).
- [12]. A.C. Jose, G.O. Felix, Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture method, *J. Biosci Bioeng.*, 88, 4888–494 (1999).
- [13]. H.S. Kim, Y.B. Kim, B.S. Lee, E.K. Kim, Sophorolipid production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing byproduct, *J. Microbiol Biotechnol.*, 15, 55–58 (2005).
- [14]. R.M. Maier, G. Soberón-Chávez, *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 625–633 (2000).
- [15]. R.M. Mann, J.R. Bidwell, The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and, two exotic frogs, *Environ. Pollut.*, 114, 195–205 (2001).
- [16]. H. Marius, M.M. Markus, H.K. Johannes, B.L. Roberta, C. Jonas, S. Christoph, H. Rudolf, Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production, *Process Biochemistry*, 47, 1207–1219 (2012).
- [17]. V.K. Morya, J.H. Park, T.J. Kim, S. Jeon, E.K. Kim, Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture, *Bioresource Technology*, 143, 282–288 (2013).
- [18]. N.Q. Việt, N.B. Hữu, Đ.T.C. Hà, Khả năng tạo chất hoạt động bề mặt của chủng vi khuẩn KC31, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2, 501–510 (2004).
- [19]. J.F.T. Spencer, P.A.J. Gorin, A.P. Tulloch, *Torulopsis bombicola* sp. n. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 36, 129–133 (1970).
- [20]. I.N. Van Bogaert, K. Saerens, C. De-Muynck, D. Develter, W. Soetaert, E.J. Vandamme, Microbial production and application of sophorolipids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 23–34 (2007).
- [21]. S. Vishal, B. Daniel, R. Peter, Sophorolipids Having Enhanced antibacterial activity, antimicrob, *Agents Chemother.*, 51, 397–400 (2007).