

Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp lipid của hai chủng nấm men *Rhodosporidium toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765

Mai Thị Đàm Linh^{1*}, Đỗ Thị Quỳnh¹, Nguyễn Thị Thanh Mai², Phạm Thanh Hiền¹, Trần Văn Tuấn^{1,3}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN

³Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 1/7/2021; ngày chuyển phản biện 5/7/2021; ngày nhận phản biện 3/8/2021; ngày chấp nhận đăng 5/8/2021

Tóm tắt:

Nấm men *Rhodosporidium toruloides* có khả năng sinh tổng hợp và tích lũy lipid lên tới hơn 30% trọng lượng khô của tế bào. Đây là nguồn nguyên liệu tiềm năng dùng trong sản xuất diesel sinh học (biodiesel). Trong nghiên cứu này, các tác giả đã tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp lipid của 2 chủng nấm men *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765. Kết quả cho thấy, cả 2 chủng đều có khả năng tích lũy lipid đạt khoảng 45% trọng lượng khô của tế bào khi nuôi cấy ở 30°C trong 48 giờ với môi trường nuôi có pH 5,5. Khảo sát ảnh hưởng của một số nguồn cacbon lên khả năng sinh tổng hợp lipid của 2 chủng nấm men này cho thấy, rỉ đường có thể dùng làm nguồn cacbon thay thế cho glucose. Khi nuôi 2 chủng nấm men này trên nguồn cacbon giá rẻ là rỉ đường, khả năng sinh tổng hợp lipid của cả 2 chủng đạt khoảng 44%, tương đương với khi nuôi trên môi trường có nguồn cacbon là glucose.

Từ khóa: điều kiện nuôi cấy, nấm men, *Rhodosporidium toruloides*, sinh tổng hợp lipid.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Sự gia tăng của giá dầu thô cùng với những ảnh hưởng tiêu cực của nhiên liệu hóa thạch đối với môi trường đã thúc đẩy nhiều nghiên cứu về nhiên liệu sinh học trong những năm gần đây. Một trong những nguồn năng lượng tái tạo nổi bật nhất chính là biodiesel [1]. Nguồn cung cấp biodiesel bao gồm mỡ động vật, dầu thực vật hoặc các vi sinh vật sinh dầu (oleaginous microorganism). Sản xuất biodiesel từ mỡ động vật và dầu thực vật thường cần chi phí cao, đòi hỏi diện tích nuôi trồng lớn. Do đó, việc tìm kiếm các chủng vi sinh vật sinh lipid được đặc biệt quan tâm do chi phí sản xuất thấp, quá trình nuôi cấy đơn giản và có năng suất cao. Lipid tách chiết từ vi sinh vật được sử dụng để chuyển hóa thành dạng biodiesel tinh khiết [1-3].

Do nấm men có cấu tạo đơn bào, sinh trưởng nhanh trên môi trường dinh dưỡng đơn giản nên có nhiều lợi thế trong nghiên cứu sản xuất lipid hơn so với các vi sinh vật sinh lipid khác là nấm sợi và vi tảo [2]. Nấm men *R. toruloides* được chứng minh là có khả năng sinh tổng hợp một lượng lớn lipid và carotenoid, trong đó lượng lipid tích lũy có thể lên đến 30% trọng lượng tế bào ở một số chủng. Số lượng các công trình nghiên cứu về sinh tổng hợp lipid ở *R. toruloides* tăng nhanh trong những năm gần đây, đặc biệt khi công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, các kỹ thuật về cải biến di truyền và cải biến trao đổi chất ngày càng phát triển [1-3].

Quá trình sinh tổng hợp và tích lũy lipid ở *R. toruloides* phụ thuộc nhiều vào chủng giống, tỷ lệ nguồn cacbon/nitơ, thành phần môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy [4, 5]. Nghiên cứu xác định được các yếu tố thích hợp cho sinh trưởng ở mỗi chủng *R. toruloides* có thể thúc đẩy khả năng tích lũy lipid trong tế bào. Tại Việt Nam, chưa có công trình nào nghiên cứu về khả năng sinh lipid của các chủng nấm men, đặc biệt là từ *R. toruloides*. Các nghiên cứu trong

nước mới chỉ tập trung phân tích đặc điểm sinh học như khả năng sinh carotenoid, sinh tổng hợp sắc tố astaxanthin và nghiên cứu sự đa dạng của loài nấm men này [6, 7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện sinh trưởng đến khả năng sinh lipid của 2 chủng nấm men *R. toruloides* có nguồn gốc Việt Nam. Các kết quả thu được cho thấy, 2 loài nấm men này có khả năng tích lũy lipid lên đến gần 50% trọng lượng khô của tế bào khi được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu về nhiệt độ, thời gian và pH môi trường. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, nguồn phụ phẩm giá rẻ là rỉ đường có thể được sử dụng làm nguồn cacbon thay thế cho đường glucose để nuôi nấm men *R. toruloides* phục vụ thu nhận lipid ở quy mô lớn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng nấm men *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật (<http://vtcc.imbt.vnu.edu.vn>), Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy nấm men *R. toruloides*: bổ sung 2,5 ml dịch huyền phù chủng nấm men *R. toruloides* (OD=1 tương đương khoảng $5,3 \times 10^3$ CFU/ml) vào bình tam giác 100 ml chứa 50 ml môi trường MM (glucose 5 g, NH_4Cl 2 g, Na_2HPO_4 6 g, K_2HPO_4 3 g, cao nấm men 2 g, NaCl 5 g, MgSO_4 0,1 g, nước cất 1000 ml, pH 5,5). Nấm men được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút.

Tách chiết và xác định hàm lượng lipid từ sinh khối nấm men: sử dụng phương pháp tách chiết lipid của Bligh và Dyer (1959) [8] cho tỷ lệ 5 ml dịch nuôi cấy tương ứng. Ly tâm dịch nuôi cấy ở tốc

*Tác giả liên hệ: Email: linhmd@vnu.edu.vn

Study on the lipid biosynthesis of two oleaginous yeast strains *Rhodospiridium toruloides* VTCC 20689 and VTCC 20765

Thi Dam Linh Mai^{1*}, Thi Quynh Do¹,
Thi Thanh Mai Nguyen², Thanh Hien Pham¹,
Van Tuan Tran^{1,3}

¹Faculty of Biology, University of Science,
Vietnam National University, Hanoi

²Centre of Experimental Biology,

National Centre for Technological Progress, MOST

³National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology,
University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 1 July 2021; accepted 5 August 2021

Abstract:

The yeast *Rhodospiridium toruloides* is capable of lipid biosynthesis and accumulation up to more than 30% of dried cell biomass. It is a potential source for biodiesel production. Recent studies have shown that the applications of culture technologies can promote increased lipid accumulation in *R. toruloides*. In this study, the authors investigated the lipid biosynthesis ability of two yeast strains *R. toruloides* VTCC 20689 and VTCC 20765 isolated in Vietnam. The results indicated that both strains have the ability to accumulate lipids up to approximately 45% of the dried biomass of cells when cultured at 30°C for 48 h in the culture medium with pH 5.5. Cultivation of these two yeast strains on some different carbon sources showed that sugarcane molasses can be used as a low-cost carbon source for efficient lipid biosynthesis. When growing both strains on the medium with sugarcane molasses, the lipid biosynthesis reached about 44%, which is equivalent to in the medium with glucose.

Keywords: culture conditions, lipid biosynthesis, *Rhodospiridium toruloides*, yeast.

Classification number: 2.8

độ 6.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ dịch để thu cặn. Rửa cặn với nước cất vô trùng, sau đó ly tâm lần 2. Lặp lại bước rửa cặn, ly tâm để thu sinh khối. Sau đó, sinh khối được sử dụng để tách chiết lipid theo các bước như sau:

Bước 1: bổ sung 3,75 ml hỗn hợp methanol:chloroform (tỷ lệ 2:1) và trộn đều bằng máy vortex trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 2: bổ sung 1,25 ml chloroform, trộn đều bằng máy vortex trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 3: bổ sung 1,25 ml nước cất, trộn đều bằng máy vortex trong

15 phút ở nhiệt độ phòng.

Sau đó, hỗn hợp được ly tâm ở 3.000 vòng/phút, trong 15 phút ở 4°C. Hỗn hợp sau ly tâm gồm 3 lớp, trong đó lớp thứ nhất và thứ hai chứa xác tế bào và methanol (không chứa lipid), lớp thứ ba chứa hỗn hợp chloroform và lipid được thu hồi. Sấy khô mẫu dịch lỏng thu được ở 70-80°C cho đến khi khối lượng không thay đổi. Hàm lượng lipid thu được tính theo công thức:

$$W = W_2 - W_1$$

trong đó: W: lượng lipid thu được (g); W_2 : khối lượng ống sau khi sấy (g); W_1 : khối lượng ống rỗng trước khi thu dịch lỏng (g).

Thử nghiệm ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy: 2,5 ml dịch nuôi nấm men ($OD_{600\text{ nm}} = 1$) được bổ sung vào bình tam giác 100 ml chứa 50 ml môi trường MM. Nấm men được nuôi ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 126 giờ. Thu sinh khối nấm men sau 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96, 102, 120 và 126 giờ. Thực hiện tách chiết và xác định hàm lượng lipid của các mẫu sinh khối.

Thử nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy: nấm men được nuôi ở các nhiệt độ khác nhau gồm 25, 30 và 37°C. Môi trường và thời gian nuôi cấy tối ưu dựa vào các thí nghiệm đã thực hiện. Sinh khối tế bào nấm men được thu hồi cho tách chiết và xác định hàm lượng lipid.

Thử nghiệm ảnh hưởng của pH: pH của môi trường được xác định bằng máy đo pH. Hai dung dịch NaOH 1 M và HCl 4 M được sử dụng để điều chỉnh pH về các giá trị khác nhau, gồm pH 4,5, 5,5, 6,0, 6,5 và 7,0. Các bình nuôi cấy được nuôi ở 30°C trong máy lắc ổn nhiệt với tốc độ 200 vòng/phút trong thời gian tối ưu đã được xác định trước đó. Sau đó, dịch nuôi được ly tâm để thu sinh khối tế bào phục vụ cho tách chiết và xác định hàm lượng lipid.

Thử nghiệm ảnh hưởng của nguồn cacbon: glucose, glycerol, saccharose, lactose, maltose hoặc ri đường (5 g/l) được bổ sung vào môi trường MM (pH 5,5) dưới dạng nguồn cacbon duy nhất. Tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C; tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau thời gian nuôi cấy, thu sinh khối để tiến hành tách chiết và xác định hàm lượng lipid.

Xử lý số liệu: các thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập và số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft Excel.

Kết quả và thảo luận

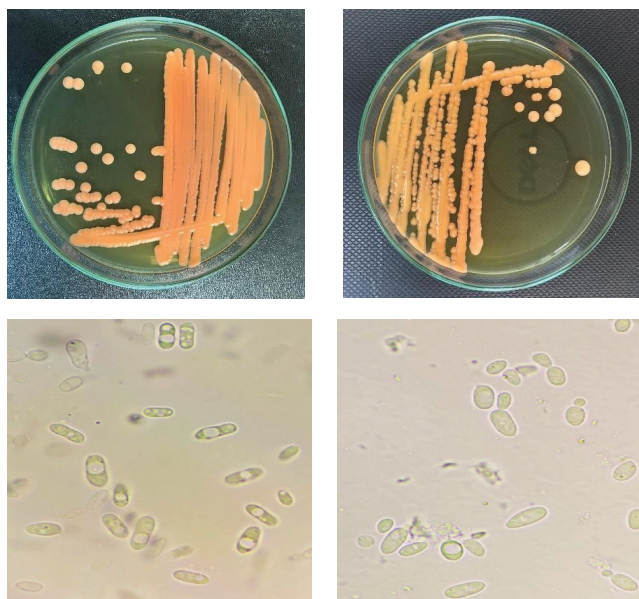
Đặc điểm hình thái của hai chủng *R. toruloides* dùng trong nghiên cứu

Chủng nấm men *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật. Tuy nhiên, thông tin liên quan đến đặc điểm hình thái của 2 chủng nấm men này trên cơ sở dữ liệu nguồn gen chưa có. Do đó, việc cung cấp minh chứng về đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của cả 2 chủng dùng trong nghiên cứu là cần thiết. Hai chủng được nuôi trên môi trường thạch YPD (yeast extract potato dextrose) trong 96 giờ ở 30°C để phục vụ phân tích đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào. Chủng *R. toruloides* VTCC 20689 có khuẩn lạc tròn, bề mặt trơn bóng, màu đỏ cam đậm. Chủng *R. toruloides* VTCC 20765 có hình thái tương tự như chủng *R. toruloides* VTCC 20689, nhưng khuẩn lạc có màu đỏ cam nhạt hơn. Khi quan sát dưới kính hiển vi, cả 2 chủng đều có tế bào hình ovan đặc trưng và chuyển thành dạng que ngắn với giọt lipid bên trong tế

bào ở giai đoạn già hóa (hình 1). Các kết quả này cũng tương đồng với các kết quả đã công bố về đặc điểm hình thái của *R. toruloides* [1, 2].

R. toruloides VTCC 20689

R. toruloides VTCC 20765



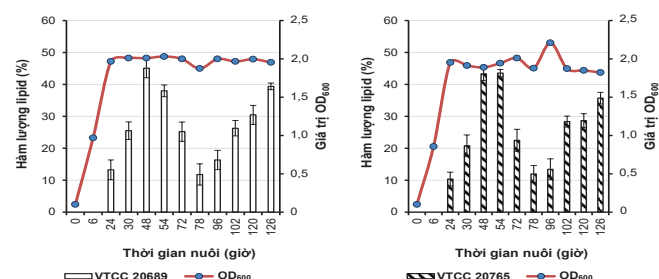
Hình 1. Đặc điểm hình thái của hai chủng nấm *R. toruloides*. Khuẩn lạc của chủng VTCC 20689 và VTCC 20765 nuôi trên môi trường YPD. Hình thái tế bào của 2 chủng dưới kính hiển vi (độ phóng đại 1.500 lần) sau 48 giờ nuôi trên môi trường MM.

Mỗi chủng *R. toruloides* có thể có những đặc điểm về sinh trưởng và khả năng tích lũy lipid khác nhau. Các thay đổi về thời gian, nhiệt độ nuôi cấy, nguồn cacbon có thể ảnh hưởng đến sự tích lũy của lipid trong tế bào nấm men. Do đó, việc xác định các điều kiện phù hợp cho sinh trưởng và tích lũy lipid của chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 là có ý nghĩa.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp lipid của 2 chủng *R. toruloides*

Xác định được thời gian nuôi cấy thích hợp sẽ giúp giảm chi phí thí nghiệm, đồng thời thu được sinh khối tế bào nấm men ở trạng thái tối ưu về tích lũy lipid. Sinh trưởng của hai chủng *R. toruloides* được khảo sát trong khoảng thời gian 0-126 giờ sử dụng phương pháp đo OD tại bước sóng 600 nm. Sau 24 giờ, sinh khối tế bào được thu hồi để tách chiết và xác định hàm lượng lipid. Kết quả cho thấy, 2 chủng *R. toruloides* bắt đầu sinh trưởng mạnh sau 6 đến 24 giờ nuôi và đạt mức sinh trưởng tối đa sau 48 giờ. Hàm lượng lipid tích lũy biến động theo thời gian và đạt mức cao nhất sau 48 giờ nuôi (tương ứng đạt 45,40% ở *R. toruloides* VTCC 20689 và 44,34% ở *R. toruloides* VTCC 20765). Sau một khoảng thời gian giảm xuống thì sự tích lũy lipid tăng trở lại ở thời điểm 126 giờ (đạt 39,38% ở *R. toruloides* VTCC 20689 và 35,69% ở *R. toruloides* VTCC 20765). Tuy nhiên, hàm lượng lipid tích lũy ở thời điểm 126 giờ vẫn thấp hơn ở 48 giờ và giảm mạnh sau 126 giờ nuôi cấy xuống dưới 30% (dữ liệu không chi ra). Theo Uprety và cs (2017) [9], thời gian nuôi cấy để thu lipid ở chủng *R. toruloides* ATCC 10788 là 168 giờ với hàm lượng lipid đạt trên 30%. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của Zheng và cs (2021) [10] cho thấy, thời gian cần để đạt được hàm lượng lipid tương tự ở

R. toruloides là 144 giờ. Trong nghiên cứu này, 2 chủng *R. toruloides* nguồn gốc Việt Nam (VTCC 20689, VTCC 20765) có tốc độ sinh trưởng nhanh và thời gian cần để tích lũy hàm lượng lipid cao nhất chỉ sau 48 giờ (hình 2).

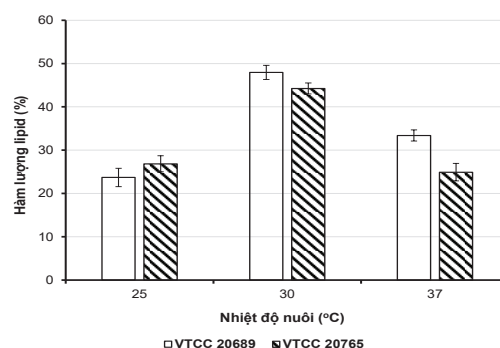


Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sinh trưởng và sinh tổng hợp lipid của chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765.

Kết quả thu được cho thấy, 2 chủng nấm men *R. toruloides* bắt đầu sinh trưởng mạnh sau 6 giờ nuôi cấy. Chủng hình thành hai đỉnh sinh trưởng lần lượt tại 48 và 96 giờ. Từ 102-126 giờ là giai đoạn suy thoái. Hàm lượng tích lũy lipid biến động theo thời gian, đạt cao nhất tại thời điểm nuôi cấy 48 giờ (khoảng 45% đối với *R. toruloides* VTCC 20689 và 44% đối với *R. toruloides* VTCC 20765) và thứ 2 là tại 126 giờ (39,38% với *R. toruloides* VTCC 20689 và 35,69% với *R. toruloides* VTCC 20765).

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp lipid của 2 chủng *R. toruloides*

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành khảo sát các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau để tìm ra nhiệt độ thích hợp nhất cho quá trình sinh tổng hợp lipid ở 2 chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



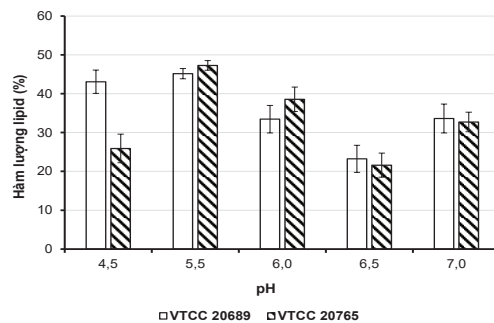
Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp lipid của chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765.

Kết quả hình 3 cho thấy, nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp lipid của cả 2 chủng *R. toruloides* là ở 30°C. Hàm lượng lipid thu được đạt khoảng 45% đối với chủng VTCC 20689 và 44% đối với chủng VTCC 20765. Ở nhiệt độ 25 và 37°C, khả năng sinh tổng hợp lipid của 2 chủng đều giảm mạnh (hàm lượng lipid chỉ đạt khoảng 30%). Theo các tổng hợp của Ageitos và cs (2011) [2], nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp lipid của các chủng nấm men *R. toruloides* thường là 28-30°C, chỉ một số chủng có khả năng tích lũy lipid ở 25°C. Trong nghiên cứu này, 2 chủng *R.*

toruloides VTCC 20689 và VTCC 20765 đều sinh tổng hợp lipid cao nhất ở nhiệt độ 30°C. Ở nhiệt độ 25 và 37°C, 2 chủng này tích lũy hàm lượng lipid tương đối thấp (dưới 30%).

Ảnh hưởng của pH đến sinh tổng hợp lipid của 2 chủng *R. toruloides*

Thay đổi giá trị pH môi trường nuôi có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp lipid của các chủng nấm men nghiên cứu. Chúng tôi tiến hành kiểm tra các giá trị pH khác nhau của môi trường nuôi cấy gồm pH 4,5, 5,5, 6, 6,5 và 7. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở hình 4.



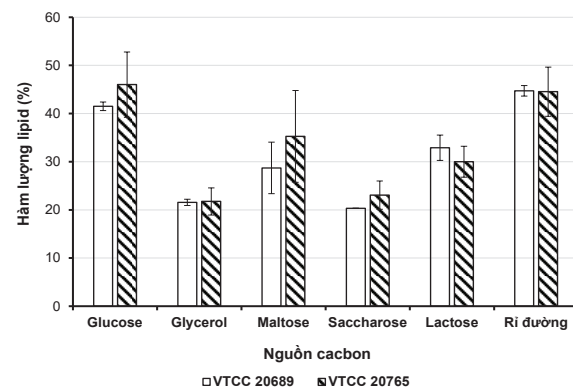
Hình 4. Sinh tổng hợp lipid ở các giá trị pH khác nhau của 2 chủng *R. toruloides*.

Kết quả thu được cho thấy, cả 2 chủng nấm men *R. toruloides* đều có khả năng sinh hàm lượng lipid cao ở pH 5,5 (đạt khoảng 45% trọng lượng sinh khối khô đối với chủng VTCC20689 và 44% đối với chủng VTCC 20765). Ở giá trị pH dưới 5 và trên 6, khả năng tích lũy lipid của 2 chủng này giảm đáng kể. Các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng, sự thay đổi giá trị pH môi trường có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp lipid ở nấm men *R. toruloides*. Nghiên cứu của Dias và cs (2016) [11] cho thấy, pH 4 là tối ưu nhất cho sinh tổng hợp lipid của chủng *R. toruloides* NCYC 921, trong khi pH 5 cho tốc độ sinh trưởng cao nhất. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy, pH 5-6 là thích hợp cho quá trình tích lũy lipid ở chủng nấm men *R. toruloides* [2]. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy, cả 2 chủng *R. toruloides* đều cho khả năng sinh lipid cao ở pH 5,5 với hàm lượng đạt khoảng 44-45% trọng lượng sinh khối khô. Tại pH dưới 5 và trên 6, khả năng tích lũy lipid của 2 chủng này giảm đáng kể. Do đó có thể kết luận rằng, giá trị pH 5,5 là thích hợp nhất cho nuôi cấy 2 chủng nấm men VTCC 20689 và VTCC 20765.

Như vậy, khi kiểm tra ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy, pH và thời gian nuôi khác nhau của 2 chủng nấm men *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 được phân lập tại Việt Nam cho thấy, 2 chủng này tích lũy lipid cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường MM ở nhiệt độ 30°C, pH 5,5 trong 48 giờ. Các đặc điểm này tương tự với nhiều công bố trên thế giới về điều kiện sinh lipid của loài nấm men *R. toruloides* này [2, 11]. Khả năng sinh tổng hợp lipid của 2 chủng nấm men phân lập tại Việt Nam đạt khá cao (khoảng 45%) so với các công bố về khả năng sinh lipid của loài *R. toruloides* [2, 9]. Tuy nhiên, có một điểm khác biệt là 2 chủng nấm men trong nghiên cứu này sinh tổng hợp và tích lũy lipid trong thời gian ngắn hơn (chỉ sau 48 giờ nuôi cấy), trong khi các công bố trên thế giới thường cho thấy, thời gian tích lũy lipid của *R. toruloides* là 72-96 giờ, thậm chí là trên 144 giờ [9, 10]. Đây sẽ là ưu điểm quan trọng khi ứng dụng các chủng nấm men này nhằm thu hồi lipid phục vụ cho sản xuất diesel sinh học.

Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng tích lũy lipid của hai chủng *R. toruloides*

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp lipid của 2 chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 trên các nguồn cacbon khác nhau, gồm glucose, ri đường, saccharose, maltose, lactose và glycerol. Kết quả được minh họa ở hình 5 cho thấy, cả 2 chủng đều sinh trưởng mạnh ($OD_{600} > 2$) trên môi trường chứa glycerol và saccharose, tuy nhiên hàm lượng lipid tích lũy trong tế bào lại thấp nhất (chỉ đạt khoảng 20%). Ngược lại, trên môi trường với ri đường là nguồn cacbon duy nhất, 2 chủng này sinh trưởng yếu hơn so với môi trường chứa glucose (OD_{600} chỉ đạt khoảng 1,6-1,7), nhưng cho hàm lượng lipid tích lũy trong tế bào đạt trên 44% đối với cả 2 chủng (tương đương nuôi trên nguồn glucose).



Hình 5. Sinh tổng hợp lipid của 2 chủng *R. toruloides* trên các nguồn cacbon khác nhau.

R. toruloides được chứng minh là có khả năng sinh trưởng trên nhiều nguồn cacbon khác nhau như glycerol, xylose, arabinose và thậm chí với cả dịch thủy phân lignocellulose, hay tinh bột [12-14]. Mặc dù glucose vẫn là nguồn cacbon tốt nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp lipid ở loài nấm men này, nhưng các công bố gần đây cho thấy, nhiều nguồn cacbon khác có thể sử dụng để thay thế glucose trong môi trường nuôi như glycerol, methanol giúp giảm chi phí [2, 13]. Glycerol được xem là cơ chất lý tưởng để thay thế glucose cho nuôi cấy nấm men sinh tổng hợp và tích lũy lipid [7, 15]. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của các tác giả, cả 2 chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 lại sinh tổng hợp lipid với hàm lượng khá thấp trên nguồn cacbon là glycerol (hình 5).

Ri đường là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất và tinh luyện đường, chứa hàm lượng cao các chất dinh dưỡng và khoáng chất hỗ trợ tốt cho sự sinh trưởng của nấm men [10, 15, 16]. Đây được coi là phế phụ phẩm của ngành công nghiệp sản xuất đường. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, 2 chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 sinh trưởng mạnh trên môi trường với nguồn cacbon là ri đường và sinh tổng hợp lipid với hàm lượng cao (tương đương với nguồn cacbon là glucose). Điều này mở ra tiềm năng ứng dụng nguồn cacbon giá rẻ (ri đường) trong nuôi cấy hai chủng nấm men VTCC 20689 và VTCC 20765 để thu nhận lipid quy mô lớn phục vụ cho sản xuất biodiesel trong tương lai.

Kết luận

Hai chủng nấm men *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 đã được chứng minh là có khả năng sinh tổng hợp lipid với hàm lượng đạt khoảng 45% trọng lượng khô của tế bào. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, cả 2 chủng đều có khả năng tích lũy lipid cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và pH 5,5. Điều kiện về nuôi cấy sinh lipid của 2 chủng VTCC 20689 và VTCC 20765 cũng tương đương với kết quả đã công bố đối với các chủng *R. toruloides* khác trên thế giới. Kết quả khảo sát sự sinh trưởng và sinh tổng hợp lipid trên các nguồn cacbon khác nhau đã tìm ra nguồn cacbon giá rẻ là rỉ đường, phù hợp để nuôi chủng *R. toruloides* VTCC 20689 và VTCC 20765 cho sinh tổng hợp lượng lớn lipid, tương đương với nuôi cấy trên nguồn glucose.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ (BIOFUND) của Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.L. Adrio (2017), "Oleaginous yeasts: promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels", *Biotechnology and Bioengineering*, **114**(9), pp.1915-1920.
- [2] J.M. Ageitos, et al. (2011), "Oily yeasts as oleaginous cell factories", *Applied and Microbiology and Biotechnology*, **90**(4), pp.1219-1227.
- [3] X. Meng, et al. (2009), "Biodiesel production from oleaginous microorganisms", *Renewable Energy*, **34**(1), pp.1-5.
- [4] R.R. Bommarreddy, W. Sabra, G. Maheshwari, A.P. Zeng (2015), "Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates", *Microbial Cell Factories*, **14**, pp.36-49.
- [5] J. Xu, W. Du, X. Zhao, D. Liu (2016), "Renewable microbial lipid production from oleaginous yeast: some surfactants greatly improved lipid production of *Rhodospiridium toruloides*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**(7), pp.107-116.
- [6] T.N. Tran, D.H. Ngo, Q.T. Tran, H.C. Nguyen, C.H. Su, D.N. Ngo (2020), "Enhancing astaxanthin biosynthesis by *Rhodospiridium toruloides* mutants and

optimization of medium compositions using response surface methodology", *Processes*, **8**(4), DOI: 10.3390/pr8040497.

[7] T.N. Tran, D.H. Ngo, N.T. Nguyen, D.N. Ngo (2019), "Draft genome sequence data of *Rhodospiridium toruloides* VN1, a strain capable of producing natural astaxanthin", *Data in Brief*, **26**, DOI: 10.1016/j.dib.2019.104443.

[8] E.G. Bligh, W.J. Dyer (1959), "A rapid method for total lipid extraction and purification", *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8), pp.911-917.

[9] B.K. Uprety, S.S. Dalli, S.K. Rakshit (2017), "Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities", *Energy Conversion and Management*, **135**, pp.117-128.

[10] X. Zheng, et al. (2021), "Lipid and carotenoid production by the *Rhodospiridium toruloides* mutant in cane molasses", *Bioresource Technology*, **326**, DOI: 10.1016/j.biortech.2021.124816.

[11] C. Dias, et al. (2016), "Effect of medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 carotenoid and lipid production evaluated by flow cytometry", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **179**(5), pp.776-787.

[12] Z. Gao, et al. (2016), "Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489", *Bioresource Technology*, **218**, pp.373-379.

[13] Q. Fei, et al. (2016), "Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source", *Biotechnology for Biofuels*, **9**, DOI: 10.1186/s13068-016-0542-x.

[14] S.S. Tchakouteu, et al. (2015), "Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency", *Journal of Applied Microbiology*, **118**(4), pp.911-927.

[15] M. Hassanpour, et al. (2020), "Scale-up of two-step acid-catalysed glycerol pretreatment for production of oleaginous yeast biomass from sugarcane bagasse by *Rhodospiridium toruloides*", *Bioresource Technology*, **313**, DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123666.

[16] N. Bonturi, et al. (2017), "Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain", *Process Biochemistry*, **57**, pp.16-25.