BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM HÀ NỘI
*****oOo*****

TRẦN HỮU PHONG

NGHIÊN CỨU LÊN MEN VÀ THU NHẬN POLYHYDROXYALKANOATES TỪ VI KHUẨN PHÂN LẬP Ở MỘT SỐ VÙNG ĐẤT CỦA VIỆT NAM

Chuyên ngành: Vi sinh vật học
Mã số: 62.42.01.07

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2017

Công trình được hoàn thành tại : Bộ môn Công nghệ Sinh học - Vi sinh, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Dương Văn Hợp

PGS.TS. Đoàn Văn Thược

Phản biện 1: PGS.TS. Lê Thanh Bình – Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 2: PGS.TS. Phạm Xuân Hội – Viện Di truyền Nông nghiệp

Phản biện 3: PGS.TS. Dương Minh Lam – Đại học Sư phạm Hà Nội

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường họp tại Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

vào hồi … giờ … ngày … tháng … năm 2017

Có thể tìm đọc luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc Gia (Hà Nội)
- Thư viện Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Cùng với sự phát triển của xã hội nhu cầu sử dụng các sản phẩm được làm từ nhựa trong cuộc sống hàng ngày cũng ngày càng tăng cao. Trong hơn 50 năm qua sản lượng nhựa trên thế giới đã tăng một cách nhanh chóng từ 1,5 triệu tấn vào năm 1950 lên 288 triệu tấn vào năm 2012 và trung bình mỗi năm tăng từ 3 % đến 5 % trong những năm gần đây. Tại Việt Nam, cùng với nhu cầu tiêu thụ ngày càng lớn của xã hội thì sản lượng nhựa sản xuất trong 10 năm qua đã tăng nhanh chóng. Theo thống kê từ năm 2000 cho đến 2010, sản lượng nhựa đã tăng gấp hơn 4 lần (từ 890 nghìn tấn lên tới hơn 3800 nghìn tấn) và còn có xu hướng tăng hơn nữa.

Nguồn nguyên liệu chủ yếu cho công nghiệp sản xuất nhựa hiện nay là dầu mỏ đang dần cạn kiệt. Mặt khác, phần lớn các sản phẩm nhựa truyền thống có nguồn gốc dầu mỏ hầu như không có khả năng phân hủy sinh học, do đó cần phải mất hàng trăm năm chúng mới bị phân hủy hết. Bên cạnh đó quá trình phân rã các sản phẩm này trong tự nhiên giải phóng ra nhiều hợp chất độc hại. Sự tích tụ các loại rác thải này đã và đang gây nên những vấn đề nghiêm trọng về mặt môi trường sinh thái trên toàn cầu, ảnh hưởng một cách trực tiếp và gián tiếp đến sự sống của nhiều loài sinh vật trong đó có con người.

Nhằm giải quyết những vấn đề môi trường do các sản phẩm nhựa hóa dầu gây ra, các loại nhựa sinh học đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu như là một giải pháp vật liệu thay thế. Trong số đó polyhydroxyalkanoates (PHA) nổi lên như là một trong những nhóm vật liệu tiềm năng bởi chúng mang các đặc điểm nổi trội như: (1) có các thuộc tính hóa-lý tương tự như nhựa hóa dầu, (2) có tính tương thích sinh học cao, (3) có khả năng bị phân hủy bởi các tác nhân sinh học (nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn) khi được thải ra ngoài môi trường. Bởi vậy PHA đã và đang được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống xã hội.

Với xu hướng phát triển của xã hội, thị trường nhựa Việt Nam cũng đã xuất hiện một số sản phẩm nhựa tự hủy. Phần lớn các sản phẩm nhựa tự hủy này có bản chất là polymer từ dầu mỏ và được bổ sung các thành phần phụ gia nhằm gây ra sự phân rã của sản phẩm nhựa vào một thời điểm nhất định dưới tác động của các yếu tố vật lý trong môi trường như ánh sáng hoặc oxi, do đó không xảy ra sự phân hủy sinh học tự nhiên. Bên cạnh đó, một số sản phẩm nhựa có khả năng phân hủy sinh học cũng đã được quan tâm, song chủ yếu tập trung vào các nguồn vật liệu từ thực vật như tinh bột, cellulose hoặc kết hợp các vật liệu này với một số loại polymer hóa

dầu khác. Trong khi đó các nghiên cứu về nhóm vật liệu PHA còn rất hạn chế và chưa được đầu tư bài bản.

Việt Nam nằm trong khu vực được đánh giá là có hệ sinh thái đa dạng với thành phần động vật, thực vật và vi sinh vật phong phú. Những khảo sát của chúng tôi về hệ vi khuẩn đất ở một số khu vực Miền Bắc, đặc biệt là hệ sinh thái đất rừng ngập mặn, đã cho thấy sự phong phú và tiềm năng to lớn từ các nhóm vi khuẩn phân lập được từ đây trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Theo Wu và Cs (2000) thì khoảng 30 % các vi khuẩn trong đất có khả năng sinh tổng hợp PHA. Trong khi đó hầu như chưa có công trình nào nghiên cứu một cách hoàn chỉnh về các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất ở Việt Nam.

Với những lý do trên, việc nghiên cứu về vi khuẩn có tiềm năng sản xuất PHA từ hệ sinh thái đất ở Việt Nam nhằm tạo cơ sở nền tảng cho các ứng dụng sản xuất nhựa phân hủy sinh học từ nguồn vật liệu này là một hướng mới, có nhiều ý nghĩa khoa học và thực tiễn, đồng thời cũng rất khả thi. Vì vậy chúng tôi lựa chọn nghiên cứu đề tài: **"*Nghiên cứu lên men và thu nhận polyhydroxyalkanoates từ vi khuẩn phân lập ở một số vùng đất của Việt Nam*"**

2. Mục tiêu của đề tài

Xác định được điều kiện tích lũy và thu nhận nguyên liệu PHA trong điều kiện phòng thí nghiệm từ các chủng vi khuẩn phân lập trong đất ở một số vùng sinh thái của Việt Nam.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất ở một số vùng sinh thái của Việt Nam (đất rừng ngập mặn Yên Hưng – Quảng Ninh, đất rừng ngập mặn Giao Thủy – Nam Định, đất bùn thải làng nghề làm bún Mạch Tràng – Đông Anh – Hà Nội).

- Phạm vi nghiên cứu: Phân lập, tuyển chọn, nghiên cứu các đặc điểm sinh lý – hóa sinh của các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp polyhydroxyalkanoates (PHA). Nghiên cứu đặc điểm lên men tích lũy, tách chiết – thu hồi, và khả năng phân hủy sinh học của sản phẩm PHA từ chủng vi khuẩn tuyển chọn nhằm định hướng sản xuất nguyên liệu nhựa sinh học.

4. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập, tuyển chọn và định loại các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp polyhydroxyalkanoate (PHA) từ đất ở các khu vực thu mẫu.

- Nghiên cứu các điều kiện lên men tích lũy PHA của chủng vi khuẩn tuyển chọn:

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng (cacbon, nitơ) đến sinh trưởng và hiệu quả sinh tổng hợp PHA.

+ Nghiên cứu các hình thức lên men sản xuất PHA trên thiết bị lên men.

- Nghiên cứu tách chiết – thu hồi sản phẩm PHA từ sinh khối sau lên men chủng vi khuẩn tuyển chọn (nồng độ tác nhân xử lý, nhiệt độ xử lý, thời gian xử lý, …), và các thuộc tính hóa – lý của sản phẩm PHA thu được.

- Thử nghiệm tạo nguyên liệu PHA từ chủng vi khuẩn tuyển chọn trong điều kiện phòng thí nghiệm và nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vật liệu này trong điều kiện chôn ủ.

5. Những đóng góp mới của luận án

- Là công trình đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu một cách có hệ thống về khả năng sinh tổng hợp PHA của một chủng vi khuẩn (*Yangia* sp. NĐ199) được phân lập từ hệ sinh thái đất.

- Kết quả nghiên cứu làm phong phú thêm các dữ liệu về vi khuẩn đất có khả năng sinh tổng hợp PHA ở Việt Nam và Thế giới. Đặc biệt các số liệu chi tiết về vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA thuộc chi *Yangia*.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan chung về nhựa

1.1.1. Nhựa tổng hợp

Tình hình sản xuất, mức độ tăng trưởng của thị trường nhựa và ảnh hưởng của rác thải từ chất nhựa đến môi trường sinh thái trên trái đất.

1.1.2. Nhựa sinh học

1.1.2.1. Nhựa sinh học và xu hướng phát triển

Tóm tắt về nhựa sinh học, tình hình sản xuất, tiềm năng phát triển của nhựa sinh học

1.1.2.2. Nhựa sinh học và vai trò bảo vệ môi trường

Tóm tắt vai trì của nhựa sinh học đối với môi trường

1.1.2.3. Nhựa phân hủy sinh học

Tóm tắt về nhựa phân hủy sinh học và vai trò của nó

1.2. Polyhydroxyalkanoate (PHA)

1.2.1. Cấu trúc hóa học và đặc điểm của hạt PHA

Những khái quát chung về cấu trúc hóa học, cấu trúc không gian và điều kiện tích lũy PHA ở vi khuẩn.

1.2.2. Các dạng PHA từ vi sinh vật

Phân loại các loại PHA theo quan điểm hiện nay

1.2.3. Thuộc tính vật lý của PHA

Mô tả các thuộc tính vật lý của PHA và so sánh với các loại polymer có nguồn gốc hóa dầu.

1.3. Vi khuẩn và các con đường sinh tổng hợp PHA

1.3.1. Vi khuẩn sinh tổng hợp PHA

1.3.1.1. Thành phần loài vi khuẩn sinh tổng hợp PHA

Khái quát sự đa dạng về thành phần vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA trong tự nhiên.

1.3.1.2. Cấu trúc hệ gen mã hóa sinh tổng hợp PHA ở vi khuẩn

Mô tả sự đa dạng về cấu trúc hệ gen mã hóa các enzyme chính tham gia trực tiếp vào quá trình sinh tổng hợp PHA ở vi khuẩn.

1.3.2. Nguồn cacbon và các con đường sinh tổng hợp PHA ở vi khuẩn

Khả năng sử dụng các nguồn cacbon có liên quan đến các con đường trao đổi chất nội bào và loại PHA được tạo ra.

1.4. Sản xuất PHA từ vi khuẩn

1.4.1. Lên men sản xuất PHA từ vi khuẩn

1.4.1.1. Sản xuất PHA theo phương pháp lên men mẻ

Lên men mẻ là phương pháp cổ điển đã và đang được sử dụng trong nghiên cứu sinh tổng hợp PHA hiện nay. Phương pháp lên men mẻ dễ tiến hành và phù hợp với các nghiên cứu về sinh trưởng và sàng lọc các vi sinh vật phù hợp cho tích lũy PHA.

1.4.1.2. Sản xuất PHA theo phương pháp lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng

Lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng là một hình thức thường được sử dụng trong quá trình nghiên cứu sản xuất PHA hiện nay. Tùy thuộc vào loại vi khuẩn mà chiến lược lên men có những thay đổi khác nhau.

1.4.1.3. Sản xuất PHA theo phương pháp lên men liên tục

Về mặt lý thuyết hình thức nuôi cấy liên tục không thích hợp đối với ứng dụng sản xuất PHA bởi sự đổi mới liên tục của môi trường lên men. Để có thể áp dụng hình thức nuôi cấy liên tục trong sản xuất PHA, một số cải tiến về mặt kỹ thuật đã được áp dụng nhằm nâng cao khả năng sản xuất của các vi sinh vật.

1.4.2. Tách chiết – thu hồi PHA

1.4.2.1. Sử dụng dung môi hữu cơ

Tóm tắt nguyên lý, ưu – nhược điểm của phương pháp dùng dung môi

1.4.2.2. Phương pháp thủy phân các thành phần không phải polymer

Tóm tắt nguyên lý, ưu – nhược điểm của phương pháp thủy phân các thành phần không phải polymer

1.5. Tình hình nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng PHA

1.5.1. Nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng PHA trên thế giới

Các thành tựu và hướng phát triển của PHA trên thế giới

1.5.2. Tình hình nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng PHA ở Việt Nam

Thực tiễn nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng PHA ở Việt Nam.

Chương 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu và Môi trường

2.1.1. Chủng vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn phân lập được từ đất thu thập tại các địa điểm sau: rừng ngập mặn Miền Bắc Việt Nam (Giao Thủy – Nam Định; Yên Hưng – Quảng Ninh), làng bún Mạch Tràng – Đông Anh – TP. Hà Nội.

2.1.2. Hóa chất và môi trường nuôi cấy

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu đều ở mức phân tích.

2.1.3. Thiết bị

Thiết bị được sử dụng đều là các thiết bị hiện đại thuộc các phòng thí nghiệm sau: PTN Công nghệ Sinh học & Vi sinh (Đại học Sư Phạm Hà Nội), PTN Viện Vi sinh vật & Công nghệ Sinh học (Đại học Quốc Gia Hà Nội), PTN Vật liệu Sinh học (Sains Universiti Malaysia).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp vi sinh vật học

2.2.1.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Các mẫu đất được pha loãng theo dãy thập phân và cấy trải trên môi trường dinh dưỡng. Sau 48 h tách thuần các khuẩn lạc riêng rẽ mọc tốt.

2.2.1.2. Phương pháp tách thuần và bảo quản giống nghiên cứu

Giống vi khuẩn nghiên cứu được lưu trữ theo phương pháp bảo quản trong glycerol và phương pháp đông khô

2.2.1.3. Phương pháp tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp PHA

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA theo phương pháp được mô tả bởi Spiekermann và Cs (1999)

2.2.1.4. Nghiên cứu các yếu tố dinh dưỡng đến sinh trưởng và tích lũy PHA

Chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường nghiên cứu lên men với thành phần thay đổi theo yêu cầu thí nghiệm (nguồn cacbon, tiền chất cacbon, ni tơ). Xác định các giá trị khối lượng tế bào khô (CDW), hàm lượng PHA tích lũy sau 48 h nuôi cấy.

2.2.1.5. Phương pháp nghiên cứu các đặc điểm sinh hóa

Để xác định khả năng sinh các loại enzyme ngoại bào, chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên các môi trường dinh dưỡng đặc hiệu. Sau 24 h tiến hành kiểm tra dựa trên phản ứng màu của các thuốc thử tương ứng.

Thử nghiệm khả năng sinh indol được tiến hành trên môi trường nước tryptone. Sau 48 h nuôi cấy ở 37 ^{o}C, bổ sung 1 ml ether vào dịch nuôi cấy để tách lớp indol, sau đó nhỏ thuốc thử, để tĩnh vài phút và ghi nhận kết quả.

Thử nghiệm methyl đỏ được tiến hành trên môi trường glucose-photphat. Sau 48 h nuôi cấy ở 37 ^{o}C, nhỏ vài giọt thuốc thử methyl đỏ vào dịch nuôi cấy và đọc kết quả.

Thử nghiệm Voges-Proskauer được tiến hành trên môi trường Clark-Lubs. Sau 48 h nuôi cấy ở 37 ^{o}C, bổ sung thuốc thử trực tiếp vào môi trường và đọc kết quả ngay.

Khả năng sử dụng các nguồn cacbon được tiến hành trên môi trường khoáng với các nguồn cacbon tương ứng. Sau 48 h, đánh giá khả năng sử dụng nguồn cacbon dựa trên mức độ sinh trưởng của vi khuẩn.

2.2.1.6. Phương pháp quan sát hình thái tế bào và phát hiện thể ẩn nhập

Phương pháp quan sát hình thái khuẩn lạc: Khuẩn lạc vi khuẩn mọc tốt sau 24 h nuôi cấy được tiến hành quan sát trên kính lúp soi nổi SZ61 (Olympus, Nhật) ở độ phóng đại 40x.

Phương pháp nhuộm Gram và quan sát trên kính hiển vi quang học: Tiến hành theo hướng dẫn của bộ Gram color kit (Sinh Việt, Việt Nam) và quan sát tiêu bản trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000x.

Phương pháp quan sát hình thái và xác định hạt PHA trên kính hiển vi điện tử: Mẫu vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường lên men tích lũy PHA. Sinh khối được xử lý và quan sát trên kính hiển vi điện tử quét (SEM) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) tại Viện Vệ sinh dịch tễ TW.

2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử

2.2.2.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số của vi khuẩn

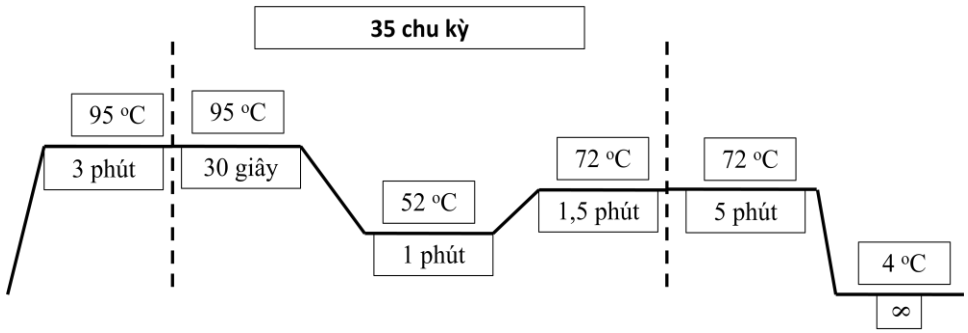
Quá trình tách chiết ADN tổng số được thực hiện theo các bước hướng dẫn sử dụng bộ kít K3032 AccuPrep® Genomic DNA Extraction (Bioneer, Hàn Quốc).

2.2.2.2. Phương pháp khuếch đại gen 16S rADN

Đoạn gen mã hóa cho ribosome 16S rADN được khuếch đại từ ADN tổng số bằng phương pháp PCR sử dụng hai cặp mồi phổ biến hiện nay với trình tự như sau:

314F (5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′)
907R (5′-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3′)
Và: 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)
1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)

Hỗn hợp phản ứng khuếch đại (PCR) được chuẩn bị theo hướng dẫn của bộ kít AccuPower® PCR Premix (Bioneer, Hàn Quốc). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được thực hiện như sau:



2.2.2.3. Xác định trình tự 16S rADN và xây dựng mối quan hệ di truyền

Mẫu 16S rADN được tinh sạch và giải trình tự tại công ty Bioneer (Hàn Quốc). Dựa vào cơ sở dữ liệu của Genbank và cơ sở dữ liệu của RDP (Ribosomal Database Project) để xác định mức độ gần gũi của các trình tự 16S rADN thu được so với các dữ liệu sẵn có. Mối quan hệ phát sinh loài được phân tích dựa trên phần mềm Mega 5 (Tamura và Cs, 2011) sử dụng phương pháp kết nối họ hàng (Saitou và Cs, 1987).

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu lên men trên thiết bị lên men 10L

2.2.3.1. Nghiên cứu lên men mẻ sản xuất PHA

Quá trình lên men mẻ được tiến hành trên thiết bị MDL1000 với thể tích 3L với lượng giống 10% ở nhiệt độ 32 ^{o}C, pH = 7,0 được điều chỉnh tự động. Nồng độ fructose ban đầu ở mức 25 g/L. Mẫu được kiểm tra sau mỗi 3 h nuôi cấy.

2.2.3.2. Nghiên cứu lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA.

Các thông số nuôi cấy ban đầu được cài đặt tương tự như lên men mẻ. Dinh dưỡng giàu ni tơ được bổ sung trong giai đoạn đầu cho đến 18 h nuôi cấy. Dinh dưỡng không chứa ni tơ được bổ sung từ 18 h đến 33 h nuôi cấy. Nồng độ cacbon được duy trì bằng cách kiểm tra và bổ sung gián đoạn sau mỗi 1,5 h tùy theo chiến lược lên men.

2.2.3.3. Nghiên cứu lên men hai pha bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA

Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trong hai pha độc lập. Pha 1, vi khuẩn được nuôi trong điều kiện môi trường giàu dinh dưỡng cho đến 24 h. Pha 2, toàn bộ sinh khối tế bào được rửa sạch và chuyển qua môi trường lên men dư thừa cacbon nhưng không chứa ni tơ.

2.2.4. Phương pháp tách chiết và thu hồi PHA

2.2.4.1. Tách chiết và thu hồi PHA nhờ dung môi chloroform

Tách chiết – thu hồi PHA được tiến hành theo phương pháp trình bày trong công bố của Lau và Cs (2010) và Wong và Cs (2012).

2.2.4.2. Tách chiết và thu hồi PHA nhờ NaOH

Dịch huyền phù tế bào và dung dịch NaOH được trộn với nhau theo tỉ lệ 1:1 (v/v) để đạt được nồng độ tế bào và nồng độ hóa chất cần thiết. Hỗn dịch được ủ trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau với các khoảng

thời gian khác nhau. Mẫu được li tâm và sấy khô nhằm xác định độ sạch, hiệu suất thu hồi của sản phẩm.

2.2.5. Các phương pháp phân tích

2.2.5.1. Phương pháp xác định hàm lượng cacbon trong dịch lên men

Hàm lượng cacbon trong dịch lên men được xác định dựa theo phương pháp định lượng đường khử nhờ sử dụng axit dinitrosalysilic (DNS) của Miller và Cs (1959).

2.2.5.2. Phương pháp xác định sinh khối khô (CDW)

CDW được xác định theo phương pháp được trình bày bởi Quillaguamán và Cs (2008).

2.2.5.3. Phương pháp định lượng PHA có trong sinh khối tế bào.

Mẫu phân tích được chuẩn bị theo phương pháp thủy phân nhờ methanol của Braunegg và Cs (1978). Hàm lượng PHA trong mẫu được xác định bằng phương pháp sắc kí khí theo Silva và Cs (2000) trên hệ thống HP-7890A (Agilent Technologies, Mỹ) sử dụng cột mao dẫn HP-5 với P(3HB-co-12 mol%3HV) được sử dụng làm chất chuẩn.

2.2.5.4. Phương pháp phân tích cộng hưởng từ xác định cấu trúc PHA

Mẫu PHA được hòa trong dung môi $CDCl_3$ trước khi được tiến hành phân tích phổ công hưởng từ hạt nhân proton (^{1}H-NMR) ở tần số 500 MHz trên thiết bị Brucker ARX500 Spectrometer (Brucker, Sikertrifen, Đức) ở điều kiện nhiệt độ phòng. Cấu trúc PHA được xác định thông qua phổ thu được nhờ phần mềm Brucker UXNMR.

2.2.5.5. Các phương pháp xác định thuộc tính lý hóa của vật liệu PHA

Thuộc tính cơ học của vật liệu PHA được tiến hành trên máy phân tích lực Shimadzu EZTest (Nhật).

Thuộc tính nhiệt của vật liệu PHA được xác định trên máy quét nhiệt vi sai DSC 60A (Shimadzu, Nhật)

Các giá trị M_w, M_n, DPI của vật liệu PHA được xác định trên hệ thống sắc kí 120 GPC (Agilent, Mỹ) theo phương pháp trình bày trong công bố của Bhubalan và Cs (2008).

2.2.6. Nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA

2.2.6.1. Phương pháp tạo vật liệu màng PHA

Mẫu màng PHA thí nghiệm được chuẩn bị theo phương pháp của Sriwedi và Cs (2006).

2.2.6.2. Thí nghiệm nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA

Mẫu màng PHA được thử nghiệm khả năng phân hủy sinh học trong điều kiện chôn ủ và trên bề mặt đất. Các chỉ số về độ giảm khối lượng, màu sắc, hình thái màng được xác định sau 4 tuần thí nghiệm.

2.2.7. Phương pháp toán học

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp PHA

3.1.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn sơ bộ vi khuẩn sinh tổng hợp PHA

Từ các mẫu đất thu thập được, chúng tôi đã phân lập được 869 chủng vi khuẩn thuần. Trong số này chúng tôi đã xác định được 50 chủng vi khuẩn (6 % tổng số vi khuẩn phân lập được) có biểu hiện tích lũy PHA khi nuôi cấy trên môi trường chọn lọc. Trong đó 17 chủng có nguồn từ đất RNM Yên Hưng – Quảng Ninh (chiếm 5,67 % tổng số chủng phân lập được tại khu vực) (được kí hiệu: QN71, QN83, QN84, QN102, QN124, QN126, QN131, QN142, QN187, QN194, QN225, QN227, QN232, QN262, QN265, QN271, QN281), 13 chủng có nguồn từ đất RNM Giao Thủy – Nam Định (chiếm 3 % tổng số chủng phân lập được tại khu vực) (được kí hiệu: NĐ97, NĐ145, NĐ153, NĐ156, NĐ199, NĐ201, NĐ203, NĐ210, NĐ218, NĐ240, NĐ325, NĐ389, NĐ355), và 20 chủng có nguồn từ Mạch Tràng – Đông Anh – Hà Nội (chiếm 13,9 % tổng số chủng phân lập tại khu vực) (được kí hiệu: MT15, MT21, MT29, MT33, MT56, MT65, MT70, MT71, MT72, MT84, MT85, MT88, MT90, MT97, MT112, MT123, MT129, MT132, MT133, MT144).

3.1.2. Khả năng sinh tổng hợp PHA của các vi khuẩn tuyển chọn

Chúng tôi đã lựa chọn được 10 chủng vi khuẩn trong số 50 chủng dương tính ở trên dựa vào phân tích định lượng khả năng sinh tổng hợp PHA. Các chủng vi khuẩn đều thể hiện khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA tốt trên nguồn cacbon là glucose. Trong đó 6 chủng được xác định tích lũy P(3HB), và 4 chủng tích lũy copolymer P(3HB-co-3HV) dựa trên phân tích sắc kí khí và cộng hưởng từ hạt nhân proton ^{1}H NMR.

Bảng 3.1. Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Kí hiệu chủng	CDW (g/L)	Hàm lượng PHA (%wt)	Thành phần PHA (mol%)	
			3HB	*3HV*
NĐ97	3,1	48	100	0
NĐ153	3,1	65	100	0
QN194	2,2	26	100	0
NĐ199	2,6	34	98	2
NĐ218	2,3	24	97	3
QN271	5,1	48	100	0
QN187	3,8	44	100	0
NĐ240	3,2	28	100	0
MT15	3,1	53	98	2
MT33	4,2	51	97	3

3.1.3. Đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Hầu hết các chủng vi khuẩn thu được đều có dạng hình que ngắn, với kích thước khác nhau và có khả năng di động. Màu sắc khuẩn lạc thường có màu trắng ngà hoặc vàng sẫm. Phân tích nhuộm Gram cho thấy 5 chủng vi khuẩn kí hiệu NĐ97, QN194, NĐ153, MT15 và MT33 thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương có khả năng sinh nội bào tử. Trong khi các chủng vi khuẩn còn lại (kí hiệu NĐ199, NĐ218, QN187, QN271, NĐ240) thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm không sinh nội bào tử.

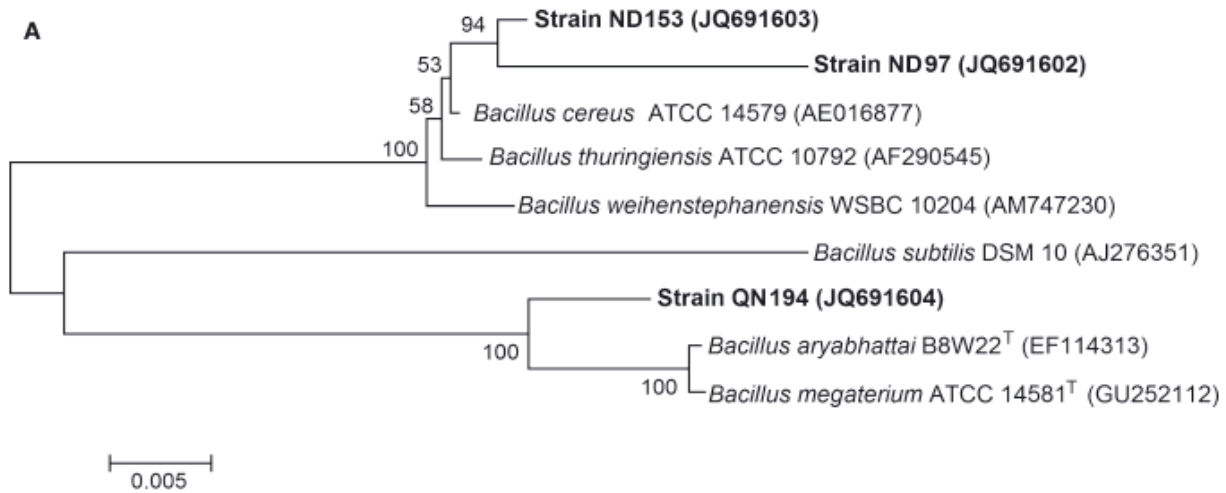
Chúng tôi đã lựa chọn 8 chủng vi khuẩn phân lập từ đất rừng ngập mặn để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn.

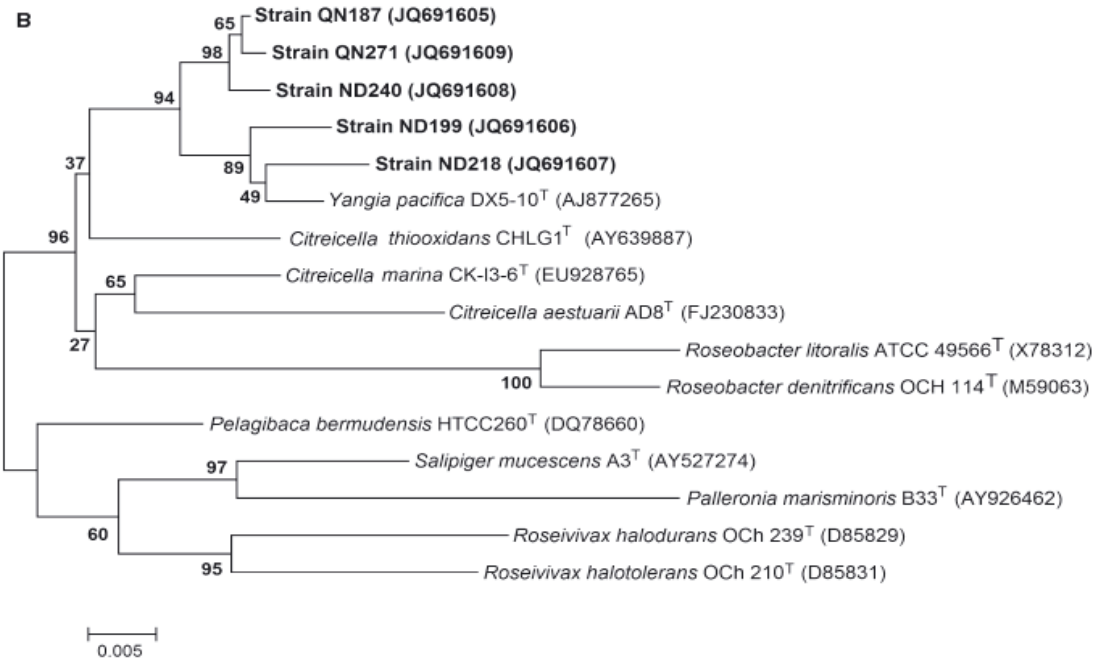
3.1.4. Đặc điểm sinh lý-hóa sinh của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Cả 8 chủng vi khuẩn tuyển chọn phân lập được từ đất rừng ngập mặn đều có khả năng sinh catalase và oxidase, không tạo indol. Điều đó chứng tỏ rằng đây là các vi khuẩn hiếu khí bắt buộc. Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng của các chủng vi khuẩn này nằm trong khoảng 30 ^{o}C đến 40 ^{o}C cho thấy đây là các vi khuẩn ưa ấm. pH tối thích cho sinh trưởng của các chủng này là trung tính. Trong số đó 3 chủng vi khuẩn Gram dương (NĐ97, NĐ153, QN194) thuộc các vi khuẩn chịu mặn và có các đặc điểm hóa sinh khá tương đồng với chủng vi khuẩn *Bacillus cereus*, 5 chủng vi khuẩn Gram âm (NĐ199, NĐ218, QN271, NĐ240) là các vi khuẩn ưa mặn và có các đặc điểm khá tương đồng với chủng vi khuẩn *Yangia pacifica* DX5-10T.

3.1.5. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn

Dựa trên các kết quả so sánh về hình thái, sinh lý-hóa sinh, kết hợp với phân tích so sánh trình tự 16S rADN các vi khuẩn phân lập từ RNM được xếp vào hai chi *Bacillus* và *Yangia*. Trong đó đây là lần đầu tiên vi khuẩn thuộc chi *Yangia* được công bố về khả năng sinh tổng hợp co polymer P(3HB-co-3HV).





Hình 3.1.Mối quan hệ phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất Rừng ngập mặn

3.2. Nghiên cứu lên men tích lũy PHA bởi chủng *Yangia* sp. NĐ199

3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sinh trưởng và tích lũy PHA

3.2.1.1. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon

Chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA tốt trên tất cả các nguồn C thử nghiệm. Trong đó, fructose thể hiện như là nguồn cacbon phù hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Bên cạnh đó, rỉ đường cũng có thể là nguồn C tiềm năng cho sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn này.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Nguồn cacbon	**CDW (g/L)**	**PHA (%wt)**	**RCM (g/L)**	**Thành phần PHA (mol%)**	
				3HB	**3HV**
Rỉ đường	3,85±0,13	35,0±1,32	2,50±0,21	96,8	3,2
Glucose	3,78±0,1	47,5±3,2	1,98±0,07	96,9	3,1
Glycerol	3,61±0,53	40,1±1,8	2,16±0,11	93,9	6,1
Fructose	4,87 ±0,48	66,9±2,1	1,61±0,17	> 99	vết
Saccharose	3,43±0,06	18,2±0,43	2,81±0,02	83,8	16,2
maltose	2,68±0,06	13,6±1,52	2,32±0,05	79,5	20,5
Xiro ngô	4,24±0,27	58,3±0,77	1,77±0,23	98,4	1,6
Xiro ngô không thanh trùng	4,13±0,17	54,6±1,36	1,88±0,08	98,6	1,4

3.2.1.2. Ảnh hưởng của một số tiền chất đến khả năng tích lũy và thành phần PHA

Sản phẩm P(3HB) thu được khi nuôi cấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên môi trường có bổ sung 1,5-pentanediol, 1,6-hexanediol, natri hexanoate, và natri octanoate. Trong khi P(3HB-co-3HV) thu được khi môi trường nuôi cấy được bổ sung natri valerate và natri heptanoate. Sản phẩm PHA chứa phân đoạn 4HB được tạo ra khi các tiền chất 1,4-butanediol, γ-butyrolactone, và natri 4-hydroxybutyrate được sử dụng.

Ảnh hưởng của nồng độ các tiền chất đối với sinh trưởng, sinh tổng hợp và thành phần PHA của chủng *Yangia* sp. NĐ199 cũng đã được xác định. Hàm lượng phân đoạn 3HV có xu hướng tăng lên trong khi mức độ tích lũy PHA hầu như không có sự sai khác khi nồng độ heptanoate tăng. Đối với các tiền chất 1,4-butanediol và natri 4-hydroxybutyrate thì ít gây ra sự thay đổi hàm lượng 4HB cũng như mức độ tích lũy PHA, trong khi cả hai giá trị này đều có xu hướng giảm khi tiền chất là γ-butyrolactone. Hầu hết việc tăng nồng độ các tiền chất đều gây ra sự ức chế sinh trưởng của tế bào vi khuẩn.

3.2.1.3. Một số thuộc tính lý học của PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Sản phẩm PHA thu được từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khi nuôi cấy trên nguồn fructose mang những thuộc tính vật lý tương tự như sản phẩm P(3HB) do Doi và Cs (1995) công bố.

Thuộc tính hóa-lý của một số sản phẩm PHA thu được trên các nguồn tiền chất C khác nhau cũng đã được xác định và được trình bày ở bảng 3.3.

Bảng 3.3. Thuộc tính hóa-lý của các PHA thu được từ chủng Yangia sp. NĐ199 *khi nuôi cấy trên các nguồn cơ chất khác nhau*

Nguồn cacbon		**PHA**	M_w (x10^6 Da)	M_n (x10^5 Da)	**DPI** (M_w/M)	T_m (^oC)	T_g (^oC)
Fructose		P(3HB)	2,2	6,4	3,4	175	4
Fructose	γ-butyrolactone	P(3HB-*co*-5,2%4HB)	1,7	5,4	3,2	163	-20
	1,4-butanediol	P(3HB-*co*-4,3%4HB)	1,3	4,2	3,1	157	-0
	Na 4-hydroxybutyrate	P(3HB-*co*-5,8%4HB)	1,8	5,5	3,2	155	-18
	Na hydroxyheptanoate	P(3HB-*co*-13%3HV)	1,8	6,9	2,6	173	-11

3.2.1.4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ (N)

Nguồn cao nấm men thể hiện như là nguồn N thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA từ chủng *Yangia* sp. NĐ199. Bên cạnh đó nguồn KNO_3 cũng cho kết quả ảnh hưởng tốt và có thể trở thành nguồn N thay thế tiềm năng khi sản xuất ở quy mô lớn. Mặc dù mức độ tích lũy PHA nội bào khá cao (>40 %wt), tuy nhiên chủng vi khuẩn này sinh trưởng kém khi được nuôi cấy trên các nguồn N là amoni.

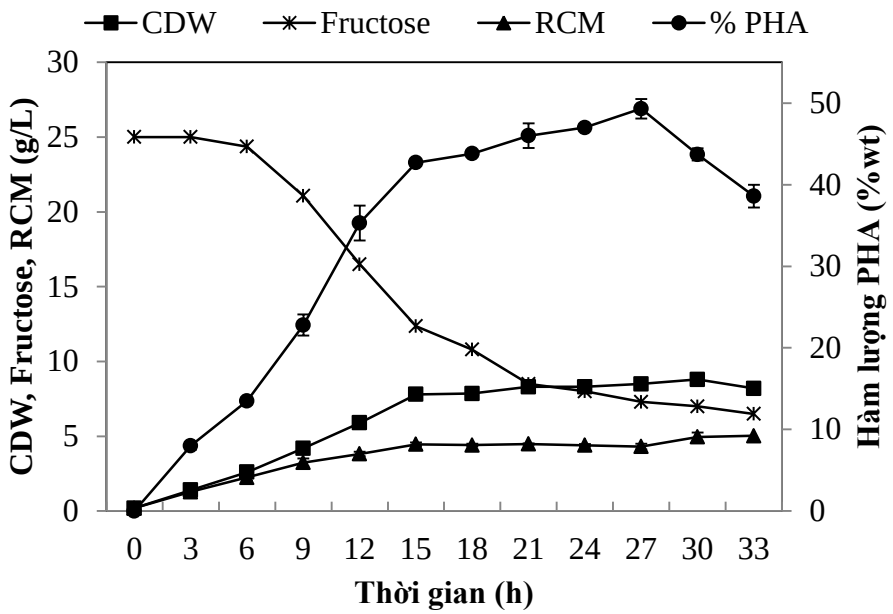
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của các nguồn ni tơ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA

Nguồn nitơ	**CDW (g/L)**	**Hàm lượng PHA (%)**	**Nồng độ PHA (g/L)**	**RCM (g/L)**
Cao nấm men	4,95±0,16	67,7±2,1	3,4	1,55
Natri glutamate (MSG)	3,85±0,22	47,8±0,6	1,8	2,01
KNO_3	4,23±0,06	57,7±1,3	2,4	1,83
$NaNO_3$	3,16±0,22	44,8±2,7	1,4	1,74
$(NH4)_2SO_4$	0,64±0,11	43,3±0,2	0,3	0,36
NH_4HCO_3	1,48±0,07	58,4±2,3	0,9	0,62
NH_4Cl	0,67±0,05	45,7±0,8	0,3	0,36

3.2.2. Kết quả nghiên cứu lên men tích lũy PHA trên nồi lên men 10L

3.2.2.1. Động thái quá trình lên men mẻ sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

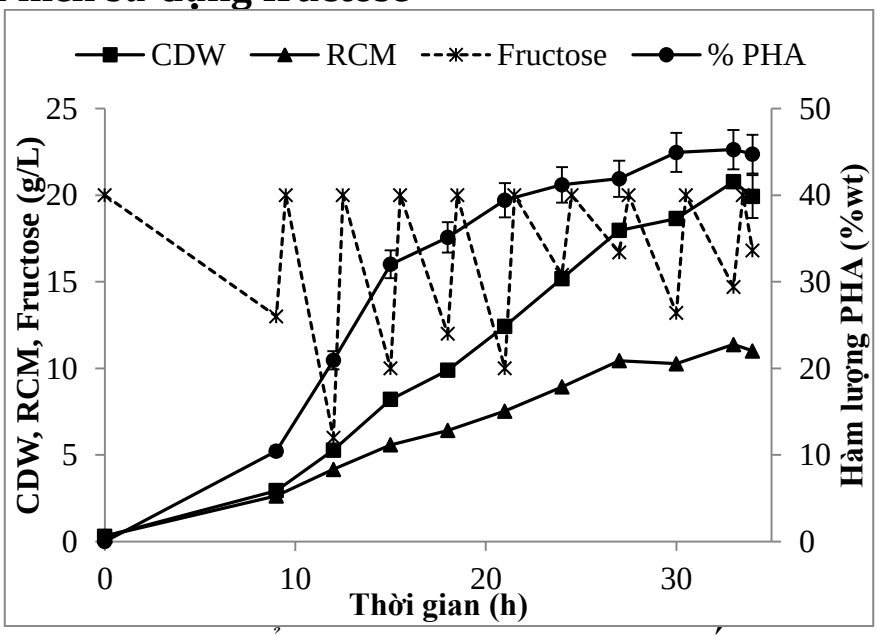
Quá trình lên men diễn ra theo các pha sinh trưởng của vi khuẩn (hình 3.2). Quá trình tích lũy PHA của tế bào diễn ra sớm ngay cả khi chưa có sự mất cân bằng dinh dưỡng. Nồng độ fructose cao trong môi trường có thể đã kích thích hoạt động sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn này kể cả khi không có sự hạn chế dinh dưỡng. Dữ liệu thu được cho phép giả thiết chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có thể thuộc nhóm vi khuẩn sinh tổng hợp PHA không yêu cầu giới hạn dinh dưỡng (nhóm 2). Chính vì thế hiệu quả thu được khi tiến hành lên men mẻ là không cao với CDW chỉ đạt 8,2 g/L và hiệu quả chuyển hóa cơ chất là 0,22 g/g.



Hình 3.1. Động thái lên men mẻ sản xuất PHA trên nguồn fructose của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

3.2.2.2. Nghiên cứu sản xuất PHA sử dụng kỹ thuật lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng

a/ Lên men sử dụng fructose

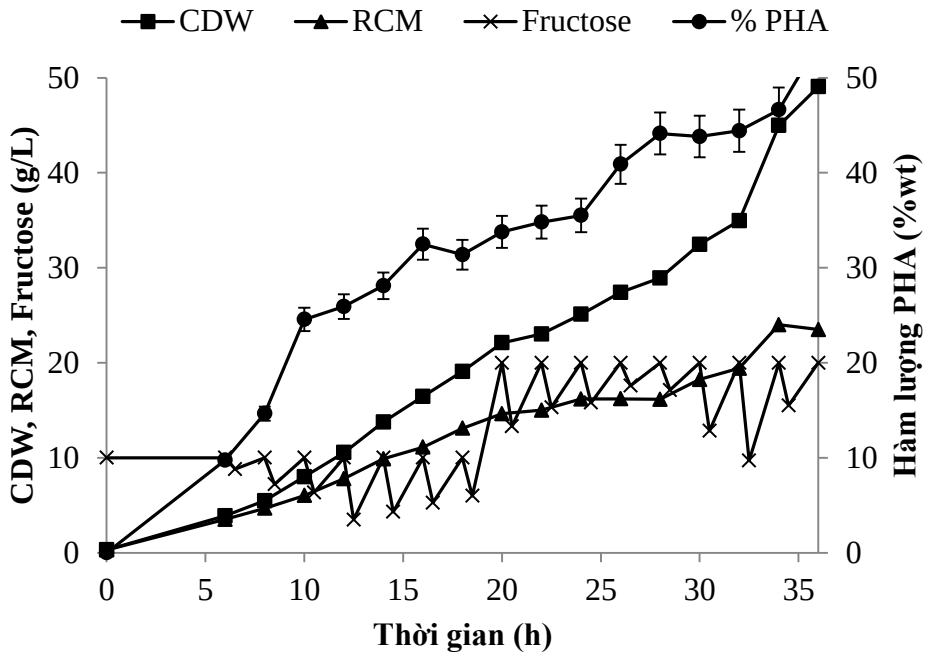


Hình 3.2. Lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *với nồng độ 20 g/L fructose*

Trong chiến lược lên men thứ nhất, kết quả lên men được thể hiện trong hình 3.3. Việc bổ sung dinh dưỡng trong quá trình lên men giúp cải thiện khả năng sinh trưởng của tế bào với giá trị CDW thu được gấp 2,3 lần so với lên men mẻ. Tuy nhiên quá trình tích lũy PHA vẫn xảy ra ngay giai đoạn sớm của quá trình lên men dẫn đến hàm lượng PHA tích lũy chỉ

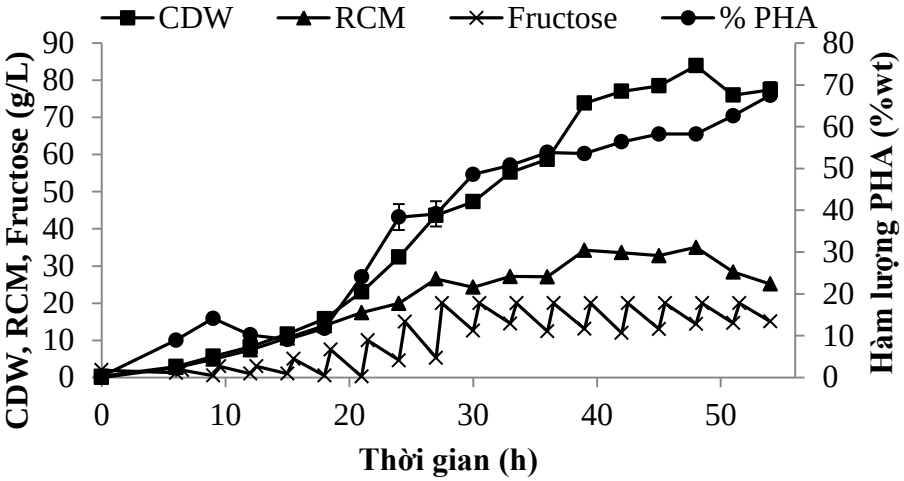
đạt 45 %wt. Do đó, việc điều chỉnh nồng độ fructose duy trì trong quá trình lên men có thể là giải pháp nhằm cải thiện khả năng sản xuất của chủng vi khuẩn này.

Chiến lược lên menthứ hai, giá trị CDW được tăng lên và đạt cao nhất (49 g/L) khi kết thúc quá trình lên men. Tuy nhiên quá trình sinh tổng hợp PHA vẫn xảy ra ngay thời điểm đầu đã dẫn đến hàm lượng PHA nội bào tích lũy chưa được cao (54 %wt) khi kết thúc quá trình lên men. Hiệu quả chuyển hóa cơ chất đạt 0,33 g/g fructose, trong khi năng suất sản xuất đạt 0,73 g/L/h.



Hình 3.3. Lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *với sự thay đổi nồng độ fructose hai giai đoạn*

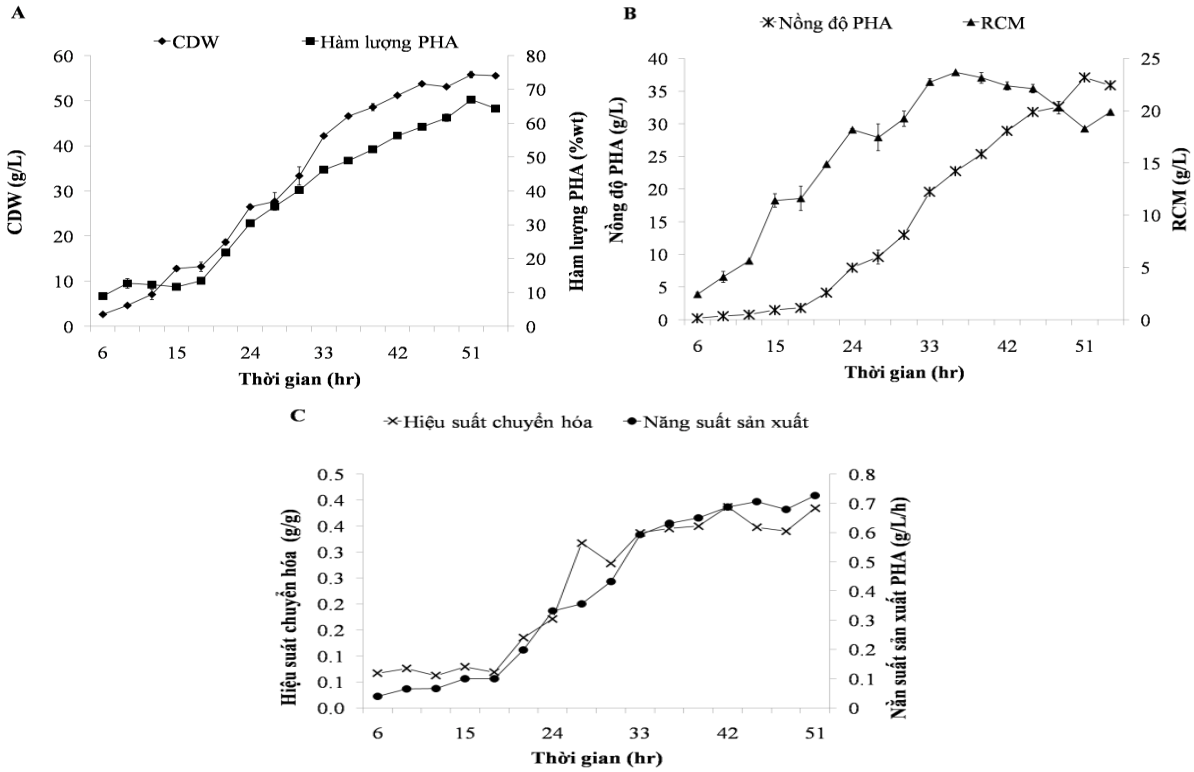
Chiến lược lên men thứ ba, quá trình sinh tổng hợp PHA của tế bào bị ức chế trong suốt giai đoạn đầu của quá trình lên menkhi nồng độ fructose được duy trì ở mức 2-3 g/L. Trong khi đó việc bổ sung dinh dưỡng một cách liên tục đã giúp sinh khối tế bào tăng nhanh và đạt giá trị 83,9 g/L ở thời điểm 48 h nuôi cấy. Ngoài ra, hàm lượng PHA nội bào tích lũy được đạt cao nhất (67,5 %wt) với năng suất đạt 1 g/L/h cuối quá trình lên men. Kết quả thu được là khá cao khi so sánh với một số chủng vi khuẩn ưa mặn trên thế giới đã được công bố.



Hình 3.4. Lên men bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *với nồng độ fructose tăng dần*

b/ Lên men sử dụng xiro ngô

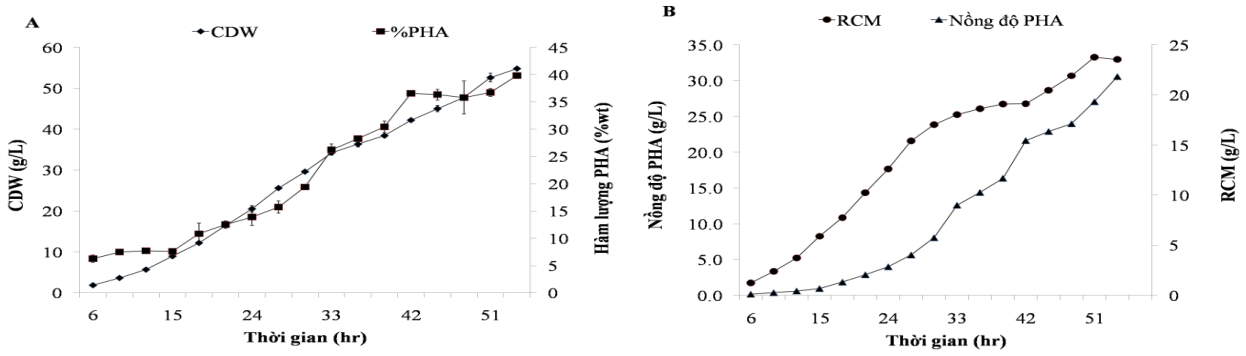
Động thái sinh trưởng và tích lũy PHA trong các giai đoạn sau của quá trình lên men về cơ bản diễn ra tương tự như ở thí nghiệm sử dụng fructose tinh khiết. Hàm lượng PHA thu được cuối quá trình lên men đạt 67 %wt (hình 3.6-A). Mặc dù hiệu suất chuyển hóa cao hơn (đạt 0,38 g/g) cùng với mức độ tích lũy PHA đạt được là tương đương, tuy nhiên năng suất sản xuất (0,73 g/L/h) và CDW (55,8 g/L) thu được là thấp hơn nhiều khi so sánh với thí nghiệm trên nguồn cacbon tinh khiết.



Hình 3.5. Lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *sử dụng nguồn xiro ngô không thanh trùng*

c/ Lên men sử dụng rỉ đường

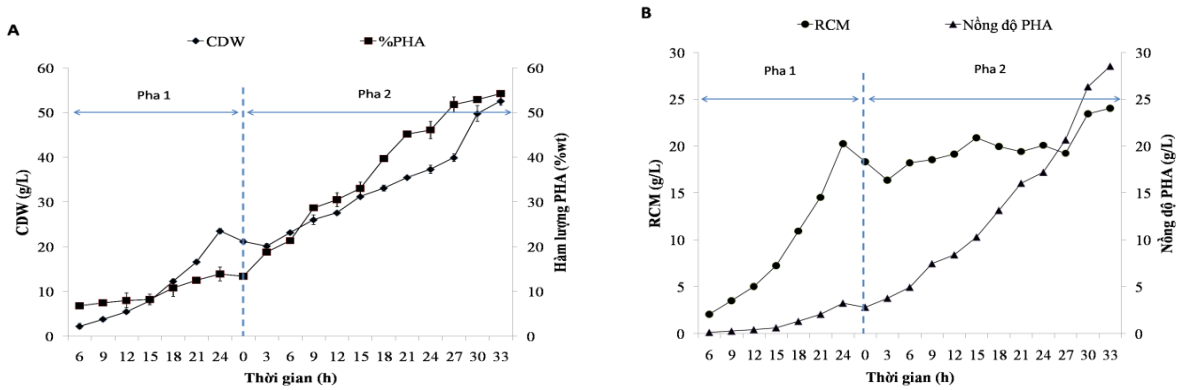
Sử dụng chiến lược lên men bán liên tục tương tự như trên chúng tôi thu được kết quả như sau:



Hình 3.6. Lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *sử dụng nguồn rỉ đường*

Như thể hiện ở hình 3.7, động thái lên men của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khi sử dụng rỉ đường làm nguồn cơ chất khá tương đồng so với các nguồn cacbon đã sử dụng ở trên. CDW và hàm lượng PHA nội bào thu được cao nhất sau 54 giờ nuôi cấy đạt 54,8 g/L và 39,8 %wt, theo thứ tự (hình 3.7-A).

Tiến hành lên men bán liên tục hai pha với nguồn cơ chất rỉ đường ở pha 1 và nguồn glucose ở pha 2. Kết quả được thể hiện trong hình 3.8 cho thấy sau 54 giờ lên men (thời điểm 30 giờ ở pha 2), CDW đạt 50 g/L thấp hơn so với kết quả lên men bán liên tục (54,8 g/L). Tuy nhiên, mức độ tích lũy PHA đã được cải thiện tăng đáng kể nhờ pha nuôi cấy thứ hai với hàm lượng polymer đạt 52,9 %wt và năng suất sản xuất đạt 0,48 g/L/h (hình 3.8-A). Hàm lượng PHA vẫn có xu hướng tăng và đạt giá trị 54,3 %wt sau 57 giờ nuôi cấy (thời điểm 33 giờ ở pha 2), ngược lại giá trị RCM được duy trì ở mức ổn định (khoảng 20 đến 22 g/L) trong suốt thời gian tiến hành pha 2 (hình 3.8-B).



Hình 3.7. Lên men hai pha bổ sung dinh dưỡng sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *trên nguồn rỉ đường và glucose*

3.3. Tách chiết và thu hồi PHA từ sinh khối lên men chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và nồng độ NaOH đến hiệu quả tinh sạch

Kết quả ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý được trình bày trong bảng 3.5. Độ sạch của các mẫu PHA tăng khi nhiệt độ xử lý và nồng độ NaOH tăng. Tuy nhiên hiệu suất thu hồi lại có xu hướng giảm mạnh khi xử lý ở nồng độ 0,15 M NaOH ở nhiệt độ 50 ^oC.

Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến chất lượng sản phẩm PHA cũng đã được kiểm tra. Kết quả cho thấy có sự giảm nhẹ các giá trị M_w và M_n, song hầu như không có sự sai khác về thuộc tính nhiệt của các sản phẩm PHA sau xử lý so với trước xử lý.

Điều kiện xử lý sinh khối với 0,125 M NaOH ở 50 ^oC được chúng tôi lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý và nồng độ NaOH đến hiệu quả tinh sạch

[NaOH] (M)	**30 ^oC**		**40 ^oC**		**50 ^oC**	
	Độ sạch (%wt)	**Hiệu suất** (%)	**Độ sạch** (%wt)	**Hiệu suất** (%)	**Độ sạch** (%wt)	**Hiệu suất** (%)
ĐC	70 ± 2,3	100	70 ± 2,3	100	70 ± 2,3	100
0,05	69 ± 0,73	96,6 ± 0,9	69± 0,52	95,7 ± 0,9	70 ± 3,9	97,3 ± 1,2
0,075	74 ± 1,5	96,2 ± 3,5	78 ± 0,45	100 ± 0,55	75 ± 1,87	96,7 ± 2,7
0,1	76 ± 0,72	98,1 ± 1,2	79 ± 1,4	95,7 ± 2,8	79 ± 0,27	95,4 ± 0,9
0,125	79 ± 0,45	98,2 ± 1,6	82 ± 1,35	98,0 ± 0,4	84 ± 1,85	98,3 ± 2,5
0,15	79 ±0,44	93,7 ± 2,2	84 ± 0,79	97,2 ± 1,9	82 ± 0,07	91,8 ± 0,4
0,2	82 ± 1,12	94,2 ± 1,3	85 ± 0,4	95,2 ± 0,7	84 ± 0,26	91,9 ± 2,9

3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý đến hiệu quả tinh sạch

Độ tinh sạch của sản phẩm PHA tăng lên 91,9 %wt với mức độ thu hồi đạt trên 97 % khi kéo dài thời gian xử lý lên 300 phút. Đặc biệt, chất lượng sản phẩm PHA hầu như không có sự sai khác nhiều so với ban đầu.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thời gian xử lý tới hiệu quả tinh sạch

Thời gian (phút)	**Độ sạch** (%wt)	**Hiệu suất** (%)	**Mw** (10^6 Da)	**Mn** (10^5 Da)	**DPI** (Mw/Mn)	**Thuộc tính nhiệt**	
						T*m* (^oC)	**T*g*** (^oC)
0	72,2 ± 1,96	100	1,86	4,79	3,9	173,21	3,59
30	76,3 ± 0,1	96,7 ± 2,66	1,14	3,02	3,8	171,11	5,42
60	81,2 ± 0,48	96,2 ± 3,14	0,95	4,4	2,15	170,03	5,18
90	84,6 ± 0,5	97,6 ± 3,0	0,92	3,87	2,4	172,14	4,36
120	87,6 ± 1,1	98,8 ± 2,12	0,86	3,7	2,3	172,51	5,34
180	87,5 ± 0,21	98,3 ± 1,4	0,84	3,85	2,18	172,44	6,46
240	90,7 ± 0,01	98,2 ± 1,53	0,72	3,23	2,23	167,24	6,73
300	91,9 ± 0,22	97,7 ± 2,76	0,68	3,07	2,21	169,15	8,62

3.3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng sinh khối đến hiệu quả tinh sạch

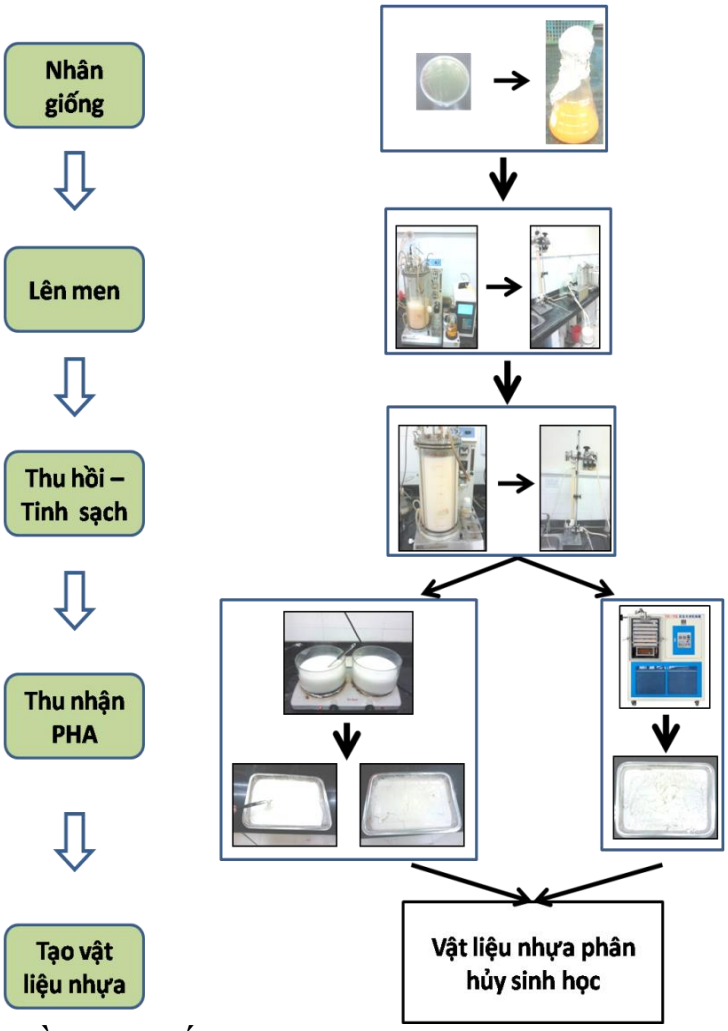
Độ tinh sạch thu được dao động từ 89,3 %wt đến 90,6 %wt với mức độ thu hồi đạt xấp xỉ 97% khi hàm lượng sinh khối khô trong mẫu tăng từ 50 g/L lên 90 g/L. Chứng tỏ hàm lượng sinh khối hầu như không ảnh hưởng đến hiệu quả tách chiết và thu hồi PHA khi sử dụng 0,125 M NaOH để xử lý sinh khối tế bào ướt của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của hàm lượng sinh khối đến hiệu quả tinh sạch

CDW ban đầu (g/L)	Độ sạch (%)	Hiệu suất (%)
50	89,3 ± 1,0	97,2 ± 1,5
70	90,6 ± 2,8	96,6 ± 1,3
90	89,8 ± 0,6	97,1 ± 1,05

(Ghi chú: Hàm lượng PHA trong tất cả các mẫu thí nghiệm ban đầu là 71,15 ± 1,5 %wt)

3.4. Thử nghiệm tạo vật liệu PHA trong điều kiện phòng thí nghiệm



Hình 3.9. Sơ đồ sản xuất thử nghiệm PHA quy mô phòng thí nghiệm

3.4.1. Nhân giống

Giống vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 được chuẩn bị trên môi trường dinh dưỡng trong thời gian 15 h để đạt được giá trị mật độ quang ở 600 nm là 7±0,5.

3.4.2. Lên men

Tiến hành lên men bán liên tục sử dụng chiến lược tăng dần nồng độ fructose. Quá trình lên men được tiến hành trong 54 h.

3.4.3. Thu hồi sinh khối – Tách chiết PHA

Sinh khối tế bào sau lên men được thu hồi bằng phương pháp siêu lọc sử dụng màng lọc khuẩn cỡ 0,2 µm.

Quá trình tách chiết PHA từ sinh khối vi khuẩn sau lên men được tiến hành trong điều kiện 0,125 M NaOH ở 50 ^{o}C trong 300 phút trên thiết bị lọc tiếp tuyến.

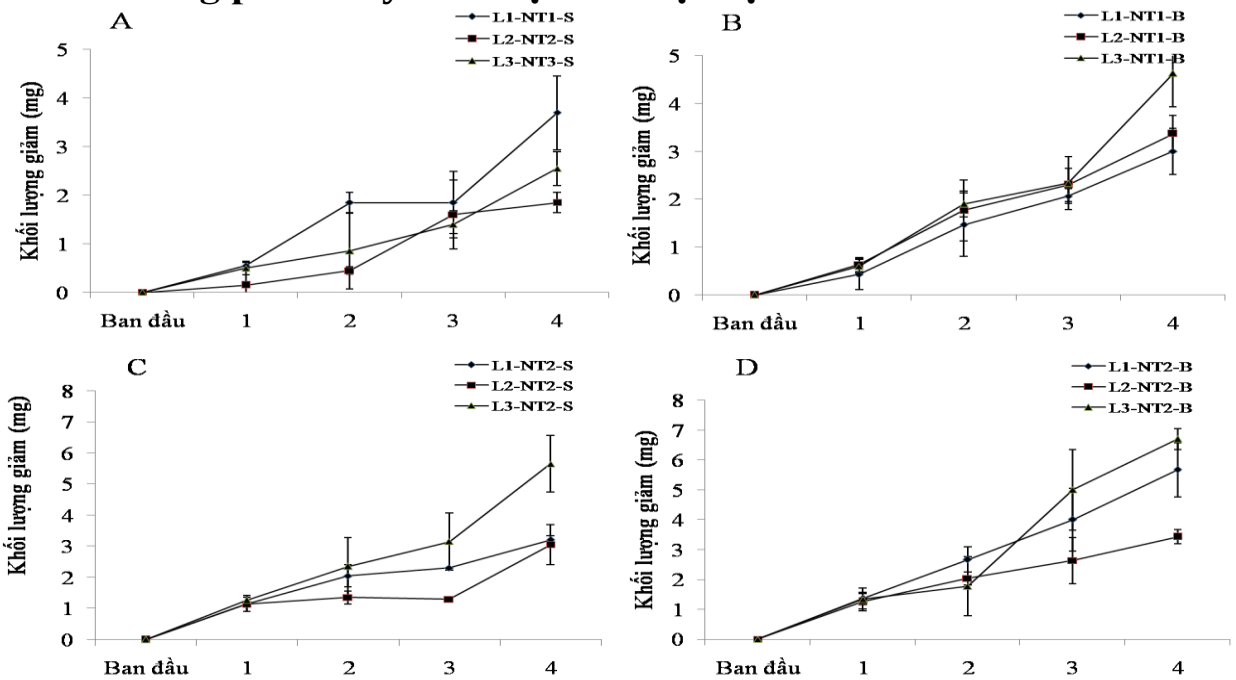
3.4.4. Thu hồi PHA

Sản phẩm PHA được thu hồi bằng phương pháp nhiệt hoặc đông khô.

3.4.5. Tạo hạt nhựa sinh học có bản chất PHA

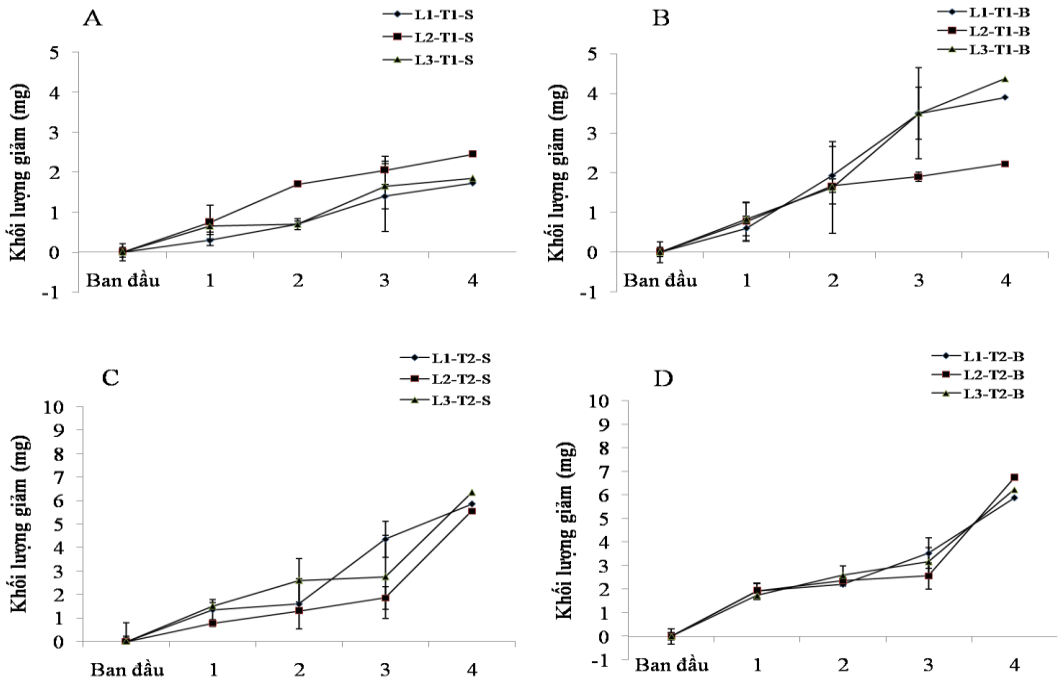
Mẫu nguyên liệu PHA được đưa qua thiết bị đùn nhiệt với nhiệt độ 180 ^{o}C để tạo hạt nhựa có bản chất PHA.

3.5. Khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA



Hình 3.10. Độ giảm khối lượng của các mẫu PHA thu hồi nhờ CHCl3 theo thời gian khác nhau (tuần)

(A)-Mẫu NT1 bề mặt, (B)-Mẫu NT1 chôn, (C)-Mẫu NT2 bề mặt, (D) mẫu NT2 chôn

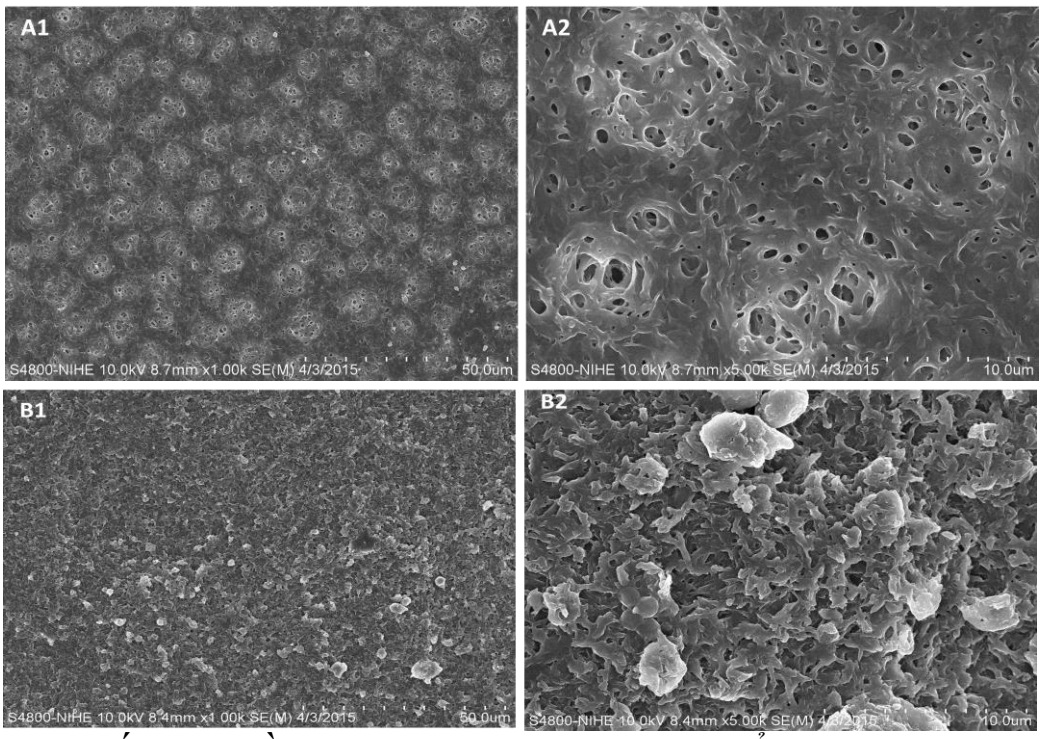


Hình 3.81. Độ giảm khối lượng của các mẫu PHA thu hồi nhờ NaOH theo thời gian khác nhau (tuần)

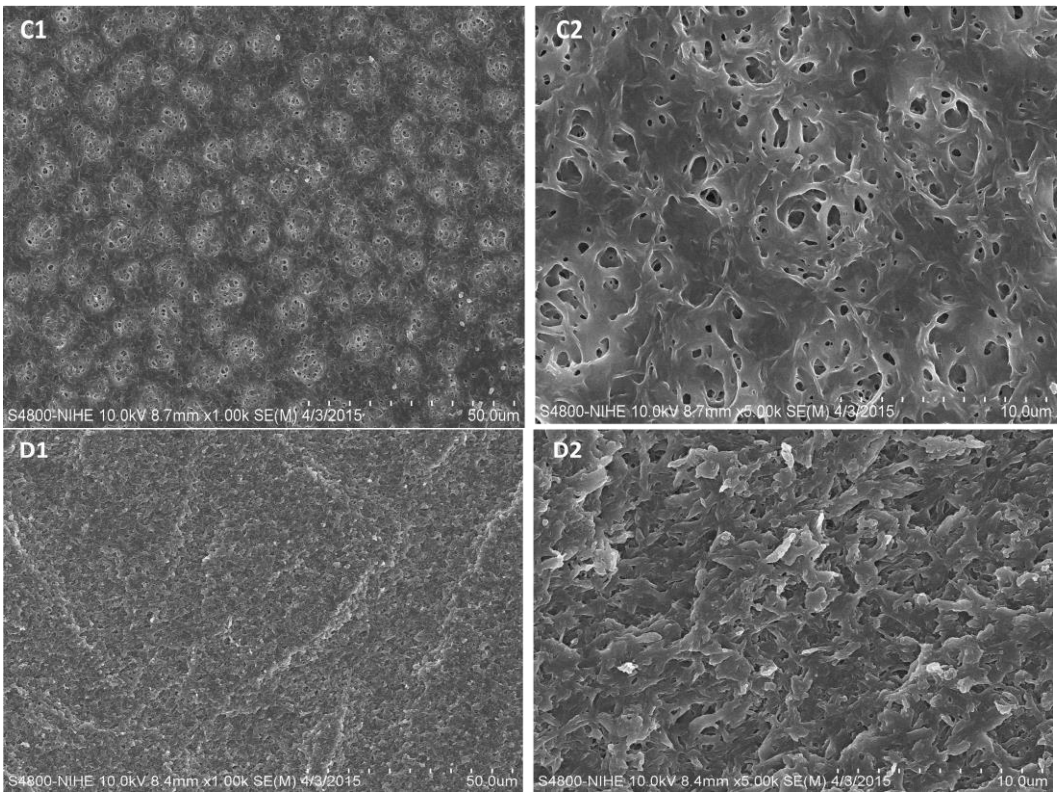
(A)-Mẫu T1 bề mặt, (B)-Mẫu T1 chôn, (C)-Mẫu T2 bề mặt, (D) mẫu T2 chôn

Tất cả các mẫu màng PHA thí nghiệm đều thể hiện sự giảm khối lượng so với thời điểm ban đầu. Chúng tôi thấy rằng không có sự sai khác về mức độ phân hủy sinh học khi độ dầy của màng PHA thay đổi. Tuy nhiên mức độ phân hủy của các mẫu PHA thu được thông qua xử lý sinh khối bằng NaOH thấp hơn so với các mẫu PHA thu hồi bằng chloroform. Độ giảm khối lượng của các mẫu PHA thu được nhờ chloroform dao động từ 20 % đến 25 %, trong khi đối với các mẫu PHA thu hồi nhờ NaOH chỉ đạt trong khoảng 14 % đến 18 %.

Qua kết quả phân tích sắc kí gel thẩm thấu chúng tôi nhận thấy các mẫu PHA thu hồi bằng dung môi chloroform có sự giảm $M_w$và mức độ phân tán của polymer một cách rõ rệt so với mẫu ban đầu, trong khi sự thay đổi này ở các mẫu PHA còn lại hầu như không có sự sai khác đáng kể. Ngoài ra, khi phân tích mẫu màng phim PHA trên kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy có sự khác biệt lớn về màu sắc cũng như cấu trúc bề mặt giữa các mẫu thí nghiệm so với mẫu đối chứng. Các mẫu thí nghiệm chôn ủ sau một thời gian sẽ chuyển sang màu vàng xám, cùng với đó là sự xuất hiện của các điểm thủng lỗ chỗ trên bề mặt màng. Sự khác biệt càng được thể hiện rõ khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM). Bề mặt màng PHA không chôn ủ có cấu trúc sợi đồng đều, trong khi có sự phá hủy mạnh mẽ cấu trúc bề mặt ở các mẫu thí nghiệm. Đồng thời có sự xuất hiện của các tế bào vi khuẩn và nấm mốc tại các vị trí phân hủy mạnh (hình 3.12 và 3.13).



Hình 3.92. Cấu trúc bề mặt màng PHA dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) (A1, A2) – Mẫu đối chứng NT1; (B1, B2) – Mẫu L3-NT1-B



Hình 3.103. Cấu trúc bề mặt màng PHA dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) (C1, C2) –Mẫu đối chứng T1; (D1, D2) – Mẫu L3-T1-B

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

1.1. Từ các mẫu đất thu thập được chúng tôi đã phân lập được 869 chủng vi khuẩn và xác định được 50 chủng có khả năng sinh tổng hợp PHA. Trong số đó 8 chủng vi khuẩn phân lập được từ đất RNM đã được lựa chọn nghiên cứu về các đặc điểm hình thái, sinh lý – hóa sinh, và giải trình tự đoạn gen 16S rDNA. Các chủng này được xếp vào hai chi *Bacillus* (3 chủng NĐ97, NĐ153, và QN194) và *Yangia* (5 chủng bao gồm NĐ199, NĐ218, NĐ240, QN187, và QN271. Trình tự đoạn gen 16S rDNA của 8 chủng này đã được báo cáo trên GenBank với các mã số từ JQ691602 đến JQ691609. Chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn.

1.2. Chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA đa dạng trên nhiều nguồn C và tiền chất C khác nhau. Trong đó, fructose và cao nấm men là nguồn C và N phù hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có khả năng sinh tổng hợp PHA đồng thời với quá trình sinh trưởng mà không yêu cầu điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng. Sử dụng kỹ thuật lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng với các chiến lược duy trì nồng độ C khác nhau đã giúp cải thiện khả năng sản xuất PHA từ chủng này. Khi lên men với chiến lược chiến lược tăng dần nồng độ fructose trong môi trường từ 3 g/L đến 20 g/L theo từng giai đoạn nuôi cấy, sau 54 h nuôi cấy chúng tôi thu được kết quả tốt nhất: CDW đạt 78 g/L, hàm lượng PHA đạt 67,5 %wt và năng suất đạt 1 g/L/h.

1.3. Đã xác định được điều kiện tách chiết và thu hồi PHA trực tiếp từ sinh khối chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Sử dụng 0,125 M NaOH ở 50 ^{o}C trong 300 phút, độ sạch của sản phẩm PHA đạt 92 %wt với hiệu suất thu hồi đạt trên 96 %. Các thuộc tính hóa – lý của sản phẩm PHA thu được hầu như không sai khác nhiều so với sản phẩm tách chiết – thu hồi nhờ phương pháp sử dụng chloroform.

1.4. Sản phẩm PHA thu được từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 thể hiện khả năng phân hủy sinh học tốt trong điều kiện chôn ủ (30 ^{o}C với độ ẩm >80 %). Mức độ giảm khối lượng của các mẫu màng PHA dao động trong khoảng 15 % đến 25 % sau 4 tuần thí nghiệm.

2. KIẾN NGHỊ

Những kết quả thu được trong quá trình nghiên cứu cho thấy phần nào mức độ phong phú và tiềm năng của vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA có trong hệ sinh thái đất ở Việt Nam.Đặc biệt, những kết quả nghiên cứu thu được về khả năng sản xuất, thu hồi sản phẩm PHA, và chất lượng sản phẩm PHA từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 cho thấy tiềm năng phát triển rất lớn của vật liệu này ở Việt Nam. Tuy nhiên để có thể phát triển loại vật liệu này thành sản phẩm thương mại trong tương laithì vẫn còn những vấn đề cần được giải quyết sau đây:

1. Cần tiếp tục có những nghiên cứu thử nghiệm và hoàn thiện quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp.

2. Cần có những nghiên cứu thử nghiệm ứng dụng và đánh giá loại vật liệu này trong các lĩnh vực khác nhau, đặc biệt là lĩnh vực y tế.

CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Doan Van-Thuoc, **Tran Huu-Phong**, Nguyen Thi-Binh, Nguyen Thi-Tho, Duong Minh-Lam, Jorge Quillaguamán (2012), Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam. *Microbiology Open*, 1(4): 395-406.
2. **Tran Huu Phong**, Bui Thi Thanh Nga, Phan Due Thanh, Duong Van Hop, Doan Van Thuoc (2013), Biological characterization of bacterial strain MT15 – A polyhydroxyalkanoate producer bacterium isolated from noodle waste water Hanoi city, *Annual reports of International Center for Biotechnology* (Osaka University), 35: 294-302.
3. **Tran Huu Phong**, Doan Van Thuoc, Kumar Sudesh (2016), Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by Yangia sp. ND199 from different carbon sources, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84: 361-366.
4. **Trần Hữu Phong**, Bùi Thị Thanh Nga, Phan Duệ Thanh, Đoàn Văn Thược (2015), Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) của chủng vi khuẩn MT33 phân lập từ nước thải, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53(4): 408-417.
5. **Tran Huu Phong**, Doan Van Thuoc, Duong Van Hop (2015), Inexpensive carbon and nitrogen sources for polyhydroxyalkanoates (PHA) production by halophilic bacterium Yangia sp. ND199, *Chemical and Biological Science* (Journal of Science of HNUE), 60(9): 119-126.
6. Doan Van Thuoc, **Tran Huu Phong**, Dang Minh Khuong (2015), A fed-batch fermentation process for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by Yangia sp. ND199 using molasses as substrate, *Tạp chí Sinh Học*, 37(3): 325-331.
7. Doan Van Thuoc, Luu Thi Hoi, **Tran Huu Phong** (2015), Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from Yangia sp. ND199 by simple digestion with sodium hypochloride, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53(6): 706-714.
8. Doan Van-Thuoc, **Tran Huu-Phong**, Dang Minh-Khuong, Rajni Hatti-Kaul (2015), Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by a moderate Halophile Yangia sp. ND199 using glycerol as a carbon source, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6): 3120-3132.
9. **Trần Hữu Phong**, Đoàn Văn Thược, Dương Văn Hợp (2016), Nghiên cứu thu hồi polyhydroxyalkanoate từ sinh khối chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 nhờ phương pháp thủy phân với natri hydroxit, *Báo cáo Khoa học về Nghiên cứu và Giảng dạy Sinh học ở Việt Nam* (Hội Nghị khoa học Quốc gia lần thứ 2, Đà Nẵng): 1140-1147.
10. **Tran Huu Phong,** Dang Minh Khuong, Duong Van Hop, Doan Van Thuoc (2017), Different fructose feeding strategies for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Yangia* sp. ND199, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ,* 55(2): 195-201.