



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003287

(51)⁷ **C12N 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00529

(22) 27/11/2019

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/06/2021 399

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Hoàng Thị Yến (VN); Trần Thị Thu Quỳnh (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT AXIT BÉO KHÔNG NO DẠNG OMEGA 6,7,9 TỪ VI KHUẨN
TÍA QUANG HỢP**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất axit béo không no dạng omega 6,7,9 từ vi khuẩn tía quang hợp. Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng 2 chủng vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) không lưu huỳnh *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 thuần khiết về mặt sinh học do tác giả tự phân lập và tuyển chọn. Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy thu sinh khối;

(ii) thu sinh khối vi khuẩn tía quang hợp bằng chitosan

(iii) tách chiết và làm giàu axit béo không no dạng omega 6,7,9.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất axit béo không no dạng omega 6,7,9 từ vi khuẩn tía quang hợp. Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng 2 chủng vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) không lưu huỳnh *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 thuần khiết về mặt sinh học do tác giả tự phân lập và tuyển chọn.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Các nhà khoa học trên thế giới đã dự báo rằng thức ăn của con người trong thế kỷ 21 sẽ là thực phẩm chức năng. Các hoạt chất mà thực phẩm chức năng mang lại cho con người chính là những vị thuốc quý, giúp con người tăng cường hệ miễn dịch, chống lão hoá, kéo dài tuổi thọ, phòng và chữa các bệnh mãn tính kể cả ung thư. Thực phẩm chức năng giàu axit béo không no (dạng omega 3,6,7,9) là một trong những loại thực phẩm được con người rất quan tâm và sử dụng hàng ngày.

Các axit béo omega 6 (ω -6) là một họ các axit béo không no đa nối đôi, chúng có nối đôi C=C ở vị trí carbon thứ 6 tính từ đầu methyl của chuỗi axit béo. Các axit béo chính trong họ omega 6 là axit linoleic (AL) (C18:2, n-6); axit gamma linoleic (AGL) (C18:3, n-6); axit eicosadienoic (C20:2, n-6); axit dihomogamma-linoleic (DGLA) (C20:3, n-6); axit arachidonic (AA) (C20:4, n-6); axit docosadienoic (C22:2, n-6) và axit docosapentaenoic (DPA) (C22:5, n-6) (Lunn và Theobald, 2003).

Các axit béo omega 7 thuộc họ các axit béo không no có một nối đôi (monounsaturated fatty axit - MUFA) và đa nối đôi (polyunsaturated fatty axit – PUFA). Chúng có một nối đôi C=C ở vị trí carbon thứ 7 tính từ đầu methyl của chuỗi axit béo. Các axit béo chính trong họ omega 7 là axit palmitoleic (C16:1, n-7); axit vaccenic (C18:1, n-7) và axit paulinic (C20:1, n-7) và axit có 2 nối đôi là axit rumenic (C18:2, n-7).

Các axit béo omega 9 cũng thuộc họ các axit béo không no một nối đôi, chúng có nối đôi C=C ở vị trí carbon thứ 9 tính từ đầu methyl của chuỗi axit béo. Các axit béo chính là axit oleic (C18:1, n-9); axit elaidic (C18:1, n-9); axit gondoic (C20:1, n-9); axit mead

(C20:3, n-9); axit erucic (C22:1, n-9) và axit nervonic (C24:1, n-9).

Tác dụng của omega 6 (www.viendinhduong.vn).

- Bệnh thần kinh và đái tháo đường: một số nghiên cứu cho thấy uống axit linolenic gamma (AGL) trong 6 tháng trở lên có thể làm giảm triệu chứng đau dây thần kinh ở những người bị bệnh thần kinh, đái tháo đường.
- Ung thư vú: AGL ức chế hoạt động của khối u trong các dòng tế bào ung thư vú.
- Cao huyết áp: AGL giúp giảm huyết áp cao
- Loãng xương: thiếu omega 6 có khả năng gây loãng xương. Nghiên cứu cho thấy, phụ nữ trên 65 tuổi bị loãng xương bổ sung omega 6 đã ít loãng xương ít nhất 3 năm so với không bổ sung.
- Kích thích da và tóc tăng trưởng
- Điều tiết trao đổi chất và duy trì các hệ thống sinh sản.

Tác dụng của omega 7 (www.viendinhduong.vn)

- Tóc, da và móng tay: sử dụng omega 7 làm mái tóc sáng bóng, da sáng, móng tay khỏe mạnh. Ngoài ra, omega 7 còn được khuyến cáo để giúp chống lại các triệu chứng lão hoá sớm như: nếp nhăn, khô, mất độ đàn hồi, suy dinh dưỡng và các dấu hiệu lão hoá.
- Giảm cân: Tiến sỹ OZ (2011) đã chứng minh omega 7 có tác dụng giảm cân. Thí nghiệm được tiến hành như sau: cho 2 con chuột ăn cùng một lượng chất béo cao. Một con thì cho ăn bổ sung cây hắc mai biển (chứa nhiều omega 7) còn một con thì không cho ăn. Kết quả ông quan sát thấy con chuột ăn bổ sung cây hắc mai biển duy trì cân nặng và vóc dáng, trong khi đó con chuột không ăn bổ sung có hiện tượng béo phì rõ ràng. Do vậy, ông đưa ra kết luận rằng omega 7 là một công cụ mạnh mẽ trong cuộc chiến giảm cân.
- Sức khỏe tim mạch: omega 7 có tác dụng duy trì mức cholesterol khỏe mạnh và lượng đường trong máu. Ngoài ra, omega 7 còn giúp động mạch hoạt động tốt hơn.
- Tiêu hoá: omega 7 có tác dụng bôi trơn các màng nhầy, cải thiện nhiều vấn đề về viêm và loét đường tiêu hoá, chống táo bón.

- Giữ ẩm cho da, tóc, móng tay và mắt: omega 7 cung cấp các dưỡng chất và độ ẩm cần thiết cho da, tóc. Các nghiên cứu gần đây cho thấy omega 7 có lợi cho những người mắc bệnh khô mắt và những phụ nữ bị khô âm đạo vì nó nuôi dưỡng và giữ ẩm cho các màng nhầy.

Tác dụng của omega 9 (www.viendinhduong.vn).

- Tác dụng giảm cholesterol xấu
- Giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch, giảm xơ cứng động mạch
- Tăng cường hệ miễn dịch
- Ổn định lượng đường trong máu

Omega 3,6,9 được chiết xuất chủ yếu từ dầu thực vật, động vật và từ vi tảo biển. Tuy nhiên, omega 7 lại rất khan hiếm trong giới thực vật và cả giới động vật. Chúng được chiết xuất chủ yếu từ cây hắc mai biển và dầu macadamia (www.viendinhduong.com).

Trên thế giới trong khoảng gần 3 thập kỷ trở lại đây nhóm vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) cũng đã được quan tâm nghiên cứu, ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của cuộc sống như xử lý nước thải; làm phân bón sinh học; làm thức ăn trong nuôi trồng thủy sản. Ngoài ra, cũng có nhiều nghiên cứu khai thác trong lĩnh vực hoạt chất sinh học như: chất chống oxy hoá; chất kháng sinh; vitamin; enzyme; hormone thực vật và gần đây người ta còn phát hiện thấy trong tế bào của VKTQH còn chứa axit béo không no một nối đôi (MUFAs - omega 7) với hàm lượng rất cao (chiếm từ 65 đến 82% tổng axit béo) (Hiraishi và Ueda., 1995; Rai và cs., 2015; Kim 2012a, 2013). Ngoài ra, một số loài VKTQH còn có khả năng tổng hợp PUFAs và thậm chí còn có loài tổng hợp được cả HUFA (EPA và DHA) (Loo và cs., 2012, 2013). Các loài có khả năng tổng hợp axit béo không no điển hình thuộc các chi: *Rhodovulum* (*R. strictum*, *R. sulfidophilum*, *R. adriaticum*, *R. euryhalinum*; *R. tesquicola*); *Rhodobacter marinus*; *Rhodopseudomonas palustris*; *Rhodobacter viridis*).

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết các tồn tại nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất axit béo không no (omega 6,7,9) từ vi khuẩn tía quang hợp. Trong đó, quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng hai chủng VKTQH không lưu huỳnh *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 thuần khiết về mặt sinh học do tác giả tự phân lập và

tuyển chọn, có khả năng sinh trưởng mạnh (lần lượt theo ΔOD_{660} là $1,415 \pm 0,012$ và $1,337 \pm 0,022$), chứa hàm lượng lipid cao (đạt $21,457 \pm 2,272$ và $22,413 \pm 2,165\%$ TLK tương ứng) và có khả năng tổng hợp được omega 6,7,9 ($81,66\%$ và $81,68\%$ trong ứng của tổng axit béo). Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

- (i) nuôi cấy thu sinh khối;
- (ii) thu sinh khối vi khuẩn tía quang hợp bằng chitosan
- (iii) tách chiết và làm giàu axit béo không no dạng omega 6,7,9.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1: là hình ảnh thể hiện các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6.

Hình 2: là hình ảnh thể hiện các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2.

Hình 3: thể hiện cây phân loại của chủng vi khuẩn *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và chủng vi khuẩn *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2

Hình 4: thể hiện kết quả máy phân tích thực hiện kết quả tích thành phần axit béo (%) của chủng VKTQH *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 khi được nuôi trên môi trường chứa 2 g dịch chiết bột đậu tương.

Hình 5: thể hiện kết quả máy phân tích thực hiện kết quả tích thành phần axit béo (%) của chủng VKTQH *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 khi được nuôi trên môi trường chứa 2 g dịch chiết bột đậu tương

Hình 6: mô hình đáp ứng bề mặt sử dụng để tối ưu hoá các thành phần môi trường nuôi hỗn hợp 2 chủng VKTQH lựa chọn.

Hình 7: nồng độ của các thành phần môi trường nuôi

Hình 8: là hình ảnh tế bào của hỗn hợp 2 chủng VKTQH thu bằng ly tâm và chitosan.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Hai chủng vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) không lưu huỳnh *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 thuần khiết về mặt sinh học là 2 chủng vi khuẩn do các tác giả giải pháp hữu ích tự phân lập và tuyển chọn. Trong đó,

chủng HPB.6 được phân lập từ bùn thải thu tại cảng cá Ngọc Hải, Đồ Sơn, Hải Phòng, chủng VTN.2 được phân lập từ nước thải nhà máy sản xuất và chế biến cá tại thành phố Vũng Tàu, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Hai chủng vi khuẩn này được lựa chọn dựa trên các tiêu chí như: sinh trưởng mạnh (lần lượt theo ΔOD_{660} : $1,415 \pm 0,012$ và $1,337 \pm 0,022$; theo hàm lượng sinh khối khô: $0,775 \pm 0,081$ g/l và $0,787 \pm 0,058$ g/l), tích lũy lipid cao ($21,457 \pm 2,272$ % và $22,413 \pm 2,165$ % TLK) và đặc biệt có khả năng tổng hợp axit béo không no (chiếm 81,66% và 81,68 % của tổng axit béo) khi nuôi 2 chủng VKTQH này trên môi trường dịch chiết bột đậu tương ở nồng độ 2 g/l (Bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm của hai chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn

Đặc điểm	Chủng	HPB.6	VTN.2
ΔOD_{660}		$1,415 \pm 0,012$	$1,337 \pm 0,022$
Lipid (w/w % TLK)		$21,457 \pm 2,272$	$22,413 \pm 2,165$
Omega 6 (% TFA)		35,78	25,6
Omega 7 (% TFA)		23,31	33,31
Omega 9 (% TFA)		22,57	22,77
Omega 6,7,9 (% TFA)		81,66	81,68

Khuẩn lạc của 2 chủng này có dạng hình tròn, bề mặt lồi, mép căng, màu nâu đỏ (chủng HPB.6), màu nâu vàng (chủng VTN.2), đường kính $d = 2,4 - 2,6$ mm (chủng HPB.6), $d = 1,8 - 2$ mm (chủng VTN.2). Tế bào của 2 chủng vi khuẩn này có hình oval, đường kính $0,7 - 1,5$ μ m, Gram (-), chứa *bacteriochlorophyll a* (Bchl a). Ngoài ra, sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử đã xác định được trình tự gen 16S rARN, đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại của 2 chủng VKTQH này. Chủng HPB.6 (SEQ ID NO: 1) có mức độ tương đồng cao nhất 99,7% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum* (mã số D16423). Chủng VTN.2 (SEQ ID NO: 2) có mức độ tương đồng 99,3% so với loài *Rhodobacter sphaeroides* (mã số AM983575.1). Khi nghiên cứu các đặc điểm sinh học cơ bản định hướng ứng dụng cho thấy 2 loài vi khuẩn này có khả năng sinh trưởng mạnh khi nuôi trong các điều kiện như:

- pH: chủng HPB.6 từ 5,0 – 8,0 (tối ưu tại pH 6,5); chủng VTN.2 từ 6,0-8,5 (tối ưu tại pH 7,0)
- Nồng độ muối (NaCl): chủng HPB.6 từ 2 - 6 % (tối ưu trong khoảng từ 2,5 - 3,5%); chủng VTN.2 từ 0-4% (tối ưu trong khoảng từ 2,0 - 3,0%)

- Nhiệt độ tối ưu của cả 2 chủng: 30°C - 32°C và đạt 88-96% ở khoảng nhiệt độ 38°C-40°C và 60-82% ở nhiệt độ 14-16°C
- Cường độ sáng từ 5.000 – 20.000 lux
- Sinh trưởng tối ưu ở điều kiện kỵ khí và đạt 90% ở điều kiện vi hiếu khí
- Hai chủng vi khuẩn này có khả năng sinh trưởng mạnh trong môi trường chứa một số nguồn cacbon và nitơ như: malate, acetate, succinate, glutamate, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, cao nấm men v.v..

Hai chủng VKTQH không lưu huỳnh phân lập được trên đây trong đó *Rhodovulum sulfidophilum* được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 còn *Rhodobacter sphaeroides* được đặt tên là *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 và được lưu trữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất axit béo không no dạng omega 6,7,9 từ hỗn hợp 2 chủng VKTQH *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2. Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

- (i) nuôi cấy thu sinh khối;
- (ii) thu sinh khối vi khuẩn tía quang hợp bằng chitosan
- (iii) tách chiết và làm giàu axit béo không no dạng omega 6,7,9.

Trong bước nuôi cấy thu sinh khối VKTQH này, môi trường nuôi đóng vai trò quan trọng. Sử dụng môi trường nuôi có thành phần: 2,7g/l dịch chiết bột đậu tương; 3 g/l cao nấm men; 22 mg/l Mg²⁺ đã được tối ưu hoá bằng mô hình đáp ứng bề mặt (RSM) để nuôi hỗn hợp 2 chủng VKTQH trong túi zipbox (1lít) đã thu được hàm lượng sinh khối khô cao gấp 6 lần so với sử dụng môi trường chưa tối ưu. Ngoài ra, hàm lượng lipid (g/l) và thành phần axit béo (% tổng axit béo) hầu như không thay đổi. Môi trường nuôi cấy nêu trên là kết quả nghiên cứu của tác giả giải pháp hữu ích, nhằm tối ưu hóa hiệu quả nuôi cấy thu sinh khối của hỗn hợp 2 chủng VKTQH (Bảng 2)

Bảng 2. Một số đặc điểm của 2 chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn khi nuôi trên hai môi trường (tối ưu hoá và chưa tối ưu hoá)

Đặc điểm	Môi trường dịch chiết bột đậu tương (2g/l)		Môi trường đã được tối ưu	
	HPB.6	VTN.2	HPB.6	VTN.2
Sinh khối khô (g/l)	0,775 ± 0,081	0,721 ± 0,036	4,665 ± 0,326	4,376 ± 0,262
Lipid (% g/l)	21,457 ± 2,272	20,471 ± 2,209	20,324 ± 2,021	20,029 ± 1,827
Omega 3 (% TFA)	0,0	KXĐ	1,04	KXĐ
Omega 6 (% TFA)	9,79	KXĐ	4,54	KXĐ
Omega 7 (% TFA)	55,4	KXĐ	62,21	KXĐ
Omega 9 (% TFA)	3,4	KXĐ	9,41	KXĐ

Chú thích: KXĐ: không xác định

Từ các kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh học cơ bản, định hướng ứng dụng, kết quả nghiên cứu xác định thành phần môi trường nuôi và xác định khả năng đối kháng của hai chủng vi khuẩn này. Tác giả của giải pháp hữu ích đã xác định các điều kiện tối ưu để thực hiện nuôi cấy thu sinh khối từ hỗn hợp 2 chủng VKTQH này để sử dụng làm nguyên liệu tách chiết các axit béo không no dạng omega 6,7,9.

Bước nuôi cấy thu sinh khối này được thực hiện theo các bước nhỏ như sau:

(i.1) nhân giống cấp 1:

Các VKTQH không lưu huỳnh (chủng VTN.2 thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides* và chủng HPB.6 thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum*) được bảo quản trong ống nghiệm trên môi trường DSMZ-27 ở 4°C có bổ sung NaCl 25g/l và được cấy chuyển với tần xuất 1 tháng/lần trong điều kiện vô trùng. Ống giống phải giữ sạch, không được tạp nhiễm các loại vi sinh vật khác. Từng chủng VKTQH mọc trên môi trường thạch sau khi cấy chuyển được 5-7 ngày được cấy riêng rẽ trong điều kiện vô trùng vào các lọ thủy tinh có thể tích 13ml chứa 10 ml môi trường DSMZ-27 lỏng, đậy kín bằng nắp cao su và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt với cường độ ánh sáng khoảng 5.000 lux ở nhiệt độ 30 – 32°C. Sau 4 ngày chuyển sang bình hình trụ 100ml môi trường DSMZ-27 dạng lỏng theo cách tương tự. Dịch nuôi cấy sau khoảng 4-5 ngày, có mật độ khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml và không tạp nhiễm là đảm bảo tiêu chuẩn làm giống gốc cho các bước nhân giống tiếp theo. Từ bình 100 ml cấy chuyển sang bình 500ml chứa môi trường DSMZ-27 dịch, bổ sung NaCl với hàm lượng 25 g/l. Quy trình nuôi cấy được tiến hành tương tự như trên.

Môi trường DSMZ-27 được mua sẵn trên thị trường và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh có thể thực hiện việc lấy giống 2 chủng VKTQH từ ống thạch nghiêng và chọn bình nuôi sơ cấp tương ứng, cũng như các thiết bị cần thiết để thực hiện các điều kiện nuôi cấy.

(i.2) nhân giống cấp 2:

Mỗi chủng VKTQH đều có những ưu việt riêng và hai chủng lựa chọn không đối kháng nhau. Do vậy, ở bước này thực hiện trộn các chủng với tỷ lệ như nhau (1:1). Tiến hành nhân nuôi hỗn hợp giống sang bình duran có thể tích 1 lít chứa 900ml môi trường bán tổng hợp (BTH) được tối ưu hoá (2,7g/l dịch chiết bột đậu tương; 3 g/l cao nấm men; 22 mg/l Mg^{2+}) chứa NaCl 25 g/L và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt với cường độ ánh sáng khoảng 5.000 lux ở nhiệt độ 30 – 32°C. Lượng giống hỗn hợp ban đầu cho vào với tỉ lệ 20% (v/v) tương ứng với OD ban đầu vào khoảng 0,2-0,3. Sau 4-5 ngày có thể sử dụng để tiếp tục nhân giống sang bình 5 lít và 10 lít với quy trình và môi trường nuôi tương tự.

Môi trường bán tổng hợp (BTH) có thành phần như sau: 2,7g/l dịch chiết bột đậu tương; 3 g/l cao nấm men; 22 mg/l Mg^{2+} ; và 1 lít nước biển.

Nước biển có thể lấy từ nguồn bất kỳ, hoặc có thể được pha bằng cách bổ sung NaCl ở nồng độ 25g/l. Môi trường BTH là môi trường do tác giả giải pháp hữu ích nghiên cứu nhằm tối ưu hóa hiệu suất của quy trình này. Sau thời gian nuôi cấy, mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy cấp 2 có thể đạt tới 5.10^8 - 10^9 tế bào/ml.

(i.3) nhân giống cấp 3

Giống VKTQH sau đó được cấy chuyển sang bình nhựa trong có thể tích 50 lít và sau 5-7 ngày chuyển sang bể nhựa hình hộp 250 lít chứa $\frac{1}{2}$ môi trường BTH với tỷ lệ giống ban đầu là 20%. Sau khoảng 5-7 ngày, khi mật độ quang (ΔOD_{800}) trong bể 50 lít và 250 lít đạt khoảng 1,5-1,8 tiếp tục nhân sinh khối trong các bể tiếp theo với tỷ lệ giống/môi trường là 20%.

Nhân giống cấp 3 trong điều kiện bể nuôi được đậy kín để hạn chế oxy xâm nhập, nhiệt độ khoảng 25°C - 35°C, độ pH = 6,5 - 7, cường độ sáng 4.000 - 10.000 lux, có khuấy đảo ngầm, trong thời gian 5-6 ngày. Việc chiếu sáng được thực hiện bằng ánh sáng tự nhiên, buổi tối được chiếu sáng bằng đèn sợi đốt và khuấy đảo ngầm được thực hiện bằng cách khuấy từ hoặc bơm ngầm có công suất thích hợp sao cho nồng độ oxy hòa tan trong

bể không vượt quá 1mg O₂/lít. Việc khuấy đảo vừa giúp vi khuẩn nuôi trong bể tiếp xúc đồng đều với nguồn sáng vừa giúp sinh khối không bị lắng cặn.

(i.4) nuôi trong bể phản ứng quang sinh

Nhân nuôi giống từ bình thể tích 250 lít sang bể kính có thể tích lớn 1.000 lít, rồi lần lượt sang bể kính có thể tích 2.000 lít, bể 3000 lít chứa ¼ môi trường BTH theo cách tương tự và đặt dưới ánh sáng tự nhiên, buổi tối được chiếu sáng bằng đèn sợi đốt. Để sinh khối trong bể nhận được ánh sáng mặt trời và từ đèn được đồng đều (và cũng để chống lắng sinh khối), đã khuấy đảo dịch nuôi bằng bơm ngầm có công suất thích hợp. Lấy mẫu 24h/lần để theo dõi các thông số pH, nhiệt độ, mật độ tế bào, sinh khối tươi, khô, phân tích lipid tổng số, thành phần axit béo...

Môi trường nuôi VKTQH trong các bình nhỏ (từ 10-20 lít) được khử trùng ở 121⁰C trong 30 phút và nước nuôi VKTQH ở thể tích từ 50-3000 lít được khử trùng bằng cách sử dụng clorin ở nồng độ 30ppm, khuấy đều cho đến khi tan hết. Sau 30 phút xử lý, lượng clorin dư được trung hoà bằng Na₂S₂O₃.

(ii) thu sinh khối vi khuẩn tía quang hợp bằng chitosan:

Sau khoảng 5-7 ngày nuôi VKQHT có thể đạt mật độ gần 10⁹ tế bào/ml, dùng nuôi cấy và tiến hành thu hoạch sinh khối ngay trong ngày để đảm bảo hàm lượng lipid và thành phần axit béo không thay đổi. Dịch VKTQH được bổ sung chất trợ lắng chitosan ở nồng độ 150mg/l sau đó được khuấy mạnh, đều trong 2-5 phút, để ổn định trong 2-3 giờ. Sau khi các tế bào VKTQH lắng đọng xuống đáy bể, tiến hành loại bỏ dịch trên và thu cặn là sinh khối VKTQH bằng cách lọc qua vải. Sinh khối tươi VKTQH được sấy khô ở 70⁰C để dễ dàng bảo quản cũng như dùng làm nguyên liệu tách chiết dầu sinh học giàu omega 6, 7, 9.

(iii) tách chiết và làm giàu axit béo không no dạng omega 6,7,9:

Sinh khối khô VKTQH thu được từ bước (ii) được nghiền thành dạng bột. Cân 1kg sinh khối khô cho vào chai có thể tích 20 lít. Bổ sung 9L metanol, 1L axit clohydric đậm đặc, 5L diclometan vào chai chứa sinh khối, lắc đều, vặn chặt nắp. Quá trình phản ứng được thực hiện trên máy khuấy ở nhiệt độ 70-75⁰C, trong 3 giờ, chế độ khuấy liên tục. Sau phản ứng thu được hỗn hợp màu nâu cánh gián, để hỗn hợp nguội ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút.

Lọc hỗn hợp để loại bỏ sinh khối: Hỗn hợp sau khi phản ứng xong, để nguội được bổ sung thêm 2L NaCl bão hòa. Hỗn hợp được lắc đều và lọc qua giấy lọc để loại bỏ bã sinh khối. Thu dịch lỏng chứa axit béo tổng số.

Tách TFA: Hỗn hợp dịch lỏng thu được sau khi lọc bã sinh khối được tách chiết với dung môi n-hexan. Bổ sung n-hexan vào hỗn hợp trên, lắc đều hỗn hợp và cho lên phễu chiết để phân lớp. Sau khoảng 10-15 phút, hỗn hợp phân thành 2 lớp: lớp trên màu vàng sáng chứa TFA, lớp dưới màu nâu sẫm chứa metanol, axit clohydric, diclometan và bã sinh khối. Lớp trên chứa TFA được thu lại. Tiếp tục bổ sung n-hexan vào lớp dưới để tách chiết TFA cho đến khi lớp trên màu vàng nhạt. Quá trình tách TFA được tiến hành cho đến khi hết toàn bộ hỗn hợp sau phản ứng ở trên.

Loại dung môi thu hỗn hợp axit béo tổng số: dung môi chứa hỗn hợp axit béo tự do được làm khô bằng cách lọc hỗn hợp qua phễu lọc có bổ sung muối Na_2SO_4 khan. Sau đó tiến hành cô quay chân không ở 70°C để loại bỏ dung môi n-hexan và thu nhận hỗn hợp axit béo tổng số.

Để tạo hỗn hợp phản ứng tạo phức với ure, cân 1760g ure vào bình chứa, bổ sung 8,8 Lít Metanol. Tiến trình khuấy trên máy khuấy từ đồng thời gia nhiệt ở 60°C cho đến khi ure tan hoàn toàn trong metanol. Bổ sung từ từ 440g TFA vào hỗn hợp trên. Hỗn hợp tiếp tục được khuấy từ thêm 10 – 15 phút để TFA tan đều trong hỗn hợp. Sau đó, hỗn hợp được để nguội ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Tạo phức kết tinh: sau khi pha hỗn hợp axit béo và ure tan hoàn toàn trong metanol, đưa hỗn hợp vào trong tủ lạnh để hạ nhiệt độ xuống khoảng 4°C và để tĩnh qua đêm nhằm tạo phức kết tinh giữa ure và các axit béo no, axit béo không no một nối đôi. Hỗn hợp phân thành 2 pha: pha rắn và pha lỏng.

Kết thúc quá trình tạo phức kết tinh, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc để loại bỏ phức kết tinh (pha rắn bao gồm ure và các axit béo no, axit béo không no một nối đôi). Thu dịch lỏng là hỗn hợp các axit béo không no chứa omega 6, 7, 9.

Loại dung môi thu hỗn hợp PUFAs: Dịch lỏng chứa hỗn hợp các axit béo omega 6, 7, 9 được cô quay chân không ở 70°C để loại bỏ metanol. Sau khi cô quay loại dung môi, hỗn hợp thu được ở dạng rắn, kết tinh màu vàng sáng bao gồm PUFAs, ure bị lẫn.

Hỗn hợp PUFAs thu được sau cô quay được tách ra bằng cách bổ sung nước nóng

60° C, khuấy từ gia nhiệt trên máy khuấy từ cho đến khi hỗn hợp tan hoàn toàn. Hỗn hợp phân thành 2 lớp, lớp trên màu vàng chứa PUFAs, lớp dưới màu trắng chứa nước và ure. Hỗn hợp được phân lớp trên phễu chiết. Thu lớp trên chứa PUFAs. Bổ sung dung môi n-hexan vào lớp dưới để thu hồi triệt để PUFAs.

Thu axit béo không no dạng omega 6,7,9: Dung môi n- hexan chứa PUFAs được loại nước bằng cách lọc hỗn hợp qua phễu lọc có bổ sung muối Na₂SO₄ khan. Sau đó tiến hành cô quay chân không ở 70° C để loại bỏ dung môi và thu hồi hỗn hợp axit béo không no đa nối đôi và hiệu suất khoảng 20 - 22% TFA.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng sinh trưởng mạnh, chứa hàm lượng lipid cao và có thành phần axit béo không no (dạng omega 6,7,9) cao hơn 80% tổng axit béo.

Từ 58 mẫu bùn, đất, nước ở một số khu vực ô nhiễm hữu cơ cao ở vùng ven biển, ao đầm nuôi thủy sản, nước thải nhà máy sản xuất và chế biến cá biển, đất ruộng muối, nước thải ở nhà máy sản xuất và chế biến dầu ăn... ở một số tỉnh miền Bắc, miền Trung và miền Nam Việt Nam đã phân lập và làm sạch được 155 chủng VKTQH. Tiến hành sàng lọc các chủng vi khuẩn này dựa vào khả năng sinh trưởng mạnh (ΔOD_{660} , sinh khối khô (SKK), và khả năng tích lũy lipid cao (% sinh khối khô). Kết quả, cho thấy trong số 155 chủng VKTQH nuôi trong môi trường DSMZ-27 có tốc độ sinh trưởng tính theo ΔOD_{660} đạt từ $0,285 \pm 0,037$ đến $1,523 \pm 0,037$. Trong đó có 116 chủng có ΔOD_{660} cao hơn (khoảng $> 0,6$). Do đó, tác giả đã lựa chọn 116 chủng này nuôi trong môi trường dịch chiết bột đậu tương (2g/l) để tiến hành sàng lọc tiếp. Kết quả xác định tốc độ sinh trưởng (theo ΔOD_{800}) cho thấy trong số 116 chủng có 96 chủng có khả năng tích lũy sinh khối khá cao (theo ΔOD_{800}) và theo hàm lượng SKK đạt khoảng 0,9 và 0,6 g/l tương ứng). Do vậy, 96 chủng này được tiến hành phân tích hàm lượng lipid tổng số. Kết quả cho thấy hàm lượng lipid tổng số của 96 chủng dao động trong khoảng từ $7,526 \pm 2,678$ % đến $22,413 \pm 2,165$ % SKK. Trong số 96 chủng này, tác giả đã lựa chọn được 11 chủng đồng thời có hàm lượng sinh khối khô và hàm lượng lipid cao hơn cả (khoảng từ 0,7 - 0,8g/l và 19 – 22% tương ứng), đó là các chủng có kí hiệu: QNN.19; HPB.6; HPB.11; NĐN.9; NĐB.19; THN.5; THN.16; THN.24; NAN.11; VTN.2; VTN.29. Do vậy, tác giả đã sử dụng 11

chủng này để tiến hành xác định hàm lượng axit béo tổng số bằng phương pháp GC-MS (Bảng 3). Kết quả Bảng 3 cho thấy, trong số 11 chủng nêu trên chủng HPB.6 và VTN.2 có khả năng sinh trưởng mạnh (theo ΔOD_{660} : $1,415 \pm 0,012$ và $1,337 \pm 0,022$ tương ứng; theo hàm lượng sinh khối khô: $0,775 \pm 0,081 \text{ g/l}$ và $0,787 \pm 0,058 \text{ g/l}$ tương ứng), tích lũy lipid cao ($21,457 \pm 2,272\%$ và $22,413 \pm 2,165\%$ TLK tương ứng) và có khả năng tổng hợp axit béo không no MUFAs và PUFAs (dạng omega 6, 7, 9) cao hơn cả (đạt 81,66 và 81,68% của tổng axit béo tương ứng). Axit béo không no dạng omega 6, 7, 9 mà 2 chủng vi khuẩn HPB.6, VTN.2 tổng hợp ra có các thành phần như sau: omega 6: 35,78% và 25,6%; omega 7: 23,31% và 33,31; omega 9: 22,57% và 22,77% tổng axit béo tương ứng. Trong khi đó, các chủng vi khuẩn khác có hàm lượng sinh khối khô, lipid và omega 6, 7, 9 thấp hơn 2 chủng HPB.6 và VTN.2. Do vậy, 2 chủng HPB.6 và VTN.2 đã được lựa chọn để sản xuất sinh khối sử dụng làm nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm chức năng giàu omega 6, 7, 9.

Bảng 3. Thành phần axit béo của các chủng VKTQH lựa chọn

Chủng	ĐC	QNN.19	HPB.6	HPB.11	NĐN.9	NĐB.19	THN.5	THN.16	THN.24	NAN.11	VTN.2	VTN.29
Axit béo(%)												
14:00		0,37	0,1	0,36	0,67	0,39		0,26				0,9
16:1(n-7)			0,45									
16:1(n-9)						0,1						
16:00	10,74	47,45	9,89	16,39	35,98	18,28	12,63	20,63	9,69	7,52	9,37	22,65
17:00			0,23			0,1	0,5					
18:2(n-6)	44,23	5,2	35,78	29,76	10,12	13,21	21,61	15,19	20,57	7,29	25,6	5,6
18:1(n-9)	38,45	3,26	21,41	36,80	38,64	18,77	19,58	21,49	32,12	45,33	22,77	28,86
18:1(n-7)	0,32	28,8	22,86	6,01	5,82	27,98	22,53	21,35	1,71	6,57	33,31	22,06
18:2(n-9)			1,16									
18:00	6,11	14,93	7,73	5,13	6,01	14,14	12,17	12,85	12,69	14,68	8,95	10,42
18:1(n-9), 12 hydroxyl						6,81	10,05	8,23	23,22	18,61		10,12
18:2n-3	0,12											
18:2n-7				5,47	2,76							
20:00			0,2	0,08		0,12	0,29					0,2
22:00			0,18			0,1	0,65					
Tổng	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100
SKK (g/l)	0,06 $\pm$ 0,021	0,83 $\pm$ 0,062	0,775 $\pm$ 0,081	0,729 $\pm$ 0,036	0,813 $\pm$ 0,038	0,702 $\pm$ 0,062	0,792 $\pm$ 0,049	0,767 $\pm$ 0,051	0,901 $\pm$ 0,029	0,877 $\pm$ 0,052	0,787 $\pm$ 0,058	0,713 $\pm$ 0,09
Lipid (%)	Kpt	21,716 $\pm$ 1,142	21,457 $\pm$ 2,272	1,396 $\pm$ 2,365	19,627 $\pm$ 2,23	22,326 $\pm$ 1,025	21,767 $\pm$ 2,215	20,710 $\pm$ 2,098	19,446 $\pm$ 2,531	19,732 $\pm$ 1,588	22,413 $\pm$ 2,165	20,275 $\pm$ 2,18
Omega 3 (%)	0,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Omega 6 (%)	44,23	5,2	35,78	29,76	10,12	13,21	21,61	15,19	20,57	7,29	25,6	5,6

<i>Omega 7 (%)</i>	0,32	28,8	23,31	11,48	8,58	27,98	22,53	21,35	1,71	6,57	33,31	22,06
<i>Omega 9 (%)</i>	38,45	3,26	22,57	36,8	38,64	18,87	19,58	21,49	32,12	45,33	22,77	28,86
<i>Omega 6,7,9 (%)</i>		37,26	81,66	78,04	57,34	60,06	63,75	58,03	54,4	59,19	81,68	56,52

Khuẩn lạc của 2 chủng này có dạng hình tròn, bề mặt lồi, mép căng, màu nâu đỏ (chủng HPB.6), màu nâu vàng (chủng VTN.2), đường kính $d = 2,4 - 2,6$ mm (chủng HPB.6), $d = 1,8 - 2$ mm (chủng VTN.2). Tế bào của 2 chủng vi khuẩn này có hình oval, đường kính $0,7 - 1,5$ μ m, Gram (-), chứa *bacteriochlorophyll a* (Bchl a) (Hình 1 và 2). Ngoài ra, sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử đã xác định được trình tự gen 16S rARN (SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2), đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại của 2 chủng VKTQH này (Hình 3) và chủng HPB.6 có mức độ tương đồng cao nhất 99,7% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum* (mã số D16423). Chủng VTN.2 có mức độ tương đồng 99,3% so với loài *Rhodobacter sphaeroides* (mã số AM983575.1) (SEQ ID NO: 1). Hai chủng vi khuẩn phân lập được được định danh là *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6, và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2.

Kết quả xác định thành phần axit béo (%) của 2 chủng VKTQH *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6, và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 (omega 6: 35,78% và 25,6%; omega 7: 23,31% và 33,31; omega 9: 22,57% và 22,77% tổng axit béo tương ứng) khi được nuôi trên môi trường chứa 2 g dịch chiết bột đậu tương được thể hiện trên Hình 4.

Hai chủng VKTQH *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 phân lập và tuyển chọn được được bảo quản dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong ống thạch nghiêng.

Ví dụ 2: Nuôi cấy thu sinh khối 2 chủng VKTQH làm nguyên liệu tách chiết các axit béo không no (dạng omega 6,7,9)

Cấy chuyển chủng VTN.2 thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides* và chủng HPB.6 thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* từ ống thạch nghiêng sang bình thủy tinh 13ml chứa 10 ml môi trường DSMZ-27 dịch, bổ sung NaCl với hàm lượng 25 g/l, đậy kín bằng nắp cao su, đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt với cường độ chiếu sáng khoảng 5.000lux ở nhiệt độ

30°C - 32°C, pH = 6,5 - 7, nuôi cấy trong thời gian 5 ngày, thu dịch nuôi cấy sơ cấp. Sau khoảng thời gian này, mật độ tế bào vi khuẩn trong dịch nuôi cấy sơ cấp đạt $5.10^8 - 10^9$ tế bào/ml. Tiếp theo, cấy chuyển dịch nuôi cấy sơ cấp sang bình thủy tinh hình trụ 100ml và 500 ml chứa môi trường DSMZ-27 dịch, bổ sung NaCl với hàm lượng 25 g/l, đậy kín bằng nắp cao su. Nuôi cấy các bình này tương tự như phần trên.

Trong bước tiếp theo tiến hành trộn các chủng với tỷ lệ như nhau 1:1 (v/v). Tiến hành nhân nuôi hỗn hợp giống sang bình duran có thể tích 1 lít chứa 950ml môi trường bán tổng hợp (BTH) được tối ưu hoá (2,7g/l dịch chiết bột đậu tương; 3 g/l cao nấm men; 22 mg/l Mg^{2+}) chứa NaCl 25 g/L và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt với cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux ở nhiệt độ 30 – 32°C. Lượng giống hỗn hợp ban đầu cho vào với tỷ lệ 20% (v/v) tương ứng với OD ban đầu vào khoảng 0,2-0,3. Sau 4-5 ngày có thể sử dụng để tiếp tục nhân giống sang bình 5 lít và 10 lít với quy trình và môi trường nuôi tương tự.

Hỗn hợp giống VKTQH sau đó được cấy chuyển sang bình nhựa trong có thể tích 50 lít và sau 5-7 ngày chuyển sang bể nhựa hình hộp 250 lít chứa $\frac{1}{2}$ môi trường BTH với tỷ lệ giống ban đầu là 20%. Sau khoảng 5-7 ngày, khi mật độ quang (ΔOD_{800}) trong bể 50 lít và 250 lít đạt khoảng 1,5-1,8 tiếp tục nhân sinh khối trong các bể tiếp theo với tỷ lệ giống/môi trường là 20%. Nhân giống cấp 3 trong điều kiện bể nuôi được đậy kín để hạn chế oxy xâm nhập, nhiệt độ khoảng 25°C - 35°C, độ pH = 6,5 – 7, cường độ sáng 4.000 – 10.000 lux, có khuấy đảo ngầm, trong thời gian 5-6 ngày. Việc chiếu sáng được thực hiện bằng ánh sáng tự nhiên, buổi tối được chiếu sáng bằng đèn sợi đốt và khuấy đảo ngầm được thực hiện bằng cách khuấy từ hoặc bơm ngầm có công suất thích hợp sao cho nồng độ oxy hòa tan trong bể không vượt quá 1mg O_2 /lít. Việc khuấy đảo vừa giúp vi khuẩn nuôi trong bể tiếp xúc đồng đều với nguồn sáng vừa giúp sinh khối không bị lắng cặn.

Nhân nuôi giống từ bình thể tích 250 lít sang bể kính có thể tích lớn 1.000 lít, rồi lần lượt sang bể kính có thể tích 2.000 lít, bể 3000 lít chứa $\frac{1}{4}$ môi trường BTH theo cách tương tự và đặt dưới ánh sáng tự nhiên, buổi tối được chiếu sáng bằng đèn sợi đốt. Để sinh khối trong bể nhận được ánh sáng mặt trời và từ đèn được đồng đều (và cũng để chống lắng sinh khối), đã khuấy đảo dịch nuôi bằng bơm ngầm có công suất thích hợp. Lấy mẫu 24h/lần để theo dõi các thông số pH, nhiệt độ, mật độ tế bào, sinh khối tươi, khô, phân tích lipid tổng số, thành phần axit béo...

Bảng 5. Kết quả xác định các điều kiện nuôi, hàm lượng sinh khối và lipid thu được khi nhân nuôi trong bể 3 m³.

Đợt nuôi cấy	Các điều kiện nuôi cấy		Hàm lượng sinh khối			Lipit (%)
	T ^o	pH	OD ₈₀₀	SKT (g/l)	SKK (g/l)	
4/2019	31	7,0	2,843 ± 0,275	12,185 ± 0,823	2,417 ± 0,324	18,601 ± 0,213
6/2019	33	7,0	3,028 ± 0,314	12,546 ± 0,754	2,514 ± 0,164	17,372 ± 0,308
8/2019	34	7,0	2,658 ± 0,176	11,121 ± 0,512	2,312 ± 0,224	18,079 ± 0,205
10/2019	30	7,0	2,613 ± 0,273	10,509 ± 0,667	2,221 ± 0,209	16,785 ± 0,335

Ví dụ 3: Thu sinh khối VKTQH bằng chitosan

Để thu sinh khối VKTQH, các điều kiện được sử dụng như sau: nồng độ chitosan 150mg/l; pH môi trường nuôi; thời gian lắng: 30 phút; mật độ vi khuẩn nằm trong khoảng 2,8-4,8. Sinh khối tươi thu được được quan sát tế bào bằng kính hiển vi điện tử (SEM) và so sánh với ly tâm (Hình 8).

Kết quả từ Hình 8 cho thấy tế bào VKTQH thu bằng chitosan có các màng chitosan bám dính, chúng liên kết và bám dính vào tế bào vi khuẩn tạo thành khối có kích thước, khối lượng lớn và lắng xuống.

Tiếp theo, tiến hành sấy sinh khối tươi đến khối lượng không đổi ở 70°C để xác định hàm lượng sinh khối khô (g/l), hàm lượng lipid (%TLK) và thành phần axit béo (% tổng axit) và so sánh với phương pháp ly tâm. Kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Hàm lượng lipid và thành phần axit béo của VKTQH khi sinh khối được thu bằng chitosan và ly tâm

Hàm lượng lipid và thành phần axit béo		Phương pháp thu sinh khối	
		Chitosan	Ly tâm
<i>Sinh khối khô (g/l)</i>		2,325 ± 0,187	2,013 ± 0,153
<i>Lipid (% TLK)</i>		22,25 ± 1,172	25,11 ± 1,634
<i>Thành phần axit béo (% tổng axit)</i>			
Axit béo	Tên thường		
14:0	Myristic axit	0,11	0,13
15:0	Pentadecylic axit	0,23	0,26

16:1 (n-9)	Palmitoleic axit	0,59	0,78
16:0	Palmitic axit	9,92	11,32
18:2n-6	Linoleic axit	43,96	44,06
18:1n-9	Oleic axit	29,19	27,75
18:1n-9, 12 hydroxy	Ricinoleic axit	4,10	0,0
18:1n-7	Vaccenic axit	5,61	5,03
18:3 n-3	Anpha linolenic axit	1,38	1,01
18:0	Stearic axit	3,29	4,49
18:2 n-7	Rumenic axit	5,59	4,44
20:0	Arachidic axit	0,14	0,32
22:0	Behenic axit	0,0	0,42

Từ Bảng 6 cho thấy hàm lượng sinh khối khô thu bằng chitosan và ly tâm lần lượt là $2,325 \pm 0,187$ g/l và $2,013 \pm 0,153$ g/l tương ứng. Khi thu sinh khối bằng chitosan hàm lượng sinh khối khô tăng lên khoảng 300 mg (khoảng 1,15 lần) so với ly tâm. Hàm lượng lipid tổng số khi sinh khối thu được bằng chitosan và ly tâm lần lượt là 22,25% và 25,11% tương ứng.

Như vậy, hàm lượng sinh khối VKTQH khi thu bằng chitosan cao hơn so với ly tâm có thể được giải thích là do sự kết khối giữa chitosan và sinh khối VKTQH (150mg chitosan/lít dịch VKTQH), thành phần môi trường nuôi cấy (dịch chiết bột đậu tương), sản phẩm của quá trình sinh trưởng của VKTQH...

Hàm lượng sinh khối khô thu được khi sử dụng chitosan tăng lên so với ly tâm đã làm cho hàm lượng lipid giảm đi vì do cách tính lipid (%TLK). Tuy nhiên, lượng lipid thu được không sai khác nhiều khi sử dụng cả hai phương pháp trên (Bảng 1). Kết quả phân tích sắc ký (GC-MS) cho thấy thành phần axit béo hầu như không khác nhau ở cả hai phương pháp này.

Như vậy, đã lựa chọn chitosan (loại tan trong axit acetic 0,4%) làm tác nhân thu sinh khối VKTQH trong số 4 chất trợ lắng: sắt chlorua (FeCl_3), nhôm sunfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), chitosan loại tan trong nước và chitosan loại tan trong axit acetic 0,4%.

Kết quả thu nhận sinh khối VKTQH dựa trên tác nhân kết lắng chitosan với các điều kiện như nồng độ chitosan: 150 mg/l; pH môi trường nuôi (6,5-6,7); thời gian lắng: 30 phút và mật độ sinh khối tế bào nằm trong khoảng 2,738-4,732.

So sánh hiệu quả thu sinh khối VKTQH bằng chitosan so với phương pháp ly tâm cho thấy hàm lượng sinh khối thu được tăng 1,15 lần. Khối lượng lipid (gam) không thay đổi và thành phần axit béo là tương đương nhau.

Ví dụ 4: Tách chiết axit béo không no dạng omega 6,7,9

Hỗn hợp phản ứng: sinh khối khô (SKK) VKTQH được nghiền thành dạng bột. Cân 1kg SKK cho vào chai có thể tích 20 lít. Bổ sung 9L metanol, 1L axit clohydric đậm đặc, 5L diclometan vào chai chứa sinh khối, lắc đều, vặn chặt nắp. Quá trình phản ứng được thực hiện trên máy khuấy ở nhiệt độ 70-75°C, trong 3 giờ, chế độ khuấy liên tục. Sau phản ứng thu được hỗn hợp màu nâu cánh gián, để hỗn hợp nguội ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút.

Lọc hỗn hợp để loại bỏ sinh khối: Hỗn hợp sau khi phản ứng xong, để nguội được bổ sung thêm 2L NaCl bão hòa. Hỗn hợp được lắc đều và lọc qua giấy lọc để loại bỏ bã sinh khối. Thu dịch lỏng chứa axit béo tổng số.

Tách TFA: Hỗn hợp dịch lỏng thu được sau khi lọc bã sinh khối được tách chiết với dung môi n-hexan. Bổ sung n-hexan vào hỗn hợp trên, lắc đều hỗn hợp và cho lên phễu chiết để phân lớp. Sau khoảng 10-15 phút, hỗn hợp phân thành 2 lớp: lớp trên màu vàng sáng chứa TFA, lớp dưới màu nâu sẫm chứa metanol, axit clohydric, diclometan và bã sinh khối. Lớp trên chứa TFA được thu lại. Tiếp tục bổ sung n-hexan vào lớp dưới để tách chiết TFA cho đến khi lớp trên màu vàng nhạt. Quá trình tách TFA được tiến hành cho đến khi hết toàn bộ hỗn hợp sau phản ứng ở trên.

Loại dung môi: dung môi chứa hỗn hợp axit béo tự do được làm khô bằng cách lọc hỗn hợp qua phễu lọc có bổ sung muối Na_2SO_4 khan. Sau đó tiến hành cô quay chân không ở 70°C để loại bỏ dung môi n-hexan và thu nhận hỗn hợp axit béo tổng số.

Đề tạo hỗn hợp phản ứng tạo phức với ure, cân 1760g ure vào bình chứa, bổ sung 8,8 Lít Metanol. Tiến trình khuấy trên máy khuấy từ đồng thời gia nhiệt ở 60°C cho đến khi Ure tan hoàn toàn trong metanol. Bổ sung từ từ 440g TFA vào hỗn hợp trên. Hỗn hợp tiếp tục được khuấy từ thêm 10 – 15 phút để TFA tan đều trong hỗn hợp. Sau đó, hỗn hợp được để nguội ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Tạo phức kết tinh: Sau khi pha hỗn hợp axit béo và ure tan hoàn toàn trong metanol, đưa hỗn hợp vào trong tủ lạnh để hạ nhiệt độ xuống khoảng 4°C và để tĩnh qua

đem nhằm tạo phức kết tinh giữa ure và các axit béo no, axit béo không no một nối đôi. Hỗn hợp phân thành 2 pha: pha rắn và pha lỏng.

Kết thúc quá trình tạo phức kết tinh, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc để loại bỏ phức kết tinh (pha rắn bao gồm ure và các axit béo no, axit béo không no một nối đôi). Thu dịch lỏng là hỗn hợp các axit béo không no chứa omega 6, 7, 9.

Dịch lỏng chứa hỗn hợp các axit béo omega 6, 7, 9 được cô quay chân không ở 70°C để loại bỏ metanol. Sau khi cô quay loại dung môi, hỗn hợp thu được ở dạng rắn, kết tinh màu vàng sáng bao gồm PUFAs, ure bị lẫn.

Hỗn hợp PUFAs thu được sau cô quay được tách ra bằng cách bổ sung nước nóng 60°C , khuấy từ gia nhiệt trên máy khuấy từ cho đến khi hỗn hợp tan hoàn toàn. Hỗn hợp phân thành 2 lớp, lớp trên màu vàng chứa PUFAs, lớp dưới màu trắng chứa nước và ure. Hỗn hợp được phân lớp trên phễu chiết. Thu lớp trên chứa PUFAs. Bổ sung dung môi n-hexan vào lớp dưới để thu hồi triệt để PUFAs.

Dung môi n-hexan chứa PUFAs được loại nước bằng cách lọc hỗn hợp qua phễu lọc có bổ sung muối Na_2SO_4 khan. Sau đó tiến hành cô quay chân không ở 70°C để loại bỏ dung môi và thu hồi hỗn hợp axit béo không no đa nối đôi và hiệu suất khoảng 20 - 22% TFA. Sản phẩm thu được là axit béo không no dạng omega 6,7,9.

Hiệu quả đạt được theo giải pháp hữu ích

Sử dụng môi trường dịch chiết bột đậu tương (nồng độ 2g/l), đã sàng lọc được hai chủng VKTQH không lưu huỳnh có khả năng sinh trưởng mạnh (lần lượt theo ΔOD_{660} là $1,415 \pm 0,012$ và $1,337 \pm 0,022$), chứa hàm lượng lipid cao ($21,457 \pm 2,272\%$ và $22,413 \pm 2,165\%$ TLK) đặc biệt có khả năng tổng hợp được các axit béo không no (dạng omega 6,7,9) đến trên 80% của tổng axit béo (chủng HPB.6 đạt 81,66% SKK và chủng VTN.2 đạt 81,68% SKK). Như vậy, lần đầu tiên ở Việt Nam, tác giả đã tìm kiếm, lựa chọn được 2 chủng VKTQH (chủng VTN.2 thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides* và chủng HPB.6 thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum*) có khả năng tổng hợp được các axit béo không no (dạng omega 6,7,9) sử dụng làm thực phẩm chức năng.

Đã sử dụng các cơ chất rẻ tiền và dễ kiếm như: bột đậu tương, cao nấm men, Mg^{2+} làm môi trường nhân nuôi hỗn hợp 2 chủng VKTQH. Sử dụng mô hình hoá, tối ưu hoá các thành phần môi trường nuôi này để nuôi hỗn hợp 2 chủng VKTQH lựa chọn trong túi

zipbox (1 lít) cho kết quả sinh khối khô tăng gấp 6 lần so với sử dụng môi trường nuôi chưa tối ưu hoá. Đặc biệt là hàm lượng lipid (g/l) và thành phần axit béo không thay đổi nhiều. Môi trường nuôi chứa các thành phần như: 2,7g/l dịch chiết bột đậu tương; 3 g/l cao nấm men; 22 mg/l Mg^{2+} . Như vậy, lần đầu tiên ở Việt Nam đã sử dụng môi trường chứa cơ chất rẻ tiền và dễ kiếm để sản xuất sinh khối VKTQH sử dụng làm nguyên liệu tách chiết axit béo không no.

Đã xây dựng được quy trình sản xuất sinh khối VKTQH quy mô 3 m³/bể với thành phần môi trường nuôi là ¼ môi trường đã tối ưu hoá. Sau các đợt nhân nuôi, hàm lượng sinh khối khô trung bình đạt 2,2-2,5 g/l và hàm lượng lipid là 16-18% TLK sau 7 ngày nuôi cấy.

Đã lựa chọn chitosan (loại tan trong axit) sử dụng làm chất trợ lắng thu sinh khối VKTQH với các điều kiện như nồng độ chitosan: 150mg/l; pH môi trường nuôi; thời gian lắng: 30 phút; mật độ vi khuẩn nằm trong khoảng 2,8-4,8.

Đã xây dựng được quy trình tách chiết dầu sinh học giàu axit béo không no (dạng omega 6,7,9) với các thông số như: chất xúc tác – HCl; tỷ lệ sinh khối- hỗn hợp dung môi là 1: 10; nhiệt độ phản ứng là 70-75°C; thời gian phản ứng là 3 giờ; điều kiện khuấy liên tục; tỷ lệ TFA: urê là 1:4; tỷ lệ urê: metanol là 1: 5; nhiệt độ kết tinh là 4°C; nhiệt độ sấy sinh khối ban đầu là 70-80°C. Hiệu suất tách chiết axit béo tổng số (TFA) từ sinh khối VKTQH đạt được trên 15-20% sinh khối khô. Hiệu suất tách chiết axit béo không bão hòa từ TFA của VKTQH thu được đạt khoảng 20-27% so với TFA.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất axit béo không no dạng omega 6,7,9 từ vi khuẩn tía quang hợp bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy thu sinh khối;

(i.1) nhân giống cấp 1:

Vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) không lưu huỳnh *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 thuần khiết về mặt sinh học được bảo quản trong ống nghiệm trên môi trường DSMZ-27 ở 4°C có bổ sung NaCl 25g/l và được cấy chuyển với tần suất 1 tháng/lần trong điều kiện vô trùng;

Tùng chủng *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6 và *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2 mọc trên môi trường thạch sau khi cấy chuyển được 5-7 ngày được cấy riêng rẽ trong điều kiện vô trùng vào các lọ thủy tinh có thể tích 13ml chứa 10 ml môi trường DSMZ-27 lỏng, đậy kín bằng nắp cao su và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt với cường độ ánh sáng khoảng 5.000 lux ở nhiệt độ 30 – 32°C;

Sau 4 ngày chuyển sang bình hình trụ 100ml môi trường DSMZ-27 dạng lỏng theo cách tương tự và nuôi cấy trong 4-5 ngày, đạt mật độ khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml, thu giống gốc cho các bước nhân giống tiếp theo;

Từ bình 100 ml cấy chuyển sang bình 500ml chứa môi trường DSMZ-27 dịch, bổ sung NaCl với hàm lượng 25 g/l, đậy kín bằng nắp cao su và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt với cường độ ánh sáng khoảng 5.000 lux ở nhiệt độ 30 – 32°C;

(i.2) nhân giống cấp 2:

Trộn các chủng với tỷ lệ 1:1. tiến hành nhân nuôi hỗn hợp giống sang bình duran có thể tích 1 lít chứa 900ml môi trường bán tổng hợp (BTH) được tối ưu hoá có thành phần 2,7g/l dịch chiết bột đậu tương; 3 g/l cao nấm men; 22 mg/l Mg^{2+} , chứa NaCl 25 g/L và đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt với cường độ ánh sáng khoảng 5.000 lux ở nhiệt độ 30 – 32°C; lượng giống hỗn hợp ban đầu cho vào với tỉ lệ 20% (v/v) tương ứng với OD ban đầu vào khoảng 0,2-0,3;

Sau 4-5 ngày tiếp tục nhân giống sang bình 5 lít và 10 lít với điều kiện tương tự khi nuôi trong bình 1 lít, thu được giống VKTQH có mật độ khoảng 5.10^8 - 10^9 tế bào/ml;

(i.3) Nhân giống cấp 3:

Giống VKTQH sau đó được cấy chuyển sang bình nhựa trong có thể tích 50 lít và sau 5-7 ngày chuyển sang bể nhựa hình hộp 250 lít chứa $\frac{1}{2}$ môi trường BTH với tỷ lệ giống ban đầu là 20%, sau khoảng 5-6 ngày, khi mật độ quang (ΔOD_{800}) trong bể 50 lít và 250 lít đạt khoảng 1,5-1,8 tiếp tục nhân sinh khối trong các bể tiếp theo với tỷ lệ giống/môi trường là 20%;

Điều kiện nuôi nhân giống cấp 3 là bể nuôi được đậy kín để hạn chế oxy xâm nhập, nhiệt độ khoảng 25°C - 35°C , độ pH = 6,5 - 7, cường độ sáng 4.000 - 10.000 lux, có khuấy đảo ngầm, trong thời gian 5-6 ngày;

(i.4) nuôi trong bể phản ứng quang sinh:

Nhân nuôi giống từ bình thể tích 250 lít sang bể kính có thể tích lớn 1.000 lít, rồi lần lượt sang bể kính có thể tích 2.000 lít, bể 3000 lít chứa $\frac{1}{4}$ môi trường BTH với tỷ lệ giống ban đầu là 20%, sau khoảng 7-8 ngày mật độ quang (ΔOD_{800}) trong bể 3.000 lít đạt khoảng 2,4-2,6 tiến hành thu hoạch sinh khối;

(ii) thu sinh khối vi khuẩn tía quang hợp bằng chitosan:

Sau khoảng 7-8 ngày nuôi trong bể phản ứng quang sinh, dừng nuôi cấy và tiến hành thu hoạch sinh khối bằng cách bổ sung chất trợ lắng chitosan ở nồng độ 150mg/l, khuấy mạnh, đều trong 2-5 phút, để ổn định trong 2-3 giờ;

Sau khi các tế bào VKTQH lắng đọng xuống đáy bể, tiến hành loại bỏ dịch trên và thu cặn là sinh khối VKTQH bằng cách lọc qua vải, thu sinh khối tươi VKTQH;

Sinh khối tươi VKTQH được sấy khô ở 70°C thu sinh khối khô VKTQH;

(iii) tách chiết và làm giàu axit béo không no dạng omega 6,7,9:

Sinh khối khô VKTQH thu được từ bước (ii) được nghiền thành dạng bột, cân 1kg sinh khối khô cho vào chai có thể tích 20 lít, bổ sung 9L metanol, 1L axit clohydric đậm đặc, 5L diclometan vào chai chứa sinh khối, lắc đều, vặn chặt nắp, thực hiện trên máy khuấy ở nhiệt độ $70-75^{\circ}\text{C}$, trong 3 giờ, chế độ khuấy liên tục, thu được hỗn hợp màu nâu cánh gián, để hỗn hợp nguội ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút;

Lọc hỗn hợp để loại bỏ sinh khối bằng cách bổ sung 2L NaCl bão hòa vào hỗn hợp thu được; lắc đều và lọc qua giấy lọc để loại bỏ bã sinh khối, thu dịch lỏng chứa axit béo tổng số;

Hỗn hợp dịch lỏng thu được sau khi lọc bã sinh khối được tách chiết với dung môi n-hexan bằng cách bổ sung n-hexan vào hỗn hợp dịch lỏng thu được, lắc đều hỗn hợp và cho lên phễu chiết để phân lớp; sau khoảng 10-15 phút, hỗn hợp phân thành 2 lớp, thu lớp trên; tiếp tục bổ sung n-hexan vào lớp dưới để tách chiết cho đến khi lớp trên màu vàng nhạt; gộp các lớp trên thu được để thu TFA;

Loại dung môi thu hỗn hợp axit béo tổng số bằng cách làm khô bằng cách lọc hỗn hợp TFA qua phễu lọc có bổ sung muối Na_2SO_4 khan; Sau đó tiến hành cô quay chân không ở 70°C để loại bỏ dung môi n-hexan và thu nhận hỗn hợp axit béo tổng số;

Tạo hỗn hợp phản ứng tạo phức với ure bằng cách cân 1760g ure vào bình chứa, bổ sung 8,8 Lít Metanol; thực hiện khuấy trên máy khuấy từ đồng thời gia nhiệt ở 60°C cho đến khi ure tan hoàn toàn trong methanol;

Bổ sung từ từ 440g TFA vào hỗn hợp trên; tiếp tục khuấy từ thêm 10 – 15 phút để TFA tan đều trong hỗn hợp; để nguội hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 30 phút;

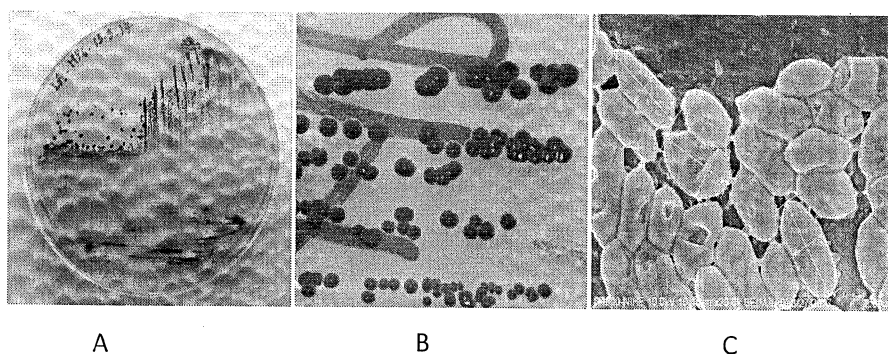
Hạ nhiệt độ hỗn hợp đã để nguội xuống khoảng 4°C và để tĩnh qua đêm;

Lọc hỗn hợp đã để tĩnh qua đêm qua giấy lọc để loại bỏ phức kết tủa, thu dịch lỏng là hỗn hợp các axit béo không no chứa omega 6, 7, 9;

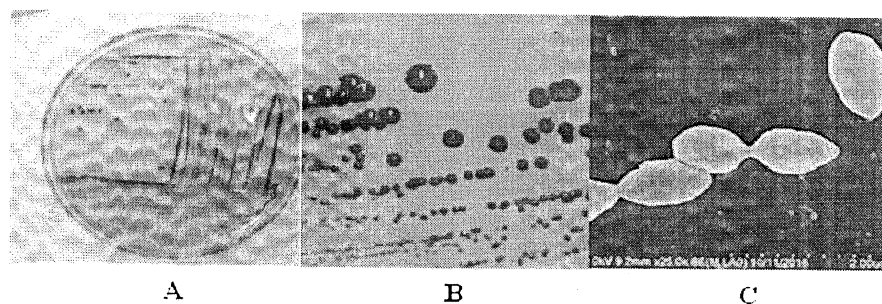
Cô quay chân không ở 70°C dịch lỏng chứa hỗn hợp các axit béo omega 6, 7, 9, thu được hỗn hợp PUFAs ở dạng rắn, kết tinh màu vàng sáng;

Hỗn hợp PUFAs thu được sau cô quay được tách ra bằng cách bổ sung nước nóng 60°C , khuấy từ gia nhiệt trên máy khuấy từ cho đến khi hỗn hợp tan hoàn toàn, thu lớp trên chứa PUFAs;

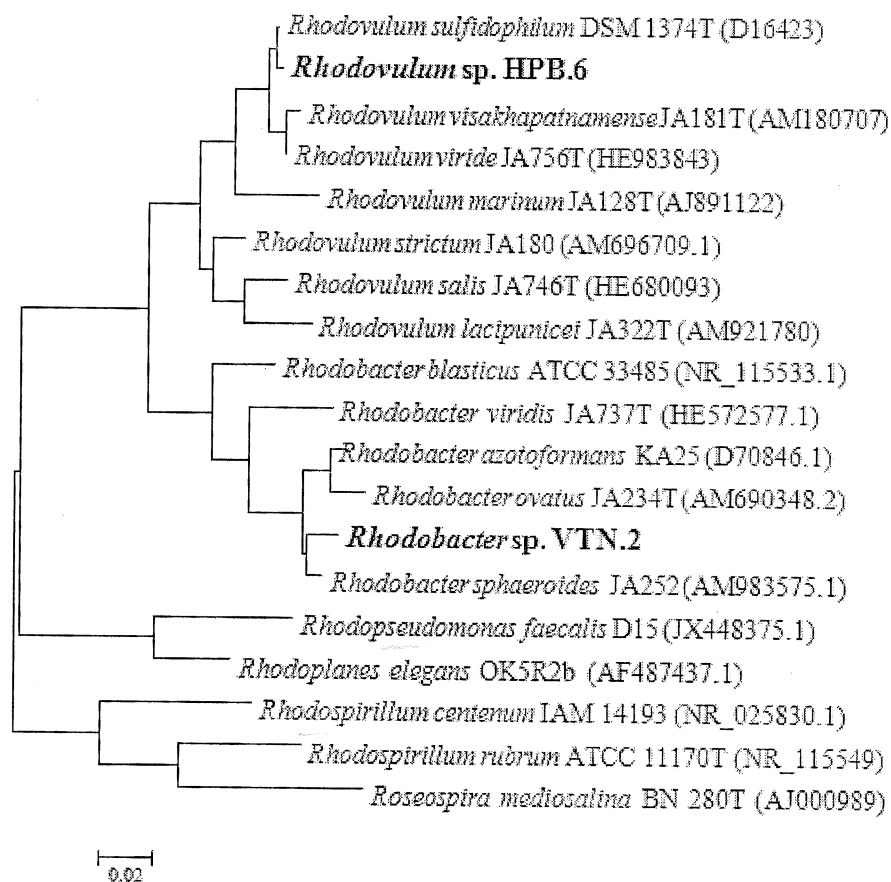
Bổ sung dung môi n-hexan vào lớp dưới, sau đó lọc qua phễu lọc có bổ sung muối Na_2SO_4 khan, và tiến hành cô quay chân không ở 70°C để loại bỏ dung môi và thu hỗn hợp TFA.



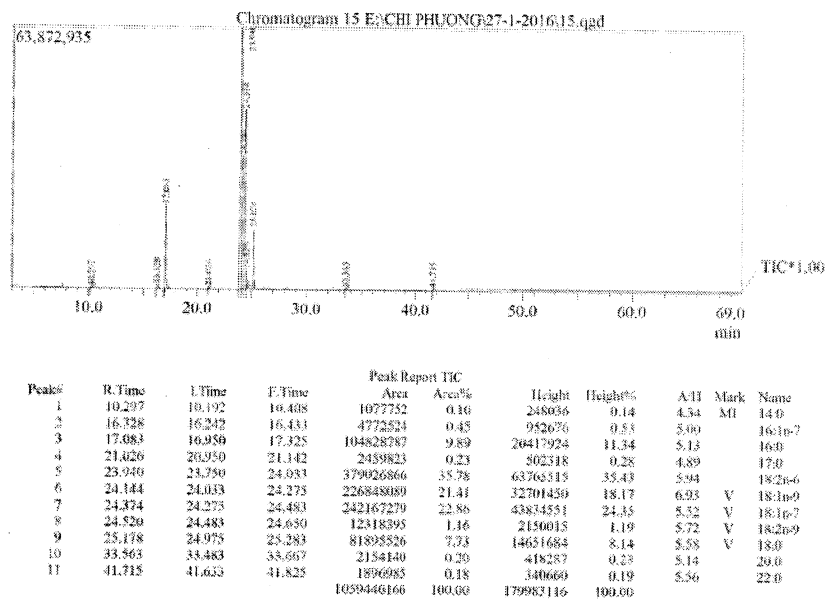
Hình 1



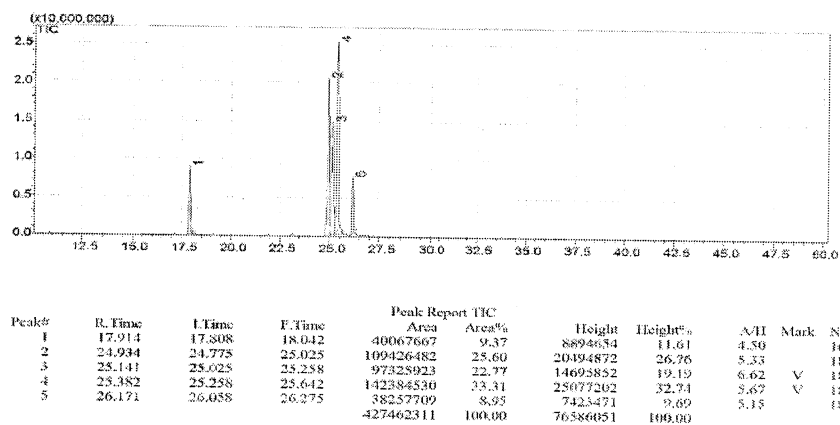
Hình 2



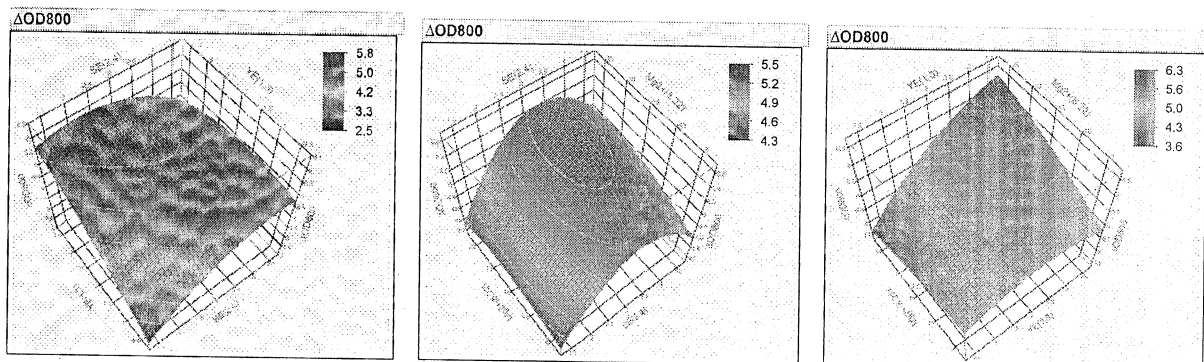
Hình 3



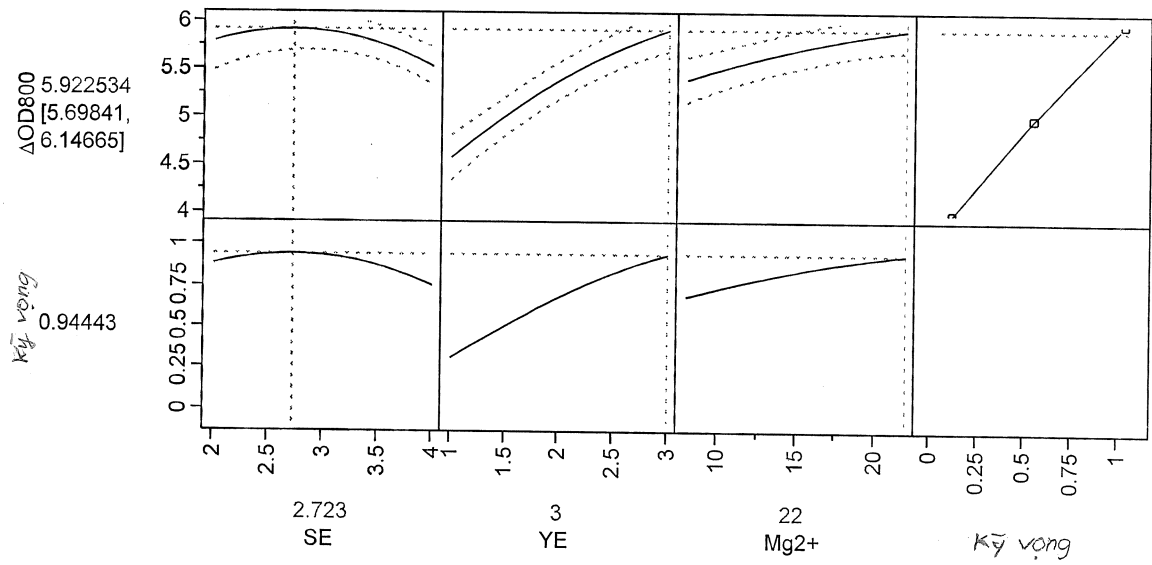
Hình 4



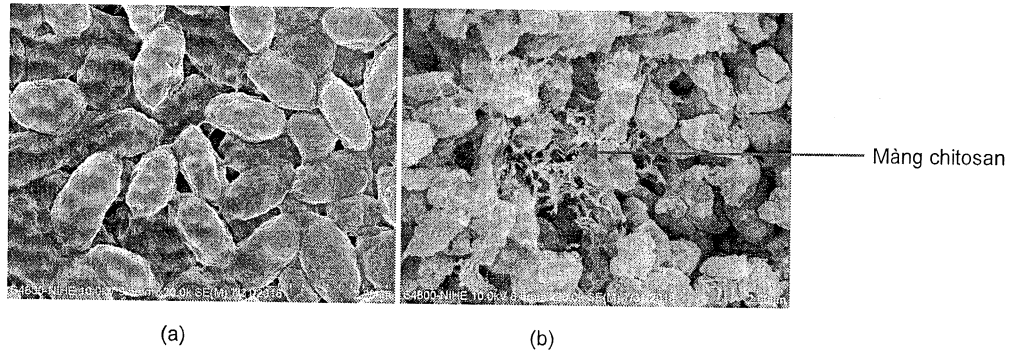
Hình 5



Hình 6



Hình 7



Hình 8

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> QUY TRÌNH SẢN XUẤT AXIT BÉO KHÔNG NO DẠNG OMEGA 6,7,9 TỪ VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP

<160> 2

<210> 1

<211> 1344

<212> 16S rARN

<213> *Rhodovulum sulfidophilum* HPB.6

<400> 1

TACACATGCA	AGTCGAGCGA	ACCCTTCGGG	GTTAGCGGCG	GACGGGTGAG	TAACGCGTGG	60
GAACGTGCCC	TTCTCTGCGG	AATAGGCTCG	GGAAACTGGG	TTTAATACCG	CATACGCCCT	120
TCGGGGGAAA	GATTTATCGG	AGAAGGATCG	GCCCGCGTTA	GATTAGGTAG	TTGGTGGGGT	180
AATGGCCTAC	CAAGCCTACG	ATCTATAGCT	GGTTTGAGAG	GATGATCAGC	CACACTGGGA	240
CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	CAGCAGTGAG	GAATCTTGGA	CAATGGGGGA	300
AACCCTGATC	CAGCCATGCC	GCGTGAGCGA	TGAAGGCCTT	AGGGTTGTAA	AGCTCTTTCA	360
GTCGTGAAGA	TAATGACGGT	AGCGACAGAA	GAAGCCCCGG	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	420
GCGGTAATAC	GGAGGGGGCT	AGCGTTGTTC	GGAATTACTG	GGCGTAAAGC	GCGCGTAGGC	480
GGACTATTAA	GTCAGGGGTG	AAATCCCGGG	GCTCAACCCC	GGAAGTGCCT	TTGATACTGG	540
TAGTCTAGAG	TTGAGAGAGG	GTGAGTGGAA	TTCCGAGTGT	AGAGGTGAAA	TTCGTAGATA	600
TTGCGAGGAA	CACCACTGGC	GAAGGCGGCT	CACTGGCTCG	ATACTGACGC	TGAGGTGCGA	660
AAGCGTGGGG	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCGTAAA	CGATGAATGC	720
CAGTCGTCGG	CAAGCATGCT	TGTCGGTGAC	ACACCTAACG	GATTAAGCAT	TCCGCCTGGG	780
GAGTACGGGG	GCAAGGTTAA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG	GGCCCCGACA	AGCGGTGGAG	840
CATGTGGTTT	AATTCGAAGC	AACGCGCAGA	ACCTTACCAA	CCCTTGACAT	CCTGATCGCG	900
GATTTTCTTA	GAGGAATTCC	TTCAATTCGG	CTGGATCAGT	GACAGGTGCT	GCATGGCTGT	960
CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTCCGTTA	AGTCCGGCAA	CGAGCGCAAC	CCACACTCTT	1020
AGTTGCCAGC	ATTGAGTTGG	GCACTCTAGG	AGAACTGCCG	ATGATAAGTC	GGAGGAAGGT	1080
GTGGATGACG	TCAAGTCTTC	ATGGCCCTTA	CGGGTTGGGC	TACACACGTG	CTACAAATGGC	1140
AGTGACAATG	GGTTAATCCC	TAAAAGCTGT	CTCAGTTCCG	ATTGTTCTCT	GCAACTCGAG	1200
AGCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	TAACAGCATG	ACGCCGTGAA	TACGTTCCCG	1260
GGCCTTGTAC	ACACCGCCCG	TCACACCATG	GGAGTTGGGT	TTACCCGAAG	ACGGTGCGCC	1320
AACCCTTACG	GGGGGCAGCN	NCCA				1344

<210> 2

<211> 1345

<212> 16S rARN

<213> *Rhodobacter sphaeroides* VTN.2

<400> 2

CNACCATGCA	AGTCGAGCGA	AGTCTTCGGA	CTTAGCGGCG	GACGGGTGAG	TAACGCGTGG	60
GAACGTGCCC	TTTGCTTCGG	AATAGCCCCG	GGAAACTGGG	AGTAATACCG	AATGTGCCCT	120
ACGGGGGAAA	GATTTATCGG	CAAAGGATCG	GCCCGCGTTG	GATTAGGTAG	TTGGTGGGGT	180
AATGGCCTAC	CAAGCCGACG	ATCCATAGCT	GGTTTGAGAG	GATGATCAGC	CACACTGGGA	240
CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	CAGCAGTGGG	GAATCTTAGA	CAATGGGCGC	300
AAGCCTGATC	TAGCCATGCC	GCGTGATCGA	TGAAGGCCTT	AGGGTTGTAA	AGATCTTTCA	360
GGTGGGAAGA	TAATGACGGT	ACCACCAGAA	GAAGCCCCGG	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	420
GCGGTAATAC	GGAGGGGGCT	AGCGTTATTC	GGAATTACTG	GGCGTAAAGC	GCACGTAGGC	480
GGATCGGAAA	GTCAGAGGTG	AAATCCCGAG	GCTCAACCCCT	GGAAGTGCCT	TTGAAACTCC	540
CGATCTTGAG	GTCGAGAGAG	GTGAGTGGAA	TTCCGAGTGT	AGAGGTGAAA	TTCGTAGATA	600
TTGCGGAGAA	CACCACTGGC	GAAGGCGGCT	CACTGGCTCG	ATACTGACGC	TGAGGTGCGA	660
AAGCGTGGGG	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCGTAAA	CGATGAATGC	720
CAGTCGTCGG	GCAGCATGCT	GTTCCGGTGAC	ACACCTAACG	GATTAAGCAT	TCCGCCTGGG	780

GAGTAÇGGCC	GCAAGGTAA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG	GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	840
CATGTGTTT	AATTCGAAGC	AACGCGCAGA	ACCTTACCAA	CCCTTGACAT	GGCGATCGCG	900
GTTCCAGAGA	TGGTTCCTTC	AGTTCGGCTG	GATCGCACAC	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	960
CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TCGGTTAAGT	CCGGCAACGA	GCGCAACCCA	CGTCCTTAGT	1020
TGCCAGCATT	CAGTTGGGCA	CTCTAGGGAA	ACTGCCGGTG	ATAAGCCGGA	AGAAGGTGTG	1080
GATGACGTCA	AGTCCTCATG	GCCCTTACGG	GTTGGGCTAC	ACACGTGCTA	CAATGGCAGT	1140
GACAATGGGT	TAATCCCAA	AAGCTGTCTC	NNTTCCGAAT	GGGGTCTGCA	ACTCGACCCC	1200
ATGAAGTCGG	AATCGCTAGT	AATCGCGTAA	CAGCATGACG	CGGTGAATAC	GTTCCCGGGC	1260
CTTGTAACA	CCGCCCCTCA	CACCATGGGA	ATTGGTTCTA	CCCGAAGGCG	GTGCGCCAAC	1320
CTCGCAAGAG	GAGGCAGCCG	ANCNC				1345