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

TRẦN HỮU PHONG

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2017

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

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
1. PGS.TS. DƯƠNG VĂN HỢP
2. PGS.TS. ĐOÀN VĂN THƯỢC

HÀ NỘI – 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của bản thân tôi.

Các kết quả công bố trong luận án là trung thực, chính xác. Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về các số liệu, nội dung đã trình bày trong luận án.

Hà Nội, ngày …… tháng…… năm 2017

Trần Hữu Phong

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

- PGS. TS. Dương Văn Hợp, người thầy đã dìu dắt tôi trong suốt thời gian thực hiện khóa học NCS. Luôn luôn động viên và tạo những điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành các công việc của luận án.
- TS. Đoàn Văn Thược, người thầy luôn theo sát bên tôi trong từng thí nghiệm dù nhỏ nhất, chỉ bảo tận tình và có những góp ý vô cùng quý báu trong quá trình nghiên cứu.
- GS. Kumar Sudesh và các bạn đồng nghiệp (Biomaterial Lab, Universiti Sains Malaysia) đã có những góp ý quý báu về đề tài nghiên cứu và giúp đỡ về tinh thần và vật chất trong quá trình tôi thực tập ở nước ngoài.
- GS. TS. Nguyễn Thành Đạt, PGS. TS. Vương Trọng Hào, TS. Mai Thị Hằng, những người thầy đầu tiên truyền đạt kiến thức, định hướng về về lĩnh vực vi sinh vật cho tôi từ giai đoạn chập chững bước vào con đường nghiên cứu. Đồng thời các thầy cũng có những góp ý vô cùng quan trọng trong suốt quá trình tôi thực hiện đề tài.
- PGS. TS. Dương Minh Lam, TS. Trần Thị Thúy, TS. Phan Duệ Thanh, TS. Đào Thị Hải Lý, ThS. Tống Thị Mơ, CN. Phạm Thị Hồng Hoa, CN. Phạm Thị Vân, về những góp ý, hỗ trợ tinh thần trong suốt quá trình tôi thực hiện nghiên cứu.
- PGS. TS. Mai Sỹ Tuấn, người đã tạo điều kiện cho tôi có cơ hội học tập, làm việc, và nghiên cứu tại Khoa Sinh học – Trường Đại học Sư phạm Hà Nội kể từ khi còn là sinh viên.
- Lãnh đạo Viện Vi sinh vật & Công nghệ Sinh học, cán bộ phòng Bảo tàng giống vi sinh vật, phòng lên men (Viên VSV&CNSH, Đại học Quốc Gia) đã hỗ trợ tôi về mặt trang thiết bị và kỹ thuật trong quá trình nghiên cứu.
- Ban Giám Hiệu, Phòng Quản lý sau đại học, Ban Chủ nhiệm khoa Sinh học Trường Đại học Sư phạm Hà Nội đã luôn động viên và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.
- Gia đình nhỏ và Gia đình lớn của tôi luôn yêu thương, động viên, và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành khóa học.

Hà Nội, ngày .... tháng ..... năm 2017

Trần Hữu Phong

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 4
1.1. Tổng quan chung về nhựa 4
1.1.1. Nhựa tổng hợp 4
1.1.2. Nhựa sinh học 5
1.2. Polyhydroxyalkanoate (PHA) 10
1.2.1. Cấu trúc hóa học và đặc điểm của hạt PHA 10
1.2.2. Các dạng PHA từ vi sinh vật 12
1.2.3. Thuộc tính vật lý của PHA 14
1.3. Vi khuẩn và các con đường sinh tổng hợp PHA 15
1.3.1. Vi khuẩn sinh tổng hợp PHA 15
1.3.2. Nguồn C và các con đường sinh tổng hợp PHA ở vi khuẩn 20
1.4. Sản xuất PHA từ vi khuẩn 24
1.4.1. Lên men sản xuất PHA từ vi khuẩn 24
1.4.2. Tách chiết – thu hồi PHA từ sinh khối vi khuẩn 29
1.5. Tình hình nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng PHA 32
1.5.1. Nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng PHA trên thế giới 32
1.5.2. Tình hình nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng PHA ở Việt Nam 34
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP 36
2.1. Vật liệu nghiên cứu 36
2.1.1. Chủng vi sinh vật 36
2.1.2. Hóa chất và môi trường nuôi cấy 36
2.1.3. Thiết bị nghiên cứu 36
2.2. Phương pháp nghiên cứu 37
2.2.1. Phương pháp vi sinh vật học 37
2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử 41
2.2.3. Phương pháp nghiên cứu lên men trên thiết bị lên men 42

2.2.4. Phương pháp tách chiết và thu hồi PHA 44
2.2.5. Các phương pháp phân tích 45
2.2.6. Nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA 51
2.2.7. Phương pháp toán học 52
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 53
3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp PHA 53
3.1.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn sơ bộ vi khuẩn sinh tổng hợp PHA 53
3.1.2. Khả năng sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn 55
3.1.3. Đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn tuyển chọn 58
3.1.4. Đặc điểm sinh lý – hóa sinh của các chủng vi khuẩn tuyển chọn phân lập từ đất rừng ngập mặn 60
3.1.5. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn tuyển chọn 65
3.2. Nghiên cứu các điều kiện lên men tích lũy PHA của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 68
3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng đến sinh trưởng và tích lũy PHA ... 68
3.2.2. Kết quả nghiên cứu lên men tích lũy PHA trên nồi lên men 86
3.3. Tách chiết và thu hồi PHA từ sinh khối lên men chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 103
3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và nồng độ NaOH đến hiệu quả tinh sạch . 104
3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý đến hiệu quả tinh sạch 106
3.3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng sinh khối đến hiệu quả tinh sạch..... 107
3.4. Thử nghiệm tạo vật liệu PHA trong điều kiện phòng thí nghiệm ... 109
3.4.1. Nhân giống 109
3.4.2. Lên men 109
3.4.3. Thu hồi sinh khối – Tách chiết PHA 110

3.4.4. Thu hồi PHA 110
3.4.5. Tạo vật liệu PHA..... 111
3.5. Đánh giá khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA từ *Yangia sp*. NĐ199 trong điều kiện chôn lấp 112
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 117
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 119
TÀI LIỆU THAM KHẢO 121
PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	**Diễn giải**
BC	Bacterial Cellulose
BPA	bisphenol A
C	Cacbon
CDW	Cell dried weight – Khối lượng khô
Copolymer	Polymer dị hình
Cs	Cộng sự
DSC	Differential scanning calorimetry – Phân tích nhiệt vi sai
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FID	Flame ionization detector – Đầu dò ngọn lửa
GC	Gas chromatography – Sắc kí khí
GPC	Gel permeation chromatography – Sắc kí thẩm thấu gel
HA	Hydroxyalkanoic acid
Homopolymer	Polymer đồng hình
LDPE	Polyethylene tỷ trọng thấp
mcl	Medium chain length – chuỗi mạch trung bình
M_w	Tổng khối lượng phân tử trung bình
M_n	Trung bình khối lượng phân tử
N	Ni tơ
NMR	Nuclear magnetic resonance – Cộng hưởng từ hạt nhân
NPCM	Thành phần tế bào không phải polymer
NR	Non research – Không nghiên cứu
O	Oxy
OD	Optical density – Mật độ quang
P	Phốt pho
PAH	hợp chất đa vòng thơm ngưng tụ
PBDE	polybrominated diphenyl ether
PCBs	polychlorinated biphenyl
PDI	Polydispersity index – Chỉ số độ phân tán polymer
PET	polyethylene terephthalate
PTT	polytrimethylene terephthalate

PCL	Polycaprolactone
PBAT	poly(ethylene adipate-co-terephthalate)
PHA	polyhydroxyalkanoate
PLA	Polylactic acid
PE	Polyethylene
PP	Polypropylene
PBS	Polybutylene succinate
PGA	Polyglycolic acid
P(3HB-co-3HV)	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
P(3HB)	Poly(3-hydroxybutyrate)
P(3HB-co-4HB)	Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)
P(3HB-co-3HHx)	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)
P(3HB-co-3HP)	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyheptanoate)
PCR	Polymerase chain reaction – Phản ứng khuếch đại gen
RCM	Residual cell mass – Khối lượng tế bào còn lại
rpm	Rotation per minute – vòng quay/phút
S	Lưu huỳnh
scl	Short chain length – chuỗi mạch ngắn
3HD	3-hydroxydecanoate
3HDD	3-hydroxydodecanoate
3HO	3-hydroxyoctanoate
scl-PHA	PHA mạch ngắn
mcl-PHA	PHA mạch trung bình
SDS	Sodium dedocy sulfate
T_m	Nhiệt độ nóng chảy
T_g	Nhiệt độ thủy tinh hóa
SEM	Scanning electron microscope – Kính hiển vi điện tử quét
TEM	Transmission electron microscope – Kính hiển vi điện tử truyền qua
16S rADN	ADN mã hóa tiểu phần 16S ribosome
VFA	Axit béo bay hơi
%wt	Percent weight – phần trăm khối lượng

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. So sánh thuộc tính của một vài loại PHA với các nhựa có nguồn gốc dầu mỏ (nguồn Khanna và Srivastava 2005).....15

Bảng 1.2. Phân loại PHA synthase dựa theo cấu trúc và đặc hiệu cơ chất 20

Bảng 1.3. Ưu điểm và nhược điểm của các phương pháp tách chiết–thu hồi PHA.....30

Bảng 3.1. Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn (trích từ phụ lục 5) 56

Bảng 3.2. Đặc điểm sinh lý – hóa sinh của các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất rừng ngập mặn.....62

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn C đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 69

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của các tiền chất C đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199.....73

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của các nồng độ natri heptannoate đến sinh tổng hợp P(3HB-co-3HV) của chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 75

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của các nồng độ 1,4-butanediol đến sinh tổng hợp P(3HB-co-4HB) của chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 78

Bảng 3.7. Thuộc tính lực của PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199.....81

Bảng 3.8. Thuộc tính hóa-lý của các PHA thu được từ chủng Yangia sp. NĐ199 khi nuôi cấy trên các nguồn cơ chất khác nhau.....81

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của các nguồn N đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199.....84

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199.....85

Bảng 3.11. Khả năng sản xuất PHA của một số chủng vi khuẩn ưa mặn 103

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý và nồng độ NaOH đến hiệu quả tinh sạch PHA từ sinh khối *Yangia sp*. NĐ199.....104

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH (ở 50 ^{o}C) đến một số thuộc tính của sản phẩm PHA thu được.....105

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của thời gian xử lý tới hiệu quả tinh sạch PHA từ sinh khối vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 107

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của hàm lượng sinh khối đến hiệu quả tinh sạch PHA từ sinh khối vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 108

Bảng 3.16. Sự giảm M_w sau 4 tuần thí nghiệm của các mẫu polymer 114

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình mô tả phân loại các nhóm nhựa (nguồn european-bioplastics.org).....6
Hình 1.2. Công thức cấu tạo chung của polyhydroxyalkanoates (PHA) 10
Hình 1.3. Cấu trúc hạt polyhydroxyalkanoates (PHA) trong tế bào 11
Hình 1.4. Mô hình cấu trúc các operon pha (Nguồn Suriyamongkol và Cs, 2007).....19
Hình 1.5. Các con đường sinh tổng hợp PHA ở vi sinh vật (Nguồn Tan và Cs, 2014).....23
Hình 2.1. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa hàm lượng fructose và giá trị mật độ quang 46
Hình 2.2. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa hàm lượng xiro ngô và giá trị mật độ quang 46
Hình 2.3. Mối tương quan giữa khối lượng phân đoạn 3-hydroxyalkanoic với giá trị diện tích phổ sắc kí khí 48
Hình 2.4. Các bước chuẩn bị mẫu và phân tích cơ học vật liệu PHA 50
Hình 2.5. Mô hình thí nghiêm nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học 52
Hình 3.1. Hình ảnh tuyển chọn sơ bộ các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA trên môi trường có chứa Nile Blue A.....54
Hình 3.2. Ảnh chụp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) hạt PHA được tích lũy nội bào bởi các chủng vi khuẩn tuyển chọn 56
Hình 3.3. Phổ 500 MHz 1H-NMR của P(3HB) tách chiết từ sinh khối chủng QN194 (A) và NĐ199 (B) khi nuôi cấy trên nguồn glucose 57
Hình 3.4. Kiểm tra kết quả phản ứng khuếch đại trình tự 16S rADN trên agarose 65
Hình 3.5. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất rừng ngập mặn.....66
Hình 3.6. Phổ 1H NMR của PHA tách chiết từ chủng *Yangia sp* NĐ199 khi nuôi trên nguồn fructose 74
Hình 3.7. Phổ 1H NMR của P(3HB-co-3HV) tách chiết từ Yangia sp. NĐ199 khi nuôi cấy trên nguồn fructose kết hợp với tiền chất natri valerate 75
Hình 3.8. Phổ 1H NMR của P(3HB-co-4HB) tách chiết từ Yangia sp. NĐ199 khi nuôi cấy trên nguồn fructose kết hợp với natri 4-hydroxybutyrate.....77
Hình 3.9. Các con đường giả thuyết quá trình sinh tổng hợp PHA của chủng Yangia sp. NĐ199 từ các nguồn C khác nhau. 80

Hình 3.10. Động thái lên men mẻ sản xuất PHA trên nguồn fructose của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 87
Hình 3.11. Lên men sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 với nồng độ 20 g/L fructose.....90
Hình 3.12. Lên men sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 với sự thay đổi nồng độ fructose hai giai đoạn.....91
Hình 3.13. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 với nồng độ fructose tăng dần.....94
Hình 3.14. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 sử dụng nguồn xiro ngô không thanh trùng 96
Hình 3.14. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 sử dụng nguồn xiro ngô không thanh trùng (tiếp).....97
Hình 3.15. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn *Yangia sp*. NĐ199 sử dụng nguồn rỉ đường 99
Hình 3.16. Lên men hai pha sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 trên nguồn rỉ đường và glucose 100
Hình 3.17. Ảnh chụp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) các hạt PHA từ sinh khối *Yangia sp*. NĐ199 sau khi xử lý NaOH.....108
Hình 3.18. Sơ đồ quy trình sản xuất PHA quy mô phòng thí nghiệm 111
Hình 3.19. Độ giảm khối lượng của các mẫu PHA thu hồi nhờ $CHCl_3$ theo thời gian khác nhau (tuần).....112
Hình 3.20. Độ giảm khối lượng của các mẫu PHA thu hồi nhờ NaOH theo thời gian khác nhau (tuần).....113
Hình 3.21. Diễn biến quá trình phân hủy sinh học của mẫu L3-NT1-B 115
Hình 3.22. Diễn biến quá trình phân hủy sinh học của mẫu L3-T1-B 115
Hình 3.23. Cấu trúc bề mặt màng PHA thu hồi nhờ chloroform dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) 116
Hình 3.24. Cấu trúc bề mặt màng PHA thu hồi nhờ NaOH dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) 116

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Chất dẻo tổng hợp – hay còn gọi là nhựa – chiếm một vai trò rất lớn trong đời sống xã hội cũng như trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau hiện nay. Cùng với sự phát triển của xã hội nhu cầu về nhựa 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 đã tăng lên 288 triệu tấn vào năm 2012 và trung bình mỗi năm tăng từ 3 % đến 5 % trong những năm gần đây [183]. 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 và giá thành ngày một tăng [183]. 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 [118]. Bên cạnh đó quá trình phân rã các sản phẩm này trong tự nhiên giải phóng ra nhiều hợp chất độc hại [205]. 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 truyền thống gây ra, các loại polymer sinh học đã được nhiều 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 ở polymer truyền thống, (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 [44, 115]. Bởi vậy PHA đã và đang được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống xã hội [41].

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 [10, 12]. 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 [210]. 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 tích lũy PHA theo phương pháp lên men mẻ và lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng trên thiết bị lên men 10 L.

- 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.

- Nghiên cứu đánh giá khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA từ chủng vi khuẩn tuyển chọn 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 một chủng vi khuẩn (*Yangia* sp. NĐ199) được phân lập từ hệ sinh thái đất ngập mặn có khả năng sinh tổng hợp PHA.

- 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 là các dữ 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

Nhựa (hay còn gọi là chất dẻo) – plastics - là thuật ngữ nói chung về các vật liệu tổng hợp hoặc bán tổng hợp được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của xã hội. Nhựa hiện hữu ở khắp mọi nơi, là nguyên liệu để sản xuất quần áo, đồ gia dụng, đồ chơi cho đến các thiết bị kỹ thuật cao khác như máy tính, điện thoại, xe ô tô,… Nguyên liệu ban đầu để sản xuất nhựa có thể là than đá, khí gas tự nhiên, song dầu thô là nguồn nguyên liệu chủ yếu cho công nghiệp sản xuất nhựa hiện nay. Khoảng 4 % sản lượng dầu mỏ được sử dụng làm nguyên liệu trong công nghiệp sản xuất nhựa hiện nay và một lượng tương đương được dùng để cung cấp năng lượng cho quá trình sản xuất này [191]. Sản lượng nhựa trên toàn thế giới tăng nhanh từ 1,5 triệu tấn (1950) lên 288 triệu tấn (2012) với mức tăng trung bình hàng năm khoảng 3 % đến 5 % trong giai đoạn gần đây [183].

Nhựa là loại vật liệu vô cùng đa năng, khối lượng nhẹ, không thấm nước, bền vững và giá thành thấp. Do đó các vật liệu này có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như công nghiệp, nông nghiệp và sản xuất đồ gia dụng. Loại nhựa tổng hợp được tiêu thụ nhiều nhất là PE với sản lượng sản xuất hiện nay vào khoảng 140 triệu tấn/năm [169]. Mức độ bền vững cao, phần lớn trong số đó không có khả năng phân hủy sinh học, cùng với việc thiếu những phương pháp có hiệu quả trong việc loại bỏ một cách an toàn các sản phẩm nhựa tổng hợp sau khi sử dụng là nguyên nhân khiến cho loại vật liệu này ngày một tích lũy nhiều hơn trong tự nhiên và tác động xấu đến sự sống của các sinh vật cả ở trên cạn và dưới nước [170, 183]. Theo thống kê trong bùn thải đô thị có tới khoảng 10 % khối lượng các vật chất có bản chất là nhựa [27]. Bên cạnh đó trên 80 % rác thải của các hoạt động do con người tạo ra được đưa xuống đại dương [60]. Động vật trên cạn cũng như dưới nước đều có thể nhầm lẫn các vật dụng nhựa trong môi trường với thức ăn của chúng. Hàng nghìn động vật trong đại dương, từ các loài cá

nhỏ cho đến những loài lớn hơn, bị chết mỗi năm bởi việc ăn nhầm hoặc bị mắc vào các rác thải là nhựa [191]. Quá trình gãy vụn các vật dụng là nhựa không chỉ tạo ra các mảnh bụi gây ô nhiễm không khí, đất mà còn giải phóng các chất phụ gia độc hại như bisphenol A (BPA), phthalate, polybrominated diphenyl ether (PBDE). Các chất này có thể phân tán vào nguồn nước ngầm, nước ao hồ và đi vào các chuỗi thức ăn một cách tự nhiên gây nên những hậu quả nghiêm trọng [74, 138]. Ngoài ra, khi các mảnh nhựa trôi nổi trên đại dương, chúng hấp phụ các chất ô nhiễm độc hại khác như polychlorinated biphenyl (PCBs), dichloro diphenyl trichlomethan (DDT), và các hợp chất đa vòng thơm ngưng tụ (PAH). Các chất này có độc tính vô cùng cao và là nhóm chất có khả năng gây các đột biến rối loạn nội tiết và ung thư. Do đó khi các động vật ăn phải các vật chất này, chất độc sẽ ngấm vào cơ thể và đi vào chuỗi thức ăn [205].

Nhiều chính phủ đã có những biện pháp cụ thể nhằm hạn chế tác hại của nhựa tổng hợp. Chính sách hạn chế việc sử dụng cũng như đánh thuế mạnh vào các sản phẩm nhựa tổng hợp như túi nilon đã được nhiều quốc gia thông qua [210]. Bên cạnh đó các chính sách thúc đẩy sự phát triển của công nghiệp sản xuất nhựa sinh học, đặc biệt là nhựa phân hủy sinh học, cũng được quan tâm rộng rãi [38, 175].

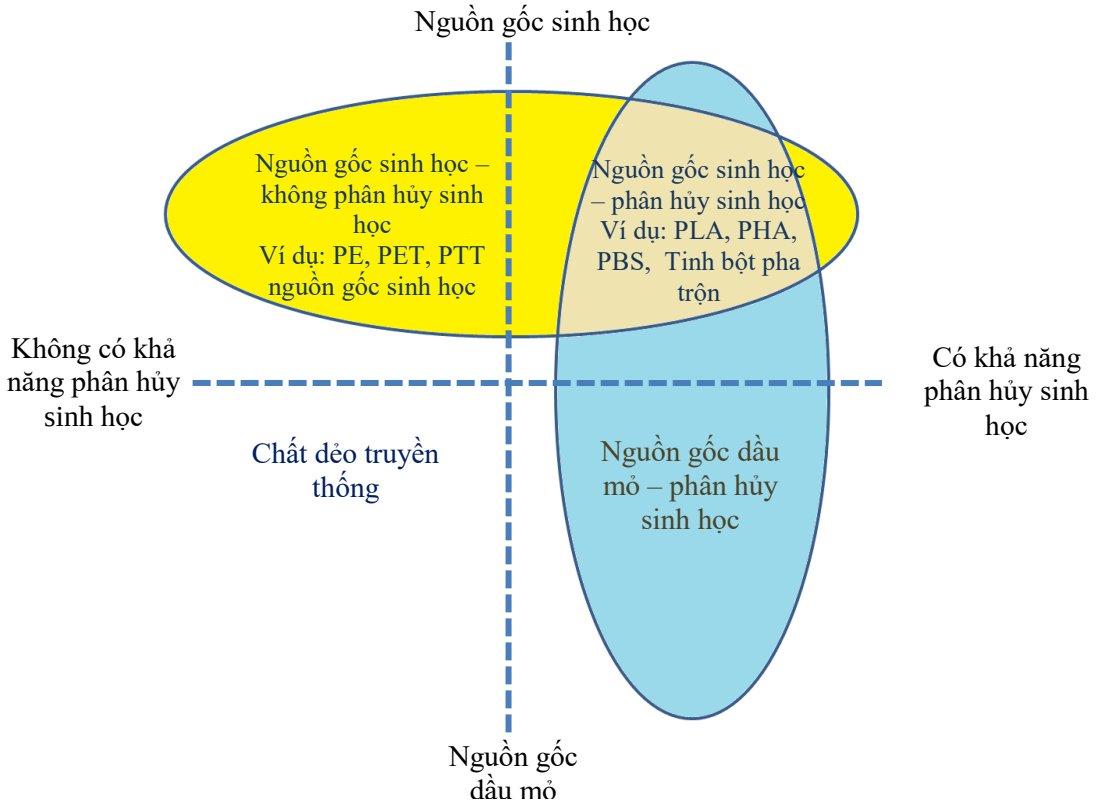
1.1.2. Nhựa sinh học

1.1.2.1. Nhựa sinh học và xu hướng phát triển

Thuật ngữ chất dẻo sinh học (bioplastics) hay nhựa sinh học được sử dụng để chỉ nhóm các vật liệu với các thuộc tính và ứng dụng khác nhau. Theo Hiệp hội nhựa sinh học Châu Âu thì một vật liệu được coi là nhựa sinh học nếu chúng có nguồn gốc sinh học (biobased plastic), hoặc có khả năng phân hủy sinh học (biodegradable plastic), hoặc mang cả hai điểm đặc trưng này [85, 143]. Từ đó chúng ta có thể xác định được 3 nhóm nhựa sinh học chủ yếu bao gồm [22]: (1) các loại nhựa có nguồn gốc sinh học (từ sinh khối có thể phục hồi) nhưng không có khả năng phân hủy sinh học, (2) các loại nhựa có nguồn gốc từ dầu mỏ nhưng lại có khả năng bị phân hủy sinh học, (3) các loại nhựa có nguồn gốc sinh học và có khả năng bị phân hủy sinh học (hình 1.1).

Ngày nay, nhựa sinh học được sử dụng trong một số lĩnh vực chính như:

bao bì, nông nghiệp, sản xuất đồ gia dụng. Với những cải tiến về mặt chất lượng sản phẩm, nhựa sinh học còn được ứng dụng trong các lĩnh vực cao cấp như y học, điện tử, công nghiệp ô tô. Nhu cầu tiêu thụ nhựa sinh học trên thế giới tăng từ 15 nghìn tấn năm 1996 lên đến 225 nghìn tấn vào năm 2008 [144]. Trong đó nhu cầu nhựa sinh học trong lĩnh vực bao bì chiếm tỷ trọng cao nhất với các vật liệu thường được sử dụng là bio-PE và bio-PET. Các loại nhựa có khả năng phân hủy sinh học như polylactic axit (PLA), polybutylene succinate (PBS), PHA có nhiều ưu điểm trong lĩnh vực nông nghiệp bởi khả năng bị phân hủy sinh học của chúng. Màng phủ có khả năng phân hủy sinh học là một cải tiến quan trọng trong nông nghiệp giúp giảm các chi phí trong sản xuất bao gồm chi phí thuốc trừ sâu, chi phí vệ sinh đồng ruộng, và giảm thiểu sự ô nhiễm đất …. Tuy nhiên việc sử dụng các sản phẩm từ nhựa sinh học trong nông nghiệp vẫn còn nhiều hạn chế [33]. Các nhà sản xuất thiết bị điện tử và ô tô hiện nay cũng chuyển hướng sang sử dụng nhựa sinh học trong các bộ phận như vỏ máy tính, bàn phím, vỏ điện thoại, hay ghế ngồi, túi khí, bánh lái, và thậm chí là một phần của bảng điều khiển [144].



Hình 1.1. Hình mô tả phân loại các nhóm nhựa (nguồn european-bioplastics.org)

Dược phẩm và y tế là một lĩnh vực ứng dụng vô cùng mới mẻ và đầy tiềm năng, đặc biệt là đối với các loại nhựa có nguồn gốc sinh học và có khả năng phân hủy sinh học như PLA và PHA. Các mô cấy (implant) có khả năng phân hủy sinh học trong y tế là một trong những lĩnh vực phát triển nhanh nhất trong thị trường chỉnh hình trên thế giới và dự kiến còn tăng mạnh mẽ trong thời gian tới. Các loại nhựa sinh học như PHA và PLA với các thuộc tính lý hóa ưu việt và mức độ tương thích sinh học cao là vật liệu thay thế tiềm năng cho các vật liệu trước đây như titan. Cũng bởi đặc tính phân hủy sinh học, các hệ dẫn truyền thuốc cũng đã được thiết lập từ nhựa sinh học giúp đưa thuốc đến các vùng mô viêm và khối ung thư mà không để lại dấu vết sau quá trình điều trị. Ngoài ra, nhiều ứng dụng của nhựa sinh học trong y tế như tạo các đĩa đệm xương, ốc vít phẫu thuật, khung nâng đỡ hỗ trợ tái sinh mô,…. cũng đã được sản xuất và sử dụng trong y tế [144]. Có thể nói lĩnh vực y tế là vô cùng tiềm năng cho sự phát triển của các loại nhựa phân hủy sinh học nói riêng và nhựa sinh học nói chung.

Theo dự báo của Hiệp hội nhựa sinh học Châu Âu năm 2015, năng suất sản xuất nhựa sinh học toàn cầu có thể tăng từ 1,7 triệu tấn vào năm 2014 lên khoảng 7,8 triệu tấn vào năm 2019 cho dù giá dầu thế giới có xu hướng giảm. Đồng thời tốc độ tăng trưởng dự kiến của lĩnh vực này trong giai đoạn 2016-2020 có thể đạt khoảng 20 % - 25 % mỗi năm [22]. Trong đó, các nhựa có nguồn gốc sinh học nhưng không có khả năng bị phân hủy sinh học, như PE và PET, đóng vai trò chính trong sự phát triển này. Tuy nhiên, các sản phẩm nhựa có khả năng phân hủy sinh học như PHA, PLA, tinh bột pha trộn cũng sẽ có mức tăng trưởng một cách vững chắc.

Có nhiều nhân tố tác động góp phần vào sự tăng trưởng của các loại nhựa sinh học. Tuy nhiên có thể chỉ ra 4 nhân tố góp phần quan trọng vào sự tăng trưởng của thị trường nhựa sinh học bao gồm: (1) sự nổi lên của các nguồn nguyên liệu có bản chất sinh học và có khả năng tái tạo, (2) sự thay đổi nhu cầu của người tiêu dùng theo hướng các sản phẩm thân thiện với môi trường, (3) ảnh hưởng ngày càng lớn của nhựa sinh học đến môi trường, (4) các chính sách hỗ trợ cho nhựa sinh học [38].

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

Sự phát triển của công nghiệp sản xuất nhựa sinh học có thể giải quyết được nhiều vấn đề môi trường của ngành công nghiệp nhựa thế giới. Sử dụng các nguồn tài nguyên hóa thạch như than đá, dầu mỏ làm nguyên liệu trong sản xuất nhựa khiến lượng khí CO_2 phát thải ra khí quyển tăng nhanh chóng, hậu quả là hiện tượng hiệu ứng nhà kính ngày càng trầm trọng. Trong khi việc tăng cường sử dụng các nguồn nguyên liệu có khả năng phục hồi và các nguyên liệu sinh học góp phần hạn chế tình trạng này. Lượng khí CO_2 phát thải ra môi trường trong quá trình sản xuất chỉ khoảng 0,49 kg/kg nhựa sinh học trong khi con số này là 2 đến 3 kg/kg nhựa truyền thống (mức độ giảm tới 80 %). Ngoài ra, đối với các sản phẩm nhựa được tổng hợp sinh học khác như PHA thì lượng phát thải là rất thấp và có thể coi như không phát thải khí CO_2 [218]. Bên cạnh đó, việc sử dụng các nguồn nguyên liệu có khả năng phục hồi cũng đồng nghĩa với hạn chế sử dụng các loại nguyên liệu hóa thạch trong quá trình sản xuất nhựa sinh học. Điều này gián tiếp hạn chế nguy cơ ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí do hoạt động khai thác và tinh chế dầu mỏ, than đá. Các loại nhựa phân hủy sinh học thể hiện tác động đặc biệt đến môi trường. Việc phân hủy của các vật liệu từ nhựa truyền thống có thể mất hàng trăm năm, đồng thời giải phóng nhiều chất độc hại. Trong khi đó các loại nhựa phân hủy sinh học tồn tại thời gian ngắn khi được thải ra môi trường và nhanh chóng khép kín chu trình tuần hoàn vật chất trong tự nhiên.

1.1.2.3. Nhựa phân hủy sinh học

Phân hủy sinh học (biodegradation) về bản chất là quá trình phân hủy của vật chất dưới tác động của hệ enzyme từ sinh vật (chủ yếu là từ vi sinh vật) [29]. Nhựa phân hủy sinh học (biodegradable plastics) là các sản phẩm nhựa có khả năng bị phân hủy bởi sự hoạt động của các tác nhân sinh học (nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn) trong điều kiện thích hợp khi được thải ra ngoài môi trường. Thuộc tính phân hủy sinh học không phụ thuộc vào nguồn vật liệu được sử dụng để tạo nên sản phẩm nhựa mà bản chất trực tiếp chính là cấu trúc hóa học của polymer tạo nên các sản phẩm này. Các sản phẩm nhựa phân hủy sinh học có thể được tạo nên từ nhiều con đường khác nhau, và tựu chung lại ở 3 con đường chính [63].

Thứ nhất, polymer phân hủy sinh học từ con đường tổng hợp hóa học. Các polymer phân hủy sinh học được tổng hợp theo con đường hóa học chủ yếu thuộc 3 nhóm chính: (1) các polyester, (2) polymer có chứa liên kết ester và các phân tử dị hình khác có khả năng tạo liên kết chéo giữa các mạch chính, (3) polyamino axit. Polyglycolic axit (PGA) là một copolymer béo – thơm đã được sản xuất dưới tên thương mại Biomax® hoặc tạo thành dạng sợi với tên gọi Kevlar® (Dupont) có khả năng phân hủy trong 8 tuần. PGA được ứng dụng trong sản xuất túi dùng một lần, khăn tẩy trang, dụng cụ đựng thức ăn. Trong khi PLA đã được nghiên cứu và sản xuất từ những năm 30 của thế kỷ XX được tạo thành từ các phân tử axit lactic thu được trong quá trình lên men vi sinh vật trên nguồn cacbohydrate. Bên cạnh các ứng dụng trong sản xuất đồ gia dụng, PLA hiện nay được ứng dụng chủ yếu trong y học như là chỉ khâu tự tiêu, mô cấy, và ứng dụng trong điều hòa giải phóng thuốc. Một số sản phẩm khác thuộc nhóm này như polyvinyl alcohol (PVA), polycaprolactone (PCL) cũng được tổng hợp theo con đường hóa học [63].

Thứ hai, polymer phân hủy sinh học từ con đường lên men nhờ vi sinh vật. Nhiều vi sinh vật có thể sản sinh polyester và các polysaccharide trung tính từ các nguồn cacbon (C) khác nhau trong quá trình sinh trưởng. PHA là nhóm polymer được sản xuất hiện nay theo con đường lên men vi sinh vật mang nhiều đặc điểm tương tự như các polymer hóa dầu. PHA được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như sản xuất đồ gia dụng, công nghệ điện tử, y tế,…. Bên cạnh đó, các loại polysaccharide trung tính như gellan, pullulan, laminarin, và curdlan cũng được sản xuất từ vi sinh vật. Gellan thường được dùng trong công nghiệp thực phẩm như làm nhân tố keo hóa phủ bánh ngọt, hoặc làm môi trường cho nuôi cấy mô tế bào [63].

Thứ ba, polymer phân hủy sinh học bằng cách biến đổi hóa học các sản phẩm tự nhiên. Sản phẩm vật liệu composit có nguồn gốc từ tinh bột với các hàm lượng khác nhau (10-20%; 40-60%; và 90%) đã được nghiên cứu và sản xuất. Sản phẩm thương mại Ecostar® (Novon, Trung Quốc) được tạo ra khi trộn lẫn PLA với tinh bột được sản xuất từ 1993. Hiện nay một sản phẩm khác do công ty này sản xuất là ECO-3 (phối trộn giữa tinh bột biến tính và chất oxi hóa tự động) được dùng

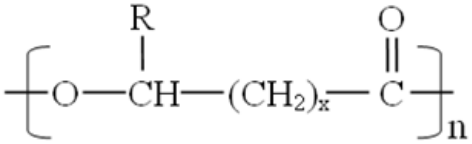
làm chất phụ gia cho polyethylene tỷ trọng thấp (LDPE), và giúp cho sản phẩm này phân rã 95% trong vòng 18 tháng. Quy trình sản xuất cellulose acetate thương mại đã được phát triển từ 1905 để tạo thành sản phẩm nhựa nhiệt dẻo vô định hình có nhiều ứng dụng trong thực tế. Bên cạnh đó, chitin và chitosan cũng được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực dược và y học [63].

1.2. Polyhydroxyalkanoates (PHA)

Trong số các loại polymer có khả năng phân hủy sinh học thì PHA được đánh giá là nguồn vật liệu quan trọng cho công nghiệp sản xuất nhựa phân hủy sinh học bởi chúng đảm bảo các tiêu chí: có nguồn gốc từ nguồn nguyên liệu có khả năng phục hồi, được tổng hợp theo cơ chế sinh học và có khả năng bị phân hủy sinh học. Những lo ngại về các vấn đề môi trường nói chung cùng với nhu cầu tiêu thụ các sản phẩm có khả năng phân hủy sinh học được dự kiến sẽ thúc đẩy sự tăng trưởng của nhựa sinh học nói chung trong đó có PHA trong tương lai.

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

PHA là một nhóm các polyester có cấu trúc hóa học đa dạng được hình thành từ các đơn phân hydroxyalkanoic axit (HA) được gắn với nhau nhờ liên kết ester. Các axit 3-hydroxyalkanoic (3HA) đã bão hòa là các đơn phân thường gặp nhất trong cấu trúc của PHA (hình 1.3). Bên cạnh đó chúng ta có thể gặp các dạng axit 3-hydroxyalkanoic chưa bão hòa, có chứa nhánh hoặc các nhóm thế. Số nguyên tử C trong các đơn phân thường dao động từ 4-14. Một số tác giả hiện nay đã công bố các PHA với sự có mặt của các đơn phân khác với nhóm hydroxyl ở vị trí C số 2, 4 hoặc số 5 (ví dụ: axit lactic; 4-hydroxyalkanoic; 5-hydroxyalkanoic), hay các đơn phân đa chức carboxyl (ví dụ: axit malic) [41].

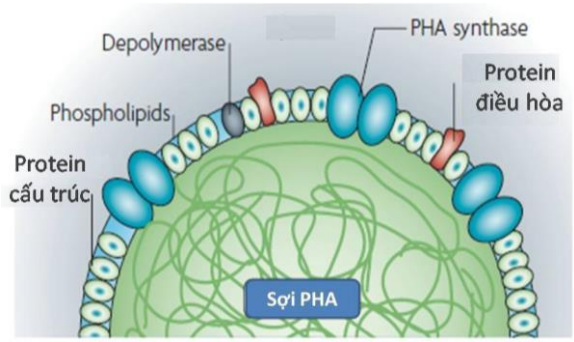


Hình 1.2. Công thức cấu tạo chung của polyhydroxyalkanoates (PHA)

(R có thể là H hoặc các gốc alkyl có số lượng C dao động từ 1-13, x = 1-4, và n = 100 - 30 000)

Trong tự nhiên, PHA được tích lũy chủ yếu ở vi khuẩn dưới dạng các hạt không tan nằm trong tế bào chất. Trong điều kiện môi trường mất cân bằng dinh dưỡng (dư thừa nguồn C và thiếu hụt một trong số các nguồn N, P, S, … thậm chí kể cả oxi), vi khuẩn sẽ chuyển hóa nguồn C nhờ hệ enzyme nội bào để tạo thành các phân tử PHA có khối lượng phân tử cao (10^3 đến 10^4 đơn phân) [112, 123]. Các hạt này đóng vai trò như là nguồn dự trữ C và năng lượng cho tế bào vi khuẩn với kích thước dao động từ 0,2 – 0,5 µm và số lượng hạt dao động từ 5 đến 13 hạt/tế bào. Hạt PHA là một dạng dự trữ C nội bào, song chúng hầu như không làm thay đổi áp suất thẩm thấu kể cả khi tế bào tích lũy với hàm lượng cao [18, 128, 179].

Khi nằm trong tế bào, hạt PHA có thể quan sát được dưới kính hiển vi đối pha bởi tính chất khúc xạ của chúng. Ngoài ra, có thể quan sát được sự có mặt của các hạt PHA trong tế bào nhờ một số loại thuốc nhuộm như Sudan black B hoặc Nile Blue A với những phương pháp riêng biệt. Dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), các hạt PHA trong tế bào hiển thị dưới dạng trong suốt, riêng biệt và có ranh giới rõ ràng với nhau. Cấu trúc hạt PHA bao gồm nhiều phân tử polymer được bao bọc bởi một lớp màng đơn phospholipid, trên đó có gắn các protein đặc hiệu như PHA synthase, depolymerase, các protein cấu trúc, các protein điều hòa, hoặc thậm chí là các protein tế bào chất (hình 1.3) [156]. Sau khi được tách chiết khỏi tế bào, các hạt PHA hoặc vật liệu từ PHA mang các thuộc tính chung như không độc hại, không tan trong nước, có tính tương thích sinh học cao, có khả năng phân hủy nhờ tác nhân sinh học (phần lớn là các vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn), là vật liệu chịu nhiệt và có thể tái sử dụng được.



Hình 1.3. Cấu trúc hạt polyhydroxyalkanoates (PHA) trong tế bào [156]

1.2.2. Các dạng PHA từ vi sinh vật

Hiện nay người ta đã tìm ra khoảng 150 dạng đơn phân được xác định là thành phần cấu trúc nên các PHA. Trên thực tế, các loài vi khuẩn cũng chỉ có khả năng tích lũy một vài loại PHA một cách tự nhiên từ các nguồn C thông dụng mặc dù PHA synthase có khả năng kết hợp nhiều loại đơn phân khác nhau. Chính vì thế nhiều loại PHA chỉ có thể được tạo ra khi bổ sung các tiền chất liên quan vào môi trường dinh dưỡng của vi khuẩn [128].

Dựa vào cấu trúc mạch C tạo nên PHA chúng ta có thể phân chia thành hai loại PHA. *Thứ nhất,* các PHA mạch ngắn (short chain length-PHA, scl-PHA) chứa các đơn phân 3HA với cấu trúc mạch từ 3 đến 5 nguyên tử C. Tiêu biểu cho nhóm này là poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] - loại PHA phổ biến và được nghiên cứu kỹ nhất từ vi khuẩn. *Thứ hai,* các PHA mạch trung bình (medium chain length-PHA, mcl-PHA) chứa các đơn phân 3-HA với cấu trúc mạch từ 6 đến 14 nguyên tử C. Các loại đơn phân phổ biến cấu trúc nên nhóm polymer này gồm 3-hydroxyhexanoate (3HHx), 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxydecanoate (3HD), 3-hydroxydodecanoate (3HDD).

Bên cạnh đó, dựa theo thành phần đơn phân cấu trúc tạo nên bộ khung mạch polymer, người ta có thể phân chia PHA thành hai dạng: (1) PHA đồng phân tử (homopolymer PHA), và (2) PHA dị phân tử (copolymer PHA). Trong đó loại thứ hai có thể được phân chia thành PHA dị hình ngẫu nhiên (ramdom copolymer PHA) và PHA dị hình cố định (block copolymer PHA).

PHA đồng phân tử là các polymer chỉ chứa một loại đơn phân trong cấu trúc. P(3HB) là dạng PHA đồng hình đầu tiên được phát hiện ra và được nghiên cứu kỹ về mặt cấu trúc cũng như các thuộc tính khác [117]. Trong khi đó có rất ít các nghiên cứu liên quan đến các polymer đồng hình khác mà không phải P(3HB). Một số PHA đồng hình đã được tạo ra từ vi sinh vật như P(4HB) [180], P(3HV) [181], P(3HHx) [20], P(3HHp) [20, 199], P(3HO) và P(3HN) [20]…. Song các polymer này vẫn còn chưa được nghiên cứu đầy đủ về các đặc tính. Gần đây, một số tác giả đã thành công trong việc tạo poly(R-3-hydroxyundecanoate) và poly(R-3-

hydroxydecanoate) [41, 200]. Phần lớn các PHA đồng hình này được tạo ra bởi vi sinh vật nhờ quá trình can thiệp di truyền [180, 181] hoặc bởi quá trình nuôi cấy đặc biệt với việc bổ sung các tiền chất tương ứng [20].

PHA dị phân tử là các polymer có thành phần từ hai loại đơn phân trở lên. Các PHA dị hình thu được trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật thường chứa từ 3 và 5 nguyên tử C như poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] [42, 203], poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] [195, 133], poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) [P(3HB-co-3HP)] [66, 131, 203], poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-3HV-co-4HB)] [25, 213]. Nhiều *Pseudomonas* spp. được thông báo có khả năng tích lũy copolymer chứa các đơn phân từ 6 đến 12C như P(3HO-co-3HD) và P(3HHx-co-3HO-co-3HD) khi nuôi cấy trên các nguồn cơ chất alkan có cấu trúc mạch từ 6 đến 12 C [112]. Gần đây, một số phòng thí nghiệm đã thông báo đã thành công trong việc tạo ra được P(3HD-co-3HDD) [46, 121, 200]. Thậm chí terpolymer PHA chứa các đơn phân có cấu trúc mạch từ 3 đến 12 C như P(3HB-co-3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD) cũng đã được tổng hợp một cách tự nhiên nhờ chủng vi khuẩn *Pseudomonas oleovorans* ATCC29347 [169]. Các copolymer thường có các thuộc tính cơ học linh động, hữu ích đối với nhiều ứng dụng khác nhau [41].

Sự sắp xếp của các thành phần (đơn phân) trong mạch polymer sẽ tạo ra các loại copolymer khác nhau. Các PHA chứa các đơn phân không theo trật tự trên mạch polymer bởi hoạt động của các enzyme PHA synthase sẽ tạo nên các copolymer ngẫu nhiên (random copolymer). Phần lớn các copolymer được tạo ra một cách tự nhiên trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn là các copolymer PHA ngẫu nhiên. Bên cạnh đó, sự bổ sung các cơ chất một cách tuần hoàn trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật có thể tạo ra các copolymer với những trật tự sắp xếp xác định, còn gọi là các block copolymer. Chẳng hạn như Pederson và Cs (2006) đã tổng hợp được PHA chứa các block copolymer từ *Cupriavidus necator* bằng cách bổ sung dinh dưỡng xen kẽ giữa fructose và axit pentanoic. Trong đó các đoạn chứa 3HB

được tạo ra trong quá trình sử dụng fructose, còn việc bổ sung pentanoic từng đợt nhỏ đã tạo ra các đơn phân 3HV, từ đó copolymer cố định P(3HB-co-3HV) được tạo thành [142]. Wu và Cs (2008) đã thành công trong việc tạo copolymer cố định với 3 phân đoạn bao gồm P(3HB)-poly(D,L-lactide)-poly(ε-caprolactone) sử dụng tiền chất là các đoạn methyl-P(3HB) phân tử lượng thấp làm tiền chất cho quá trình polymer hóa mở vòng với D,L-lactide và ε-caprolactone [212]. Các can thiệp di truyền tác động vào quá trình trao đổi chất có thể tạo ra các copolymer PHA cố định. Tripathi và Cs (2012) đã tạo ra poly-3-hydroxybutyrate-*block*-3-hydroxyhexanoate P(3HB-*b*-3HHx) khi can thiệp di truyền làm suy yếu con đường β- oxi hóa chủng vi khuẩn *P. putida* KT2442. Diblock copolymer P3HHx-*block*-P(3HD-co-3HDD) được tạo ra khi nuôi cấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* KTQQ20 trên nguồn axit béo khác nhau [192].

1.2.3. Thuộc tính vật lý của PHA

Phần lớn các PHA mang những thuộc tính vật lý tương đồng với các loại nhựa có nguồn gốc dầu mỏ như PP, PE, PS (bảng 1.1). Thuộc tính vật lý của PHA về cơ bản phụ thuộc vào thành phần cấu trúc chuỗi polymer và cấu trúc mạch C của đơn phân tạo nên chúng.

Các PHA với thành phần 3HB cao thường có nhiệt độ nóng chảy cao, song mức độ linh động kém. Trong khi đó sự có mặt của phân đoạn 4HB, 3HV, hoặc các loại 3HA khác giúp tăng tính mềm dẻo và linh động của sản phẩm PHA với giá trị suất đàn hồi (GPa) và mức độ kéo dãn tới hạn (%) tăng lên. Tuy nhiên, thuộc tính nhiệt của các copolymer này có xu hướng giảm khi hàm lượng mol% các HA khác tăng lên [93].

Bảng 1.1. So sánh thuộc tính của một vài loại PHA với các nhựa có nguồn gốc dầu mỏ (nguồn Khanna và Srivastava 2005) [93].

Loại PHA	T_m (°C)	T_g (°C)	Suất đàn hồi (GPa)	Độ bền kéo đứt (MPa)	Mức độ kéo dãn tới hạn (%)
P(3HB)	179	4	3,5	40	5
P(3HB-co-3HV)					
3 mol% 3HV	170	-	2,9	38	-
9 mol% 3HV	162	-	1,9	37	-
14 mol% 3HV	150	-	1,5	35	-
20 mol% 3HV	145	-	1,2	32	-
25 mol% 3HV	137	-	0,7	30	-
P(3HB-co-4HB)					
3 mol% 4HB	166	-	-	28	45
10 mol% 4HB	159	-	-	24	242
16 mol% 4HB	-	-	-	26	444
64 mol% 4HB	50	-	30	17	591
90 mol% 4HB	50	-	100	65	1080
P(4HB)	53	-	149	104	1000
P(3HHx-co-3HO)	61	-	-	10	300
P(3HB-co-6 mol% 3HA)	133	-8	0,2	17	680
P(3HB-co-67 mol% 3HP)	44	-19	-	-	-
P(3HB-co-3HHx)	52	-4	-	20	850
Polypropylene	170	45	1,7	34,5	400
PET	262	3400	2,2	56	7300
Polystyrene	110	21	3,1	50	-
LDPE	130	-30	0,2	10	620

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

1.3.1. Vi khuẩn sinh tổng hợp PHA

PHA đầu tiên được xác định cấu trúc là P(3HB) từ vi khuẩn *Bacillus megaterium* do Lemoigne và Cs vào năm 1926 [117]. Từ đó đến nay số lượng các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA được xác định vào khoảng trên 70 chi [128], tuy nhiên trên thực tế con số này có thể còn lớn hơn nữa. Khả năng tích lũy PHA không chỉ thấy ở các vi khuẩn Gram âm mà còn được phát hiện ở các vi khuẩn Gram dương. Một số vi khuẩn tự dưỡng hiếu khí (vi khuẩn lam) và kị khí (vi khuẩn tía lưu huỳnh và không lưu huỳnh), và một vài vi sinh vật cổ cũng đã được xác định có khả năng sinh tổng hợp PHA [18, 87, 179].

1.3.1.1. Các nhóm vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA

Phần lớn các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA được công bố hiện nay chủ yếu thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm và đa số thuộc nhóm Proteobacteria. Nhóm này được chia thành nhiều nhóm nhỏ khác với nhiều chi thành viên. Trong đó nhóm vi khuẩn thuộc γ-proteobacteria được công bố nhiều nhất với các chi *Pseudomonas, Aeromonas, Halomonas, ...*[47-49]. Hầu hết các vi khuẩn thuộc nhóm này có khả năng sinh tổng hợp mcl-PHA hoặc scl-mcl-PHA trên các nguồn cơ chất khác nhau [71, 193]. Bên cạnh đó, một số loài khác có khả năng sinh tổng hợp mcl-PHA mạnh hơn như *P. putida* mt-2 (NCIMB 10432) có khả năng tích lũy tới 77 %wt trên nguồn cơ chất là octanoic [163].

Alcaligenes và *Cupriavidus* (trước đây được gọi là *Wautersia*) có lẽ là hai chi phổ biến nhất có khả năng sinh tổng hợp PHA được tìm thấy thuộc nhóm β-proteobacteria. Bên cạnh đó, nhiều vi khuẩn thuộc chi *Ralstonia* (trước đây được xếp thuộc vào chi *Pseudomonas*) cũng được công bố có khả năng sinh tổng hợp PHA với các loài như *R. pickettii* 12J, và đặc biệt là *R. eutropha* H16 - chủng vi khuẩn rất phổ biến trong nghiên cứu hiện nay. Ngoài các chi nói trên, nhiều loài thuộc các chi *Comamonas, Candidatus, Burkholderia* cũng đã được công bố có khả năng sinh tổng hợp PHA. Trong công bố mới nhất hiện nay về vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA được phân lập ở vùng cực có sự xuất hiện của nhiều loài thuộc nhóm β-proteobacteria nằm trong các chi như *Antarctic, Iodobacter, Yersinia, Jathinobacterium, Shewwanella* [59]. Phần lớn các vi khuẩn thuộc nhóm β-proteobacteria đều có khả năng sinh mcl-PHA hoặc copolymer scl-mcl PHA [200, 202].

Số lượng các chi vi khuẩn thuộc nhóm α-proteobacteria được công bố về khả năng sinh tổng hợp PHA ít hơn so với hai nhóm vi khuẩn ở trên. Một số chi thuộc nhóm này được công bố có khả năng sinh tổng hợp PHA như *Sphingomonas, Rhodobacter, Roseobacter, Paracoccus, Caulobacter* [91, 127, 147, 196]. Bên cạnh đó, sử dụng các phương pháp sàng lọc gen cũng cho thấy sự có mặt của gen mã hóa PHA synthase ở một số loài thuộc các chi như *Zoogloea, Bosea, Rhizobium, Methylobacterium* [80]. Tuy nhiên số loài đã được công bố có khả năng sinh tổng hợp PHA thuộc các chi này còn rất hạn chế.

Các vi khuẩn Gram dương được công bố có khả năng sinh tổng hợp PHA chủ yếu thuộc các chi sau: *Bacillus, Caryophanon, Clostridium, Corynebacterium, Micrococcus, Microlunatus, Nocardia, Rhodococcus, Staphylococcus,* và thậm chí *Streptomyces* cũng là một chi khá tiềm năng [128, 194]. Trong số các loài được công bố thì chi *Bacillus* cho thấy chiếm tỷ lệ khá lớn so với các chi khác [53, 136, 161, 163]. Phần lớn các vi khuẩn Gram dương thường chỉ sinh tổng hợp các scl-PHA và hàm lượng tích lũy trong tế bào thường thấp hơn so với vi khuẩn Gram âm. Đây có lẽ là lí do giải thích tại sao chúng ít được quan tâm trong quá trình sản xuất thương mại.

Các vi sinh vật ưa mặn (halophilic microorganisms) bao gồm cả vi khuẩn ưa mặn (halophilic bacteria) và vi sinh vật cổ ưa mặn (halophilic archaea) là nhóm sản xuất PHA tiềm năng được nhiều nhà khoa học quan tâm. Nhiều chủng vi khuẩn ưa mặn thuộc chi *Halomonas* như *Halomonas* sp. O-1, *H. elongata* DSM 2581, *H. campaniensis* LS21, *H. boliviensis* LC1 cũng đã được công bố có khả năng sinh tổng hợp PHA [83, 149, 219]. Trong khi đó vi sinh vật cổ ưa mặn có khả năng sinh tổng hợp PHA chủ yếu nằm trong họ *Halobacteriaceae*. Điển hình và được công bố sớm nhất là loài *Haloferax mediterranei* có khả năng tích lũy PHA tới 65 %wt khi nuôi cấy trên nguồn tinh bột hoặc glucose trong điều kiện giới hạn P [58]. Bên cạnh đó một số loài thuộc các chi *Halalkalicoccus, Haloarcula, Halobacterium, Halobiforma, Halococcus, Halopiger, Haloquadratum, Halorhabdus, Halorubrum, Halostagnicola, Haloterrigena, Natrialba, Natrinema, Natronobacterium, Natronococcus, Natronomonas,* và *Natronorubrum* cũng đã được công bố về khả năng sinh tổng hợp PHA [75]. Khả năng sinh trưởng trong điều kiện nồng độ muối cao là một lợi thế trong quá trình sản xuất PHA của các vi khuẩn ưa mặn bởi việc giảm chi phí khử trùng môi trường và thiết bị. Ngoài ra, quy trình thu hồi sản phẩm có thể trở nên dễ dàng hơn nhờ hiện tượng sốc thẩm thấu khi xử lý tế bào với nước loại muối có thể giảm đến 40 % chi phí thu hồi [44].

Để có thể sản xuất PHA ở quy mô công nghiệp, các chủng sản xuất cần phải được cải tiến để nhằm giúp đạt mật độ tế bào cao trong thời gian nuôi cấy ngắn và tích lũy PHA với hàm lượng cao từ các cơ chất rẻ tiền, đơn giản [163]. Các kỹ thuật

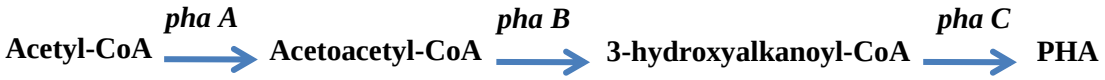
ban đầu được sử dụng nhằm cải thiện khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng sản xuất là chuyển các gen mã hóa enzyme tham gia vào quá trình trao đổi chất nhằm gián tiếp tác động đến quá trình sinh tổng hợp PHA của vi khuẩn. Một số chủng vi khuẩn được cải biến từ *Ralstonia eutropha* đã được tạo ra nhằm cải thiện khả năng sản xuất PHA cũng như điều khiển thành phần đơn phân trong PHA. Fukui và Cs (2002) đã tiến hành đưa gen mã hóa crotonyl-coenzyme A (CoA) reductase từ *Streptomyces cinnamonensis*, PHA synthase và (R)-specific enoyl-CoA hydratase từ *Aeromonas caviae* vào chủng dại *R. eutropha* có khả năng sinh tổng hợp PHA. Kết quả cho thấy chủng được cải biến di truyền mới tạo ra có khả năng sinh tổng hợp P(3HB-co-3HHx) với thành phần 3HHx là 1,5 mol% trên nguồn fructose [65]. Loo và Cs (2005) đã tạo dòng đột biến gắn gen PHA synthase từ *Aeromonas caviae* vào *Wautersia eutropha* có khả năng tích lũy P(3HB-co-3HHx) tới 87% với hàm lượng 3HHx đạt 5 mol% khi sử dụng nguồn dầu cọ [122].

Bên cạnh đó, việc tạo các chủng tái tổ hợp mang gen mã hóa enzyme xúc tác quá trình tổng hợp PHA đã được tiến hành. Chủng sản xuất tự nhiên thường có những điểm bất lợi trong quá trình ứng dụng vào sản xuất như: tốc độ sinh trưởng thấp, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu thấp, có các con đường phân hủy PHA nội bào. Trong khi đó các chủng vi khuẩn tái tổ hợp có thể giải quyết được vấn đề này khi chúng chỉ có quá trình sản xuất mà không có hệ enzyme phân giải PHA. Một trong những xu hướng hiện nay là sử dụng các chủng *E. coli* tái tổ hợp trong sản xuất PHA. Tổng hợp PHA bởi các chủng *E. coli* tái tổ hợp thường không yêu cầu giới hạn yếu tố dinh dưỡng đặc hiệu. Ưu điểm khi sử dụng *E. coli* trong sản xuất PHA là tốc độ sinh trưởng nhanh, mật độ tế bào cao, có khả năng sử dụng một vài nguồn C rẻ tiền, và dễ dàng trong quá trình tinh sạch sản phẩm. Chẳng hạn, chủng tái tổ hợp *E. coli* có khả năng sinh trưởng mạnh ở nhiệt độ cao, dễ dàng phá vỡ tế bào do đó giúp giảm giá thành sản phẩm thông qua giảm chi phí lên men và tinh sạch PHA [129]. Genser và Cs (1998), Choi và Cs (1998) đã tạo chủng tái *E. coli* tái tổ hợp mang gen tổng hợp PHA (phaCAB$_{Al}$ và phaCAB_{Cn}) có khả năng sinh tổng hợp lượng PHB cao hơn so với chủng gốc *C. necator* H16 [43, 68]. Bên cạnh đó,

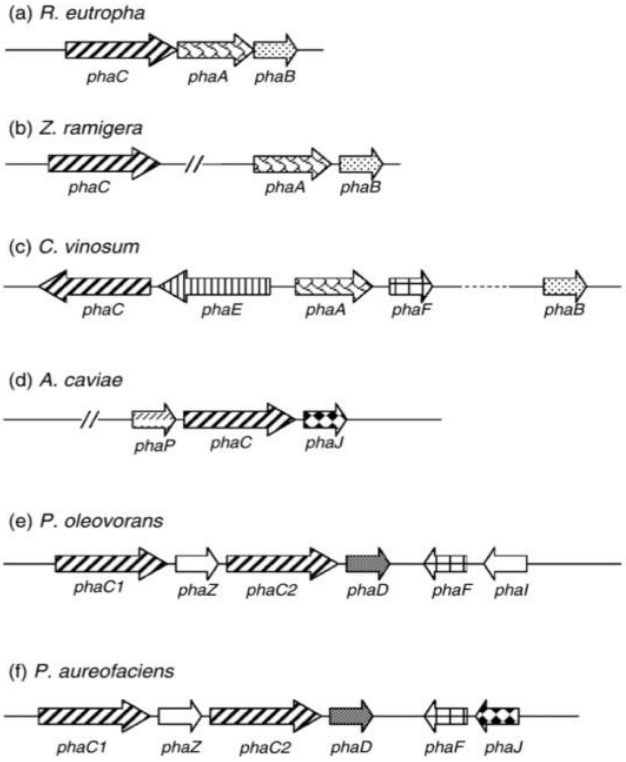
P(3HB-co-3HV) cũng đã được tổng hợp từ chủng *E. coli* tái tổ hợp [171, 208, 216]. Các mcl-PHA cũng đã được sản xuất nhờ chủng *E. coli* tái tổ hợp lần đầu tiên vào năm 1997 [109].

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

Quá trình sinh tổng hợp PHA ở các vi khuẩn có thể được diễn ra theo nhiều con đường khác nhau, song đều phải trải qua giai đoạn chuyển hóa vật chất cuối cùng với sự góp mặt của 3 loại enzyme chính 3-thioketolase (mã hóa bởi gen *pha*A), acetoacetyl-CoA reductase (mã hóa bởi gen *pha*B), và PHA synthase (mã hóa bởi gen *pha*C) theo sơ đồ sau:



Các gen mã hóa các enzyme chính tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PHA ở vi sinh vật thường tập hợp thành cụm trên vật chất di truyền và được gọi là operon *pha*. Tùy theo thành phần và cấu trúc (hay cách sắp xếp) của các gen mã hóa enzyme trong operon sẽ quyết định cấu trúc sản phẩm cũng như chất lượng PHA được tạo ra. Cấu trúc của các operon *pha* từ vi khuẩn được thể hiện trong hình 1.4.



Hình 1.4. Mô hình cấu trúc các operon pha (Nguồn Suriyamongkol và Cs, 2007) [185]

Bảng 1.2. Phân loại PHA synthase dựa theo cấu trúc và đặc hiệu cơ chất [155]

Nhóm	Tiểu phần	Loài vi khuẩn	Cơ chất đặc hiệu
I	Pha C ~ 60-73 kDa	*Cupriavidus necator*	$3HA_{SCL}$ – CoA (~C3-C5) $4HA_{SCL}$ – CoA, $5HA_{SCL}$ – CoA, $3MA_{SCL}$ - CoA
II	Pha C ~ 60-65 kDa	*Pseudomonas aeruginosa*	$3HA_{MCL}$ – CoA (~≥C5)
III	Pha C Pha E ~ 40 kDa ~ 40 kDa	*Allochromatum vinosum*	$3HA_{SCL}$ – CoA ($3HA_{MCL}$ – CoA [~C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	Pha C Pha E ~ 40 kDa ~ 22 kDa	*Bacillus megaterium*	$3HA_{SCL}$ - CoA

Mặc dù quá trình sinh tổng hợp PHA là kết quả của một tổ hợp các enzyme khác nhau, tuy nhiên thành phần và cấu trúc phân tử của PHA synthase sẽ quyết định loại đơn phân nào được sử dụng trong quá trình trùng hợp và do đó quyết định loại PHA được tạo ra [155]. Ngày nay, có khoảng hơn 40 gen cấu trúc của PHA synthase từ các vi khuẩn Gram dương và Gram âm cũng như *Cyanobacteria* đã được tách dòng, trong đó trình tự của khoảng 30 gen đã được xác định [154]. Dựa trên cấu trúc bậc 1 và thành phần tiểu phần cấu tạo enzyme và đặc biệt là sự đặc hiệu cơ chất mà PHA synthase có thể được phân ra thành 4 nhóm khác nhau (bảng 1.2).

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

Quá trình sinh tổng hợp PHA có thể được tiến hành theo nhiều con đường khác nhau và chịu sự tác động trực tiếp hoặc gián tiếp của nhiều loại enzyme liên quan trong chuỗi trao đổi chất nội bào. Tuy nhiên việc sử dụng con đường sinh tổng hợp PHA nào lại chịu ảnh hưởng chi phối chủ yếu bởi nguồn C có mặt trong môi trường tại thời điểm đó. Chính vì vậy có một mối liên hệ khá chặt chẽ giữa nguồn C với các con đường sinh tổng hợp PHA và sản phẩm PHA được tạo ra trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn (hình 1.5). Các nguồn C có thể được vi khuẩn sử dụng trong sinh tổng hợp PHA có thể được liệt kê vào ba nhóm chính: (1) cacbohydrate, (2) triacylglycerol, và (3) hydrocacbon.

Cacbohydrate (bao gồm monosaccharide, disaccharide, polysaccharide) đều

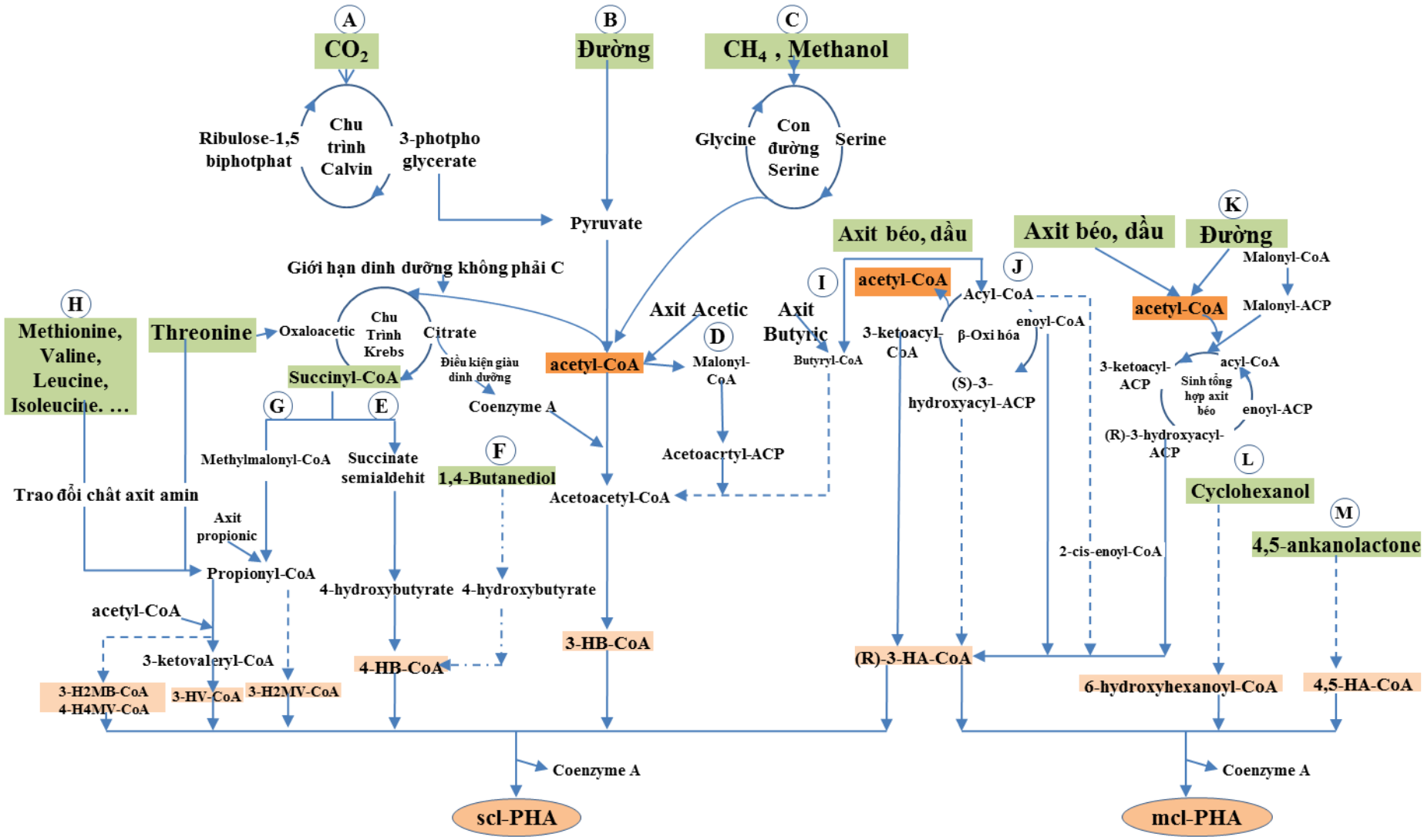
cần phải chuyển hóa thành đường đơn trước khi được tế bào sử dụng cho các quá trình trao đổi chất (bao gồm cả quá trình sinh tổng hợp PHA). Trong tế bào glucose được chuyển hóa chủ yếu theo con đường đường phân để tạo ra axit pyruvic như là sản phẩm trung gian, đây chính là tiền chất cơ bản để tạo ra acetyl – CoA phục vụ cho chuỗi phản ứng tổng hợp PHA. Sự chuyển hóa pyruvic thành các hợp chất tiền thân cho sinh tổng hợp polymer được thực hiện theo các con đường khác nhau phụ thuộc vào hệ enzyme của mỗi loài vi sinh vật. Theo các con đường này, sản phẩm poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) được tạo ra là chủ yếu (con đường B – hình 1.5). Khả năng biến đổi cacbohydrate theo con đường này được thấy ở một số vi khuẩn cơ bản như *Aeromonas hydrophila, Pseudomonas stutzeri, Ralstonia eutropha, Pseudomonas oleovorans* [184].

Nhiều vi khuẩn thuộc nhóm giả khuẩn thể (Pseudomonad) như *P. putida, P. citronellolis* có khả năng chuyển hóa các hợp chất cacbohydrate thành mcl-PHA hoặc copolymer giữa 3HB với 3HHx hoặc 3HO (con đường D, K – hình 1.5). Nghiên cứu của Anderson và Dawes (1990) đã cho thấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. NCIMB 40135 có khả năng sinh tổng hợp copolymer của 3HB với các 3HA khác (3HHx, 3HD, 3HDD) từ nguồn glucose [18]. Khả năng sinh tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-*co*-3HV)] trên nguồn cacbohydrate ở một số vi khuẩn cũng đã được báo cáo [78, 106, 153]. Con đường này liên quan đến sinh tổng hợp một số loại axit amin như asparagine, aspartate, isoleucine, lysine, methionine, threonine. Theo con đường này, acetyl-CoA được chuyển hóa thành 3-ketovaleryl-CoA, nguyên liệu tạo nên phân đoạn 3HV, thông qua một loạt các phản ứng trao đổi chất với sự tham gia của quá trình sinh tổng hợp axit amin (con đường G, H - hình 1.5). Trong khi đó sản phẩm poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-*co*-4HB)] cũng có thể được vi khuẩn tạo ra trong quá trình sử dụng cacbohydrate (con đường E, F – hình 1.5). Kết hợp các gen liên quan đến quá trình phân giải succinate từ *Clostridium kluyveri* và gen liên quan đến sinh tổng hợp PHA từ *Ralstonia eutropha* trong chủng tái tổ hợp *E. coli,* Valentin và Dennis (1997) đã thu được sản phẩm P(3HB-co-4HB) khi nuôi cấy chủng vi khuẩn này trên nguồn glucose [195].

Triacylglycerol là thành phần chính có trong dầu thực vật và mỡ động vật. Cấu trúc chung của triacylglycerol gồm ba phân tử axit béo liên kết với một phân tử glycerol. Các triacylglycerol có thể được sử dụng một cách trực tiếp hoặc gián tiếp tùy thuộc vào hệ enzyme ngoại bào của các vi khuẩn. Khi được hấp thu vào tế bào, chúng có thể được biến đổi theo một số quá trình trao đổi chất (β- oxi hóa, tổng hợp axit béo) để tạo các hợp chất tiền thân cho quá trình sinh tổng hợp PHA (con đường I, J, K – hình 1.5). Sản phẩm mcl-PHA hoặc copolymer của 3HB và 3HHx có thể được tạo ra theo con đường này bởi một số loài vi khuẩn như *Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila* khi sử dụng axit béo hoặc dầu thực vật [41].

Hydrocacbon có thể được nhiều vi khuẩn sử dụng để sinh tổng hợp PHA. *Pseudomonas oleovorans* là vi khuẩn đầu tiên được phát hiện có khả năng sinh trưởng trên nguồn octane và tích lũy PHA [89]. Các hydrocacbon hoặc dẫn xuất hydrocacbon có thể được sử dụng cho sinh tổng hợp PHA thông qua nhiều con đường khác nhau. Methan là nguồn hydrocacbon tiềm năng có thể được sử dụng thông qua chu trình serine để đi vào chuỗi chuyển hóa vật chất tạo PHA (con đường C – hình 1.5). Một số vi khuẩn đã được thông báo có khả năng sinh tổng hợp PHA theo con đường này như *Methylobacterium extorquens* AM1, *Methylocystis* sp. GB 25 DSM 7674 [103, 140, 206]. Trong khi các dẫn xuất khác của hydrocacbon có thể được sử dụng và biến đổi một cách trực tiếp nhờ hệ enzyme nội bào của vi khuẩn để tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PHA (con đường L, M – hình 1.5).

Ngoài ra, cacbon dioxit (CO_2) là một nguồn C dồi dào trên trái đất và được các sinh vật tự dưỡng sử dụng như là nguồn C trong quá trình sinh trưởng thông qua quá trình quang hợp. Sử dụng CO_2 cho sinh tổng hợp PHA bởi một số vi khuẩn (chủng dại hoặc tái tổ hợp) cũng đã được công bố với sản phẩm chủ yếu là P(3HB) [13, 87, 165]. Quá trình sinh tổng hợp PHA từ nguồn CO_2 ở các vi khuẩn này được tiến hành dựa trên chu trình Calvin kết hợp với hệ enzyme liên quan (*pha*A, *pha*B, *pha*C). Theo con đường này, 3-photphoglycerate (sản phẩm trung gian của chu trình Calvin) sẽ được sử dụng để chuyển thành pyruvate làm nguyên liệu cho quá trình sinh tổng hợp P(3HB) (con đường A - hình 1.5).



Hình 1.5. Các con đường sinh tổng hợp PHA ở vi sinh vật (Nguồn Tan và Cs, 2014) [190]

1.4. Sản xuất PHA từ vi khuẩn

Các công bố hiện nay cho biết có hai hình thức sản xuất PHA: (1) polymer hóa các đơn phân hydroxyalkanoic (HA) trong điều kiện *in vitro* nhờ xúc tác của PHA polymerase, và (2) sản xuất PHA thông qua quá trình lên men từ vi sinh vật. Sản xuất PHA trong điều kiện *in vitro* đã được Qi và Cs (2000) tiến hành dựa trên hệ thống hai enzyme (acyl-CoA synthetase và PHA synthase) trên cơ chất (R,S)-3 hydroxydecanoyl-CoA và thu được poly(3-hydroxydecanoate) *in vitro* với M_w đạt $9{,}8.10^4$ g/mol [148]. Gerngross và Martin (1995) khi sử dụng phương pháp enzyme kết hợp với hóa học để tổng hợp hạt P(3HB) trong điều kiện *in vitro* đã tạo ra hạt có kích thước 3 µm (trong khi kích thước hạt trung bình trong tế bào khoảng 0,5 µm) với M_w trên 10 x 10^6 Da. Hệ thống tổng hợp *in vitro* có thể điều chỉnh được M_w của polymer nhờ vào nồng độ PHA synthase ban đầu [69], hay cho phép tạo các block-copolymer hay copolymer ngẫu nhiên bằng cách bổ sung một cách tuần tự hay hỗn hợp các cơ chất khác nhau [187]. Sinh tổng hợp PHA *in vitro* có những ưu điểm so với tổng hợp *in vivo* như có thể điều chỉnh thành phần đơn phân nhờ việc bổ sung tiền chất PHA và cofactor. Bên cạnh đó việc thu hồi PHA dễ dàng hơn nhiều so với phương pháp tách chiết từ tế bào. Tuy nhiên, việc tái sử dụng các cofactor là một vấn đề khó khăn và chi phí cao.

Quá trình sản xuất PHA từ vi sinh vật được tiến hành thông qua hai giai đoạn chủ yếu sau: (1) lên men thu sinh khối vi sinh vật chứa polymer, và (2) tách chiết – thu hồi sản phẩm PHA từ sinh khối vi sinh vật.

1.4.1. Lên men sản xuất PHA từ vi khuẩn

Vi sinh vật sinh tổng hợp PHA có thể chia một cách đơn giản thành hai nhóm dựa trên yêu cầu về điều kiện nuôi cấy tích lũy. Nhóm thứ nhất, cần phải có sự hạn chế của một yếu tố dinh dưỡng chủ yếu như N, P, Mg, hoặc S và khi nguồn C dư thừa trong quá trình nuôi cấy. Các vi khuẩn thuộc nhóm này có thể kể đến một số chủng vi khuẩn *Alcaligenes eutrophus* (hay còn gọi là *Ralstonia eutropha, Cupriavidus necator*), *Protomonas extorquens,* và *Protomonas oleovorans.* Nhóm thứ hai, không cần phải có sự giới hạn về mặt dinh dưỡng trong quá trình tổng hợp PHA. Đại diện cho nhóm này

gồm có *Alcaligenes latus, Clostridium botulinum,* chủng đột biến *Azotobacter vinelandii,* và chủng *E. coli* tái tổ hợp [62, 93, 141]. Tuy nhiên, việc giới hạn nguồn N vẫn làm tăng khả năng sản xuất PHA đối với *A. latus* so với quá trình tích lũy đồng thời với quá trình sinh trưởng [73]. Do đó việc lựa chọn hình thức lên men trong quá trình sản xuất PHA là vô cùng quan trọng nhằm đạt được hiệu quả sản xuất cao nhất. Hiện nay, công nghệ lên men chìm được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu và sản xuất PHA. Các công nghệ lên men chìm chủ yếu hiện nay bao gồm: (1) lên men mẻ, (2) lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng, và (3) lên men liên tục. Trong 3 phương pháp lên men này thì phương pháp lên men mẻ và lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng thường hay được sử dụng trong nghiên cứu cũng như sản xuất PHA từ vi khuẩn.

1.4.1.1. Sản xuất PHA theo phương pháp lên men mẻ (batch fermentation)

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 khuẩn phù hợp cho tích lũy PHA. Việc thiết kế môi trường cho lên men mẻ cũng dễ dàng hơn, bao gồm một yếu tố dinh dưỡng (nguồn N hoặc P hoặc S,...) cần thiết cho sinh trưởng của vi khuẩn được giới hạn ở nồng độ thấp trong khi các nguồn dinh dưỡng khác (đặc biệt là nguồn C) được sử dụng dư thừa. Tùy thuộc vào vi sinh vật và nguồn cơ chất mà thời gian tiến hành lên men thường là 24 đến 48h. Trong lên men mẻ, vi khuẩn trải qua tất cả các pha bao gồm: pha tiềm phát, pha sinh trưởng cấp số, pha tích lũy PHA, pha cân bằng, pha suy vong. Sự thay đổi liên tục của môi trường (đặc biệt là nồng độ các chất dinh dưỡng giảm sút) do quá trình trao đổi chất của vi khuẩn thường khiến cho sinh khối thu được trong lên men mẻ không cao. Bên cạnh đó, hiệu suất tích lũy PHA khó đạt cực đại do sự phân hủy PHA nội bào trong điều kiện thiếu hụt nguồn C đối với các chủng dại.

Ảnh hưởng của nguồn C, mối liên hệ giữa các nguồn dinh dưỡng trong môi trường, và các tiền chất đến quá trình sản xuất PHA của chủng vi khuẩn *Pseudomonas oleovorans* đã được Durner và Cs (2000) xác định [61]. Việc bổ sung các axit béo bay hơi (VFA) khác nhau cũng như thời gian bổ sung trong nuôi cấy

mẻ có ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA bởi *Ralstonia eutropha* JMP 134 cũng đã được ghi nhận [26]. Các thông số nuôi cấy cơ bản tối thích cho sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. Ti3 đã được xác định khi sử dụng hình thức lên men mẻ. Áp dụng các thông số tối thích này trong quá trình lên men mẻ chủng vi khuẩn này giúp tăng hiệu suất tạo PHA cũng như mức độ tích lũy PHA lên tương ứng 1,7 và 1,2 lần so với ban đầu [84]. Kết quả tương tự với mức độ sản xuất P(3HB) của chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* SW1-2 khi được tối ưu hóa các thông số nguồn N, nguồn C và phốt phát tăng 1,8 lần so với việc nuôi cấy trên môi trường cơ sở [28].

1.4.1.2. Sản xuất PHA theo phương pháp lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng (fed-batch fermentation)

Lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng là một hình thức thường được sử dụng trong quá trình nghiên cứu sản xuất PHA hiện nay. Trong kỹ thuật lên men này, một hoặc nhiều chất dinh dưỡng được bổ sung vào môi trường trong quá trình tiến hành lên men, và sản phẩm chỉ được thu hồi khi quá tình lên men kết thúc. So với nuôi cấy mẻ, pha sinh trưởng cấp số của vi sinh vật trong lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng được kéo dài hơn bởi việc đảm bảo yếu tố dinh dưỡng được cung cấp một cách thường xuyên, chính vì vậy mật độ tế bào thu được thường đạt cao hơn so với trong lên men mẻ. Bên cạnh đó, nguồn C cũng được cung cấp luôn ở mức dư thừa trong giai đoạn tích lũy nên hàm lượng PHA trong tế bào thường đạt mức cao hơn trong lên men mẻ, qua đó hiệu quả sản xuất đạt được trong lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng được nâng cao.

Quy trình lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng thường được áp dụng trong quá trình sản xuất sử dụng các chủng vi khuẩn thuộc nhóm đầu tiên (tích lũy PHA khi bị giới hạn một nhân tố dinh dưỡng nào đó). Theo đó phương pháp lên men hai giai đoạn (two-stage fermentation) thường được sử dụng trong quá trình sản xuất. Trong giai đoạn đầu, sinh khối của chủng sản xuất sẽ tăng nhanh chóng do được nuôi cấy trong điều kiện môi trường cân bằng (không bị giới hạn dinh dưỡng). Khi sinh khối tăng đến giới hạn nhất định thì việc bổ sung dinh dưỡng với sự giới hạn

một nhân tố cần thiết nào đó sẽ kích thích sự tích lũy PHA trong điều kiện nguồn C dư thừa. Lúc này mật độ tế bào hầu như giữ nguyên, sự tăng mật độ (độ hấp phụ ở bước sóng λ_{600nm} hoặc tăng sinh khối khô) nếu có chỉ là kích thước và khối lượng tế bào tăng lên do việc tích lũy PHA nội bào gây ra. Để quá trình sản xuất PHA đạt năng suất cao thì hỗn hợp nguồn C và nguồn dinh dưỡng cần giới hạn phải được bổ sung với tỉ lệ tối ưu. *A. eutrophus* đã được nghiên cứu rộng rãi do khả năng tích lũy P(3HB) với hàm lượng cao trên các nguồn C đơn giản như glucose, fructose và axit acetic [90, 95, 96]. Hãng Imperial Chemical Industries (Anh) đã sản xuất P(3HB) ở quy mô công nghiệp từ nguồn glucose, và P(3HB-co-3HV) từ hỗn hợp glucose và axit propionic bằng phương pháp lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng sử dụng chủng *A. eutrophus*. Ban đầu các tế bào được sinh trưởng trên môi trường khoáng glucose có chứa một lượng phốt phát nhất định để thu được lượng tế bào mong muốn. Sau đó, khi tế bào gặp điều kiện giới hạn phốt phát và được bổ sung glucose dư thừa ở thời điểm khoảng 40 h đến 60 h sẽ tiến hành tích lũy P(3HB). Trong suốt quá trình nuôi cấy, nồng độ glucose được duy trì ở mức 10 g/L đến 20 g/L, kết quả thu được ở tại thời điểm 50 h hàm lượng tế bào khô, hàm lượng P(3HB) và % P(3HB) đạt 164 g/L, 121 g/L và 76 %, năng suất tạo P(3HB) đạt 2,42 g/L/h [35].

Đối với các giống sản xuất thuộc nhóm thứ hai, chiến lược bổ sung dinh dưỡng là rất quan trọng để đạt được hiệu suất PHA cao. Các nguồn N hỗn hợp như nước ngâm ngô (corn steep liquor), cao men, hoặc pepton từ cá (fish peptone) có thể được bổ sung nhằm nâng cao khả năng sinh trưởng cũng như mức độ tích lũy polymer bởi quá trình sinh tổng hợp PHA ở các vi khuẩn này không phụ thuộc vào sự hạn chế nguồn dinh dưỡng [113]. Chính vì thế trong lên men sản xuất, quá trình sinh trưởng của tế bào và quá trình tích lũy PHA cần phải cân bằng nhằm tránh tình trạng tích lũy PHA không hoàn toàn hoặc dừng quá trình lên men sớm khi mật độ tế bào còn thấp. *A. latus* đại diện cho nhóm vi sinh vật thứ hai có khả năng tích lũy PHA trong quá trình sinh trưởng mà không cần yếu tố giới hạn dinh dưỡng. Trong điều kiện cân bằng dinh dưỡng, chủng *A. latus* có khả năng tích lũy P(3HB) đạt 50 %wt. Khi tiến hành lên men mẻ với điều kiện giới hạn nguồn N, khả năng tích lũy

P(3HB) của chủng này tăng lên tới 80%. Kết quả thu được còn khả quan hơn khi tiến hành sản xuất theo quy trình lên men mẻ có bổ sung dinh dưỡng. Khi lượng tế bào khô đạt 76 g/L, nguồn N trong môi trường được giới hạn trong khi hàm lượng saccharose được giữ ở mức 5 g/L đến 20 g/L. Sau 8h giới hạn nguồn N, các kết quả thu được như sau: CDW – 111,7 g/L; hàm lượng P(3HB) – 98,7 g/L; và %P(3HB) – 88 % với năng suất đạt 4,94 g/L/h. Năng suất cao nhất ghi nhận được đạt 5,13 g/L/h tại thời điểm 16 h khi điều kiện giới hạn dinh dưỡng xảy ra [197]. Mô hình nuôi cấy sử dụng cơ chế bổ sung dinh dưỡng được điều khiển dựa trên nguồn saccharose đã được Yamane và Cs (1996) thiết kế. Trong nghiên cứu này, nồng độ tế bào (142 g/L) và P(3HB) (68,4 g/L) cao trong dịch nuôi cấy đã đạt được với thời gian nuôi cấy ngắn (18 h), tuy nhiên hàm lượng PHB tích lũy nội bào đạt thấp (50 %wt) [214].

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

Quá trình tích lũy PHA nội bào ở vi sinh vật xảy ra trong những điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng. 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.

Lên men liên tục cũng đã được nghiên cứu sử dụng trong sản xuất PHA. Mô hình lên men liên tục có thể được thực hiện qua hai (two-stage) hoặc nhiều giai đoạn (multi-stage) lên men. Trong giai đoạn đầu tiên (nồi lên men đầu), chủng giống sản xuất được nuôi cấy trong điều kiện môi trường dinh dưỡng cân bằng tạo điều kiện cho tế bào sinh trưởng tối đa. Các giai đoạn sau (các nồi lên men kế tiếp), môi trường mất cân bằng dinh dưỡng được sử dụng nhằm tạo điều kiện cho việc tích lũy PHA. Mô hình này đã được Du và Cs (2001) sử dụng trong quá trình sản xuất P(3HB) từ chủng vi khuẩn *R. eutropha* WSH3. Ở pha đầu, vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường chứa glucose và đạt khối lượng tế bào khô cực đại 27,1 g/L. Khi chuyển sang pha thứ hai, 47,6g/L P(3HB) được tích lũy với hàm lượng P(3HB) đạt 72,1 %wt [59]. Mô hình lên men liên tục sản xuất P(3HB) dựa trên dãy các thiết

bị lên men liên tiếp đã được A. Atlíc và Cs (2011) áp dụng đối với chủng vi khuẩn *Cupriavidus necator* DSM 545. Quá trình lên men được tiến hành một cách liên tục trên dãy các nồi lên men liên tiếp, trong đó nồi lên men đầu tiên chứa môi trường cân bằng dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của chủng giống. Khi đó, giống vi khuẩn liên tục được cung cấp cho các bình lên men tiếp theo, nơi môi trường lên men giới hạn nguồn N, để thực hiện tích lũy P(3HB). Kết quả của nghiên cứu đã đạt sức sản xuất 1,85 g/L/h và 0,1 g/g/h với hàm lượng P(3HB) đạt 77 %wt [24].

1.4.2. Tách chiết – thu hồi PHA từ sinh khối vi khuẩn

Sau quá trình lên men, sinh khối vi sinh vật chứa các hạt PHA được thu nhận nhờ phương pháp ly tâm hoặc dùng siêu lọc. Thu nhận sinh khối bằng phương pháp ly tâm thường được tiến hành ở quy mô phòng thí nghiệm do thiết bị phức tạp và hiệu suất thấp. Trong khi sử dụng phương pháp siêu lọc có thể được thực hiện với thể tích lớn, đơn giản và hiệu suất cao hơn. Bên cạnh đó, sinh khối thu được bằng siêu lọc có thể loại bỏ được các thành phần dinh dưỡng và muối khoáng còn dư thừa trong môi trường nuôi cấy. Sinh khối sau khi thu được sẽ được tách chiết để thu các hạt PHA. Có nhiều phương pháp có thể được sử dụng để tách chiết các hạt PHA. Các phương pháp này đều có các thuận lợi và khó khăn riêng và được trình bày tóm tắt ở bảng 1.3. Trong đó, hai nhóm phương pháp (1) sử dụng dung môi hữu cơ và (2) thủy phân các thành phần tế bào không phải polymer được sử dụng nhiều trong nghiên cứu và sản xuất PHA.

1.4.2.1. Tách chiết – thu hồi PHA nhờ sử dụng dung môi hữu cơ

Thu nhận PHA từ sinh khối tế bào vi khuẩn nhờ dung môi hữu cơ là phương pháp được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu trong nhiều năm qua. Sử dụng dung môi trong tách chiết PHA được mô tả lần đầu bởi Lemoigne (1923-1951) và Baptist (1967) trên các đối tượng *Bacillus megaterium* và *Rhodospirillum rubum* [86]. Phương pháp này thường được sử dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm bởi tính đơn giản và nhanh chóng của chúng. Nguyên lý của phương pháp này bao gồm hai bước cơ bản: (1) tính thấm của màng tế bào vi khuẩn bị biến đổi do đó cho phép các hạt polymer có thể giải phóng và hòa tan trong dung môi, và (2) quá trình kết tủa các phân tử PHA trong một dung môi khác.

Bảng 1.3. Ưu điểm và nhược điểm của các phương pháp tách chiết–thu hồi PHA [86]

Phương pháp	**Ưu điểm**	**Nhược điểm**
Sử dụng dung môi	Loại bỏ được các endotoxin. Độ tinh sạch cao. Không gây sự phá hủy polymer	Có thể gây phá vỡ trạng thái hạt polymer Giá thành cao và nguy cơ gây ô nhiễm môi trường lớn Hiệu quả thu hồi thấp
Sử dụng chất hoạt động bề mặt	Xử lý được với mật độ tế bào cao. Không gây phá hủy polymer	Độ tinh sạch thấp Cần loại bỏ chất hoạt động bề mặt trong nước thải
Sử dụng NaOCl	Độ tinh sạch cao	Gây phá hủy sản phẩm polymer
Kết hợp NaOCl – chloroform	Độ tinh sạch cao Mức độ phá hủy sản phẩm thấp	Lượng dung môi cần sử dụng nhiều
Kết hợp NaOCl – Chất hoạt động bề mặt	Hạn chế sự phá hủy sản phẩm polymer Chi phí vận hành thấp	Cần loại bỏ chất hoạt động bề mặt và NaOCl khỏi nước thải
Kết hợp Chelate – Chất hoạt động bề mặt	Độ tinh sạch cao Nguy cơ ô nhiễm môi trường thấp	Tạo ra lượng nước thải lớn
Hòa tan có chọn lọc các thành phần không phải PHA nhờ proton	Hiệu quả thu hồi và độ tinh sạch cao Chi phí vận hành thấp	Có sự giảm phân tử khối nếu các thông số không được kiểm soát nghiên ngặt
Sử dụng enzyme	Hiệu quả thu hồi cao	Mức độ tinh sạch thấp Giá thành cao
Nghiền bằng hạt	Không sử dụng hóa chất	Cần thực hiện nhiều lần
Đồng hóa nhờ áp suất	Không sử dụng hóa chất	Mức độ phá vỡ tế bào thấp khi mật độ tế bào loãng
Phương pháp dòng siêu tới hạn	Giá thành thấp Ít độc hại	Hiệu quả thu hồi thấp
Phương pháp làm suy yếu tế bào	Sử dụng các điều kiện tách chiết nhẹ nhàng	Hiệu quả thu hồi thấp

Các dung môi phổ biến hiện nay được sử dụng trong quá trình thu hồi phần lớn là các dẫn xuất chlo của hydrocacbon (chloroform; 1,2-dichloroethan) hoặc các hợp chất cacbonate dạng vòng (ethylene cacbonate; 1,2-propylene cacbonate) [151]. Bên cạnh đó, các hợp chất ketone mạch ngắn (acetone, ethyl ketone, methyl isobutyl ketone, ethyl acetate, butyl acetate) có thể được dùng như là các dung môi không phải dẫn xuất halogen có hiệu quả cao khi được sử dụng trong thu hồi các mcl-PHA [157]. Quá trình kết tủa PHA thường được gây ra bởi các dung môi như methanol hoặc ethanol.

Sử dụng dung môi trong tách chiết PHA cho mức độ tinh sạch của sản phẩm cao hơn so với các phương pháp khác. Bên cạnh đó phương pháp này còn giúp việc loại bỏ các endotoxin có mặt trong sinh khối tế bào vi khuẩn cũng như ít gây nên sự phá hủy đối với cấu trúc polymer, do đó đảm bảo tính toàn vẹn của sản phẩm PHA với khối lượng phân tử cao thích hợp với nhiều ứng dụng đặc thù chẳng hạn như trong lĩnh vực y tế. Lee và Cs (1999) đã chứng minh việc sử dụng chloroform trong tách chiết P(3HB) từ sinh khối *E. coli* có thể giúp giảm hàm lượng endotoxin xuống mức quy định [114]. Tuy nhiên, phương pháp này cũng có một số nhược điểm lớn như: vấn đề ô nhiễm môi trường khi tiến hành ở quy mô lớn, phá hủy hình thái tự nhiên của hạt PHA (một cấu trúc hữu ích cho ứng dụng tạo các sợi chịu lực).

1.4.2.2. Tách chiết – thu hồi PHA bằng phương pháp thủy phân các thành phần không phải polymer

Ngược lại với phương pháp thu hồi bằng dung môi, các thành phần không phải polymer của tế bào (bao gồm axit nucleic, lipit, photpholipit, peptidoglycan, và các vật chất có bản chất protein khác) sẽ được thủy phân và hòa tan nhờ việc sử dụng các hóa chất hoặc enzyme. Đây là phương pháp đã và đang được sử dụng rộng rãi nhằm thay thế cho phương pháp thu hồi và tinh sạch bằng dung môi. Trong nhóm phương pháp này có thể được phân chia thành 3 nhóm chính dựa theo tác nhân sử dụng (bảng 1.3): (1) sử dụng hóa chất, (2) sử dụng enzyme, (3) sử dụng cơ học. Nhiều hóa chất đã được sử dụng trong nghiên cứu tách chiết – thu hồi PHA từ sinh khối các loại vi khuẩn khác nhau như NaOCl, các chất

hoạt động bề mặt,… Trong số đó nghiên cứu tách chiết – thu hồi PHA từ sinh khối vi khuẩn sử dụng tác nhân là kiềm được nhiều tác giả gần đây quan tâm bởi quy trình đơn giản và hiệu quả.

Các chất tẩy rửa và kiềm thủy phân các protein và xà phòng hóa các lipopolysaccharide giúp tăng tính thấm không chọn lọc của màng tế bào từ đó dẫn đến sự phá vỡ tế bào và giải phóng các thành phần hòa tan ra môi trường [40, 79]. Độ tinh sạch của sản phẩm PHA đạt 81 % với hiệu suất thu hồi đạt 88 % khi Anis và Cs (2012) sử dụng 0,1 M NaOH để xử lý dịch 10 g/L tế bào *Cupriavidus necator* tái tổ hợp ở 30 ^{o}C. Khi nâng nhiệt độ xử lý lên 80 ^{o}C, độ tinh sạch của sản phẩm được nâng lên (đạt 92 %) song hiệu suất thu hồi giảm đi đáng kể (đạt 57,7 %) [21].

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

Mang nhiều đặc tính giống như nhựa tổng hợp có nguồn gốc từ dầu mỏ, với ưu điểm bị phân hủy bởi các vi sinh vật để tạo thành CO_2 (hoặc CH_4) và H_2O khi được thải ra môi trường, polyhydroxyalkanoates (PHA) đã và đang là vật liệu nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học, nhà sản xuất và chính phủ các nước trên thế giới. Trong những năm gần đây, số lượng các nghiên cứu về PHA đã tăng lên nhanh chóng với rất nhiều các phát minh và công bố trên thế giới.

Các nghiên cứu hiện nay hầu hết tập trung vào các mục tiêu: cải tiến công nghệ lên men nhằm nâng cao năng suất, cải tiến công nghệ thu hồi và tách chiết đạt hiệu suất – thân thiện với môi trường, tận dụng nguồn nguyên liệu dư thừa và các loại nguyên liệu phế thải từ nông nghiệp và công nghiệp chế biến thực phẩm [15, 89]. Nguồn nguyên liệu rẻ tiền và dễ kiếm đang được quan tâm trong nghiên cứu sản xuất PHA hiện nay chính là dầu thực vật. Nhiều nghiên cứu cho thấy ưu thế của việc sử dụng dầu thực vật so với các nguồn C khác (hầu hết là hợp chất saccharide) trong tích lũy cũng như tạo ra những tổ hợp PHA mới mang các đặc tính ưu việt hơn [14, 100, 115, 122].

Sản xuất polymer phân hủy sinh học cũng đã tăng nhanh trong vài thập kỷ qua. Theo các báo cáo của Hiệp hội nhựa sinh học Châu Âu năm 2015, sản lượng

nhựa sinh học toàn cầu có thể tăng lên tới khoảng 7,8 triệu tấn vào năm 2019 với tốc độ tăng trưởng dự kiến của lĩnh vực này vào khoảng 20 % - 25 % mỗi năm trong giai đoạn 2016-2020 [22]. Được khám phá muộn hơn so với PLA, song hiện nay PHA đã và đang được nhiều nhà sản xuất quan tâm bởi tính đa dạng trong cấu trúc và những thuộc tính ưu việt của nó. Trong năm 2013, thị trường PHA trên toàn cầu ước tính chiếm khoảng 5 % thị trường nhựa sinh học và khoảng 0,05 % thị trường nhựa toàn thế giới [100]. Cho đến 2010 thì trên toàn thế giới có khoảng 24 công ty lớn hoạt động trong lĩnh vực sản xuất và ứng dụng PHA [41]. Sản xuất PHA ở quy mô công nghiệp được bắt đầu từ thập niên 90 của thế kỷ trước. Công ty Chemie Linz (Áo) đã sử dụng chủng *A. latus* DSM 1124 trong sản xuất P(3HB) với công suất 1 tấn/ tuần trên nồi lên men 15 m^3. Industrial Usina da Pedra-Acucare Alcool (Braxin) sử dụng *Burkholderia* sp. trong sản xuất P(3HB) với sản lượng 10 nghì tấn/năm. Đặc biệt nguồn nguyên liệu sản xuất được tận dụng từ công nghiệp mía đường và tích hợp với công nghiệp sản xuất cồn. Bên cạnh P(3HB), các copolymer khác cũng được sản xuất ở quy mô công nghiệp. P(3HB-co-4HB) đã được Metabolix (Mỹ) và Tianjin Green Bioscience (Trung Quốc) sản xuất với quy mô 50 nghìn tấn và 10 nghìn tấn/năm. Trong tương lai P(3HB-co-4HB) sẽ chiếm lĩnh thị trường do những đặc tính nổi trội của nó [41].

Trên thế giới, PHA được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống. Có thể kể đến 3 lĩnh vực ứng dụng chủ yếu và ngày càng phát triển của nhựa sinh học: (1) sản xuất các vật dụng sinh hoạt và đồ bao gói, (2) ứng dụng trong y tế, (3) ứng dụng của các đơn phân từ PHA trong một số lĩnh vực khác [41, 101].

Trong lĩnh vực sản xuất các vật dụng phục vụ đời sống, PHA đã và đang cho thấy vai trò to lớn của mình. PHA được sử dụng ban đầu để sản xuất các vật dụng hàng ngày chẳng hạn như các lọ đựng dầu gội đầu, dao cạo râu, vỏ điện thoại, …. Nhiều sản phẩm khác nhau có nguồn gốc PHA đã được phát triển bởi các công ty như Proctor & Gamble, Biomers, Metabolix, … Các sản phẩm như bình chứa dầu gội đầu, sản phẩm dưỡng tóc, hay dầu bôi trơn cho xe máy, dao cạo dùng một lần cũng đã được sản xuất dựa trên nền tảng sản phẩm PHA thương mại BIOPOL® của Metabolix (Mỹ) [34, 38, 41, 101].

Bên cạnh các sản phẩm gia dụng thân thiện môi trường, các sản phẩm trong lĩnh vực y tế có nguồn gốc từ PHA đã được sản xuất. Với tính tương thích sinh học cao, các sản phẩm như đĩa xương, vít, chỉ khâu, nẹp, … ngày càng được sử dụng nhiều hơn. Ngoài ra, PHA còn được ứng dụng như là các chất dẫn thuốc cũng như là chất điều khiển quá trình giải phóng thuốc [41, 51, 101, 131].

Khi thủy phân PHA sẽ tạo ra nhiều loại đơn phân khác nhau với cấu trúc mạch C và chiều quay quang học mang nhóm chức năng hydroxyl khác nhau. Các chất này được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như sản xuất các hợp chất hóa học quý (pheromone, kháng sinh, hợp chất thơm, vitamin) an toàn với con người [101]. Ngoài ra, các đơn phân từ PHA có thể được sử dụng như là một số loại thuốc trong quá trình điều trị [41].

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

Công nghiệp nhựa ở Việt Nam bắt đầu từ giữa thế kỷ trước và có những bước phát triển mạnh trong thời gian gần đây, song việc sản xuất vẫn còn hạn chế và nhỏ lẻ. Đặc biệt các sản phẩm từ nhựa sinh học chiếm tỉ lệ vô cùng nhỏ trong tổng sản phẩm ngành nhựa cả nước. Những năm gần đây, cùng với xu thế hội nhập, nhu cầu thực tế và những vấn đề về môi trường thì các nhà khoa học trong nước đã bắt đầu có những công trình nghiên cứu về sản xuất, chế tạo nhựa sinh học nhằm phục vụ đời sống cộng đồng. Một số nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc tổng hợp các loại nhựa có khả năng phân hủy sinh học như PLA [2, 3, 11], sản phẩm phối trộn giữa các loại polymer có khả năng phân hủy sinh học [6, 7, 8, 10, 12]. Bên cạnh đó các hướng nghiên cứu nhằm nâng cao thuộc tính hóa lý, khả năng phân hủy của polymer [5, 7], cũng như ứng dụng của các loại polymer này trong bảo quản thực phẩm và trong nông nghiệp cũng đã được tiến hành. Phần lớn các nghiên cứu tập trung vào polylactic axit (PLA) và một số loại polymer tự nhiên khác như chitosan, tinh bột, cellulose. Trong khi đó polyhydroxyalkanoates (PHA) – một nhóm polyester mang các đặc tính ưu việt và được tổng hợp bởi nhiều loại vi sinh vật trong tự nhiên – vẫn chưa nhận được nhiều quan tâm. Có rất ít các dẫn liệu nghiên cứu về vi khuẩn sinh tổng hợp PHA phân lập được tại Việt Nam đã được công bố.

Năm 2010, Thanh Mai và Cs đã phân lập được chủng vi khuẩn V23-X1.1 và định danh đến loài *Bacillus cereus* [4]. Chủng vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1-20 được nhóm nghiên cứu Viện Công nghệ Sinh học sử dụng trong nghiên cứu sản xuất P(3HB) vào năm 2009 [1].

Được đánh giá là ngành công nghiệp có mức độ tăng trưởng cao trong giai đoạn 2010-2015, ngành nhựa Việt nam đặt mục tiêu đến năm 2025 mức độ tăng trưởng/năm của ngành nhựa luôn đạt trên 10 % (theo quyết định 2992/QĐ-BCT). Theo thống kê của Hiệp hội nhựa Việt Nam thì đến năm 2011 có khoảng 2000 công ty nhựa đang hoạt động (80 % cỡ vừa, nhỏ và do tư nhân mở), phân bố chủ yếu ở các tỉnh phía Nam như thành phố Hồ Chí Minh, Bình Dương, Đồng Nai,… Công nghiệp sản xuất nhựa phân hủy sinh học và các sản phẩm từ nhựa phân hủy sinh học ở Việt Nam hiện nay hầu như chưa có và nhỏ lẻ. Một số sản phẩm bao bì có gắn nhãn phân hủy sinh học đã xuất hiện trên thị trường do các công ty trong nước sản xuất như túi phân hủy sinh học Alta (Công ty Cổ phần Văn Hóa Tân Bình - Alta), zero plastic (Cty TNHH và in ấn Bao bì Đình Toàn), túi phân hủy sinh học D_2W (Cty TNHH SXTM Hồng Tiến Thành). Hầu hết các sản phẩm này đều có thành phần chủ yếu là PE và PP được bổ sung chất phụ gia, do đó quá trình phân hủy của chúng có bản chất là phân hủy do môi trường mà không do sự tác động của hoạt động vi sinh vật. Bên cạnh đó, hầu hết nguồn nguyên liệu cho công nghiệp nhựa tự hủy của Việt Nam được nhập khẩu từ nước ngoài với chi phí cao. Chính vì thế, nghiên cứu và sản xuất nhựa sinh học ở Việt Nam cần dành nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học và đặc biệt là sự thay đổi trong chính sách của chính phủ hơn nữa.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

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 – Thành phố 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.

Môi trường phân lập và hoạt hóa vi khuẩn (g/L) [153]: $MgSO_4.7H_2O$ – 0,25; $CaCl_2.2H_2O$ – 0,09; KCl – 0,5; KBr – 0,06; Peptone – 5; Cao nấm men – 10; glucose – 1; pH = 7,0. Để phân lập các vi khuẩn từ đất rừng ngập mặn cần bổ sung NaCl để đạt độ mặn 30 ‰. Môi trường rắn được chuẩn bị bằng cách hòa tan hoàn toàn các thành phần với hàm lượng như trên, điều chỉnh pH, bổ sung thạch - agar (20 g/L), khử trùng ở 121 ^oC, 1 atm trong thời gian 20 phút.

Môi trường nghiên cứu lên men sinh tổng hợp PHA được xây dựng dựa trên thành phần môi trường phân lập với một số thay đổi cụ thể (g/L): $MgSO_4.7H_2O$ – 0,25; $CaCl_2.2H_2O$ – 0,09; KCl – 0,5; KBr – 0,06; KH_2PO_4 – 0,25; cao nấm men – 1; glucose – 20; pH = 7,0; khoáng vi lượng – 1 ml. Đối với các vi khuẩn phân lập được từ đất rừng ngập mặn, môi trường được bổ sung NaCl để đạt độ mặn 30 ‰. Thành phần khoáng vi lượng được trình bày trong phụ lục 2.

2.1.3. Thiết bị nghiên cứu

Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu thuộc các phòng thí nghiệm: (1) Bộ môn Công nghệ Sinh học – Vi sinh, Đại học Sư phạm Hà Nội; (2) Viện Công nghệ Sinh học và Vi sinh, Đại học Quốc Gia Hà Nội; (3) Phòng nghiên cứu vật liệu sinh học, Đại học Sains, Malaysia.

Thiết bị nuôi cấy: Tủ nuôi cấy lắc ổn nhiệt Innova (New Brunswick, Mỹ), buồng thao tác vi sinh HeraSafe (Thermo Scientific, Mỹ), thiết bị thanh trùng ướt Tomy 45S (Nhật), thiết bị sấy thăng hoa Flexi-Dry (Kinetics, Mỹ) và YK118 (True Ten, Đài Loan).

Thiết bị phân tích: Máy quang phổ khả kiến UV-VIS (Shimadzu, Nhật), cân phân tích Precisa 320 (Thụy Sỹ), thiết bị khuếch đại gen Geneamp 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), hệ thống sắc kí khí 7890A (Agilent Technologies, Mỹ), hệ thống sắc kí thẩm thấu gel 1200 GPC (Agilent Technologies, Mỹ), hệ thống quét nhiệt vi sai DSC-60A (Shimadzu, Nhật), thiết bị phân tích sức căng vật liệu EZTest (Shimadzu, Nhật), thiết bị phân tích cộng hưởng từ hạt nhân Brucker ARX500 Spectrometer (Brucker, Sikertrifen, Đức).

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 thu thập được từ các vị trí nghiên cứu được tiến hành pha loãng theo dãy số mũ thập phân. Dùng pipet hút 100 µl dịch huyền phù ở 3 độ pha loãng cuối cùng nhỏ lên bề mặt thạch trong đĩa Petri, trang đều dịch huyền phù pha loãng lên bề mặt môi trường thạch dinh dưỡng. Sau đó ủ các đĩa Petri trong điều kiện 30 ^{o}C đến 32 ^{o}C, trong 24 h đến 48 h. Lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ để tách chủng thuần sang môi trường giữ giống, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.1.2. Phương pháp bảo quản chủng giống vi khuẩn

Bảo quản chủng giống trong glycerol: Các chủng giống vi khuẩn cần bảo quản được tiến hành nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng phù hợp. Sau đó tiến hành li tâm loại bỏ dịch môi trường, sinh khối tế bào được hòa lại trong dung dịch 20 % (v/v) glycerol vô trùng. Các mẫu được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thấp (-15 ^{o}C đến -20 ^{o}C). Các chủng giống được bảo quản trong glycerol có thể duy trì sức sống ổn định được trong khoảng 6 tháng đến 12 tháng.

Bảo quản chủng giống bằng phương pháp đông khô: Các chủng giống vi khuẩn cần bảo quản được tiến hành nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng phù hợp. Sinh khối tế bào được thu lại và hòa vào dung dịch bảo vệ tế bào (chứa 10 % sữa gầy, 1% glutamate) vô trùng đã được chuẩn bị sẵn. Dịch huyền phù tế bào được đưa vào các ống chuyên dụng và được tiến hành cấp đông ở -50 ^{o}C trước khi tiến hành làm khô. Quá trình đông khô được thực hiện trên thiết bị đông khô Flexi Dryer

(Kinetics, Mỹ) ở điều kiện -86 ^{o}C trong vòng 24 h. Các ống mẫu sau đó được hàn kín trong điều kiện chân không và được bảo quản ở điều kiện mát (4 - 8 ^{o}C).

2.2.1.3. Phương pháp sàng lọc sơ bộ vi khuẩn sinh tổng hợp PHA

Vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA được sàng lọc sơ bộ dựa theo phương pháp của Spiekermann và Cs (1999) [180]. Môi trường chọn lọc được chuẩn bị dựa trên cơ sở môi trường nghiên cứu lên men có bổ sung thuốc thử Nile Blue A (pha trong dimethyl sulfoxide – DMSO) để đạt được nồng độ 0,5 µg/L. Các dòng vi khuẩn được nuôi cấy trên đĩa Petri chứa môi trường chọn lọc đã chuẩn bị ở trên và được ủ ở nhiệt độ 30-35 ^{o}C trong 48 h cho đến khi khuẩn lạc mọc tốt. Sau đó các khuẩn lạc được đặt dưới tia UV ở bước sóng 254 nm nhằm xác định sự có mặt của PHA trong tế bào. Các vi khuẩn có khuẩn lạc tương ứng phát ra màu cam sáng được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

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

- *Ảnh hưởng của nguồn C*

Thí nghiệm được tiến hành trong các bình tam giác 250 ml có chứa 100 ml môi trường lên men cơ sở với 20 g/L mỗi nguồn C khác nhau. Giống vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường hoạt hóa vi khuẩn trong thời gian 13 h đến 15 h để đạt mật độ vi khuẩn mong muốn (giá trị mật độ quang ở bước sóng 600 nm đạt 7,0 ± 0,5). Bổ sung 10 % (v/v) giống vào môi trường lên men vô trùng đã được chuẩn bị sẵn. Tiến hành nuôi cấy ở điều kiện 32 ^{o}C với tốc độ lắc 180 rpm. Sau 48 h, tiến hành phân tích các giá trị tổng khối lượng tế bào khô (CDW, g/L), hàm lượng PHA (% PHA, %wt) của mỗi lô thí nghiệm để đánh giá mức độ ảnh hưởng của các nguồn C đến sự sinh trưởng và tích lũy PHA của vi khuẩn.

- *Ảnh hưởng của tiền chất C*

Thí nghiệm được tiến hành trong các bình tam giác 250 ml có chứa 100 ml môi trường lên men cơ sở chứa 10 g/L fructose. Giống vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường hoạt hóa trong thời gian 13 h đến 15 h để đạt mật độ vi khuẩn mong muốn (giá trị mật độ quang ở bước sóng 600 nm đạt 7,0 ± 0,5). Bổ sung 10 % (v/v) giống vào môi trường lên men vô trùng đã được chuẩn bị sẵn. Tiến hành nuôi cấy ở điều kiện 32 ^{o}C

với tốc độ lắc 180 rpm. Sau 6 h nuôi cấy, dung dịch tiền chất được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để đạt được nồng độ 0,5 g/L. Tiếp tục nuôi cấy đến 48 h, tiến hành phân tích các giá trị tổng khối lượng tế bào khô (CDW, g/L), hàm lượng PHA (% PHA, %wt) của mỗi lô thí nghiệm để đánh giá mức độ ảnh hưởng của các nguồn tiền chất đến sự sinh trưởng và tích lũy PHA của vi khuẩn [17].

Ảnh hưởng của nguồn N

Thí nghiệm được tiến hành trong các bình tam giác 250 ml có chứa 100 ml môi trường lên men cơ sở với các nguồn N khác nhau. Giống vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường hoạt hóa trong thời gian 13 h đến 15 h để đạt mật độ vi khuẩn mong muốn (giá trị mật độ quang ở bước sóng 600 nm đạt 7,0 ± 0,5). Bổ sung 10 % (v/v) giống vào môi trường lên men vô trùng đã được chuẩn bị sẵn. Tiến hành nuôi cấy ở điều kiện 32 ^{o}C với tốc độ lắc 180 rpm. Sau 48 h, tiến hành phân tích các giá trị tổng khối lượng tế bào khô (CDW, g/L), hàm lượng PHA (% PHA, %wt) của mỗi lô thí nghiệm để đánh giá mức độ ảnh hưởng của các nguồn N đến sự sinh trưởng và tích lũy PHA của vi khuẩn.

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 (phụ lục 1). Sau 24 h tiến hành kiểm tra dựa trên phản ứng màu của các thuốc thử tương ứng [9].

Thử nghiệm khả năng sinh indol được tiến hành trên môi trường nước tryptone (phụ lục 1). 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. Kết quả dương tính khi có sự xuất hiện lớp màu đỏ trên bề mặt môi trường, trong khi kết quả âm tính được thể hiện là lớp màu vàng của thuốc thử trên bề mặt môi trường [9].

Thử nghiệm methyl đỏ được tiến hành trên môi trường glucose-photphat (phụ lục 1). Sau 48 h nuôi cấy ở 37 ^{o}C, nhỏ vài giọt thuốc thử methyl đỏ vào dịch nuôi cấy và đọc kết quả. Kết quả dược xác định dương tính khi môi trường xuất hiện màu đỏ sau khi bổ sung thuốc thử, trong khi kết quả âm tính môi trường có màu vàng [9].

Thử nghiệm Voges-Proskauer được tiến hành trên môi trường glucose-photphat (phụ lục 1). Sau 48 h nuôi cấy ở 37 ^{o}C, bổ sung thuốc thử trực tiếp vào môi trường và đọc kết quả ngay. Kết quả là dương tính khi xuất hiện màu đỏ trên bề mặt môi trường, trong khi bề mặt môi trường không đổi màu được xác định là âm tính [9].

Khả năng sử dụng các nguồn C được tiến hành trên môi trường khoáng với các nguồn C tương ứng (phụ lục 1). Sau 48 h, đánh giá khả năng sử dụng nguồn C 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.*

Tế bào của chủng vi khuẩn được tiến hành pha loãng và trang cấy lên môi trường thạch dinh dưỡng. Sau 24 h, kiểm tra khả năng hình thành các khuẩn lạc. Tiến hành quan sát hình thái và màu sắc của khuẩn lạc trên kính lúp soi nổi SZ61 (Olympus, Nhật) ở độ phóng đại 40 x.

- *Phương pháp nhuộm Gram và quan sát trên kính hiển vi quang học.*

Mẫu tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng cho đến khi mọc tốt. Dịch huyền phù tế bào được sử dụng để tạo tiêu bản nhuộm Gram theo hướng dẫn sử dụng đi kèm của bộ Gram color kit (Sinh Việt, Việt Nam). Tiêu bản nhuộm Gram được quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 x.

Mẫu tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường lên men tích lũy PHA trong thời gian 30 h được sử dụng để quan sát phát hiện thể ẩn nhập (hạt PHA) trong tế bào vi khuẩn. Tiêu bản quan sát thể ẩn nhập được thực hiện theo các bước tương tự như quá trình nhuộm gram. Tiêu bản sau khi hoàn thành được quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 x. Thể ẩn nhập nếu có sẽ được thể hiện là vùng sáng nội bào khi được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

- *Phương pháp quan sát hình thái hạt PHA trên kính hiển vi điện tử:*

Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường tích lũy PHA trong thời gian 30 h, li tâm thu lấy cặn sinh khối ở 10000 rpm trong 5 phút. Quá trình xử lý tế bào và quan sát trên kính hiển vi điện tử quét (SEM) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) được thực hiện tại Viện vệ sinh dịch tễ Trung Ương.

2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử

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

Vi khuẩn được nuôi trên môi trường giàu dinh dưỡng (môi trường hoạt hóa) ở 30 ^{o}C trong thời gian 15 h. Sinh khối tế bào được thu lại bằng cách li tâm trong các ống eppendorf vô trùng ở điều kiện 15 000 rpm trong thời gian 5 phút. Đổ bỏ dịch trong, rửa cặn sinh khối bằng nước khử ion vô trùng và tiến hành li tâm loại bỏ dịch như trên. Cặn sinh khối được sử dụng để tách chiết ADN tổng số. 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). ADN tổng số thu được được tiến hành kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose (1 %) trong đệm TAE 1X trước khi tiến hành khuếch đại đoạn gen 16S rADN.

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 với trình tự như sau:

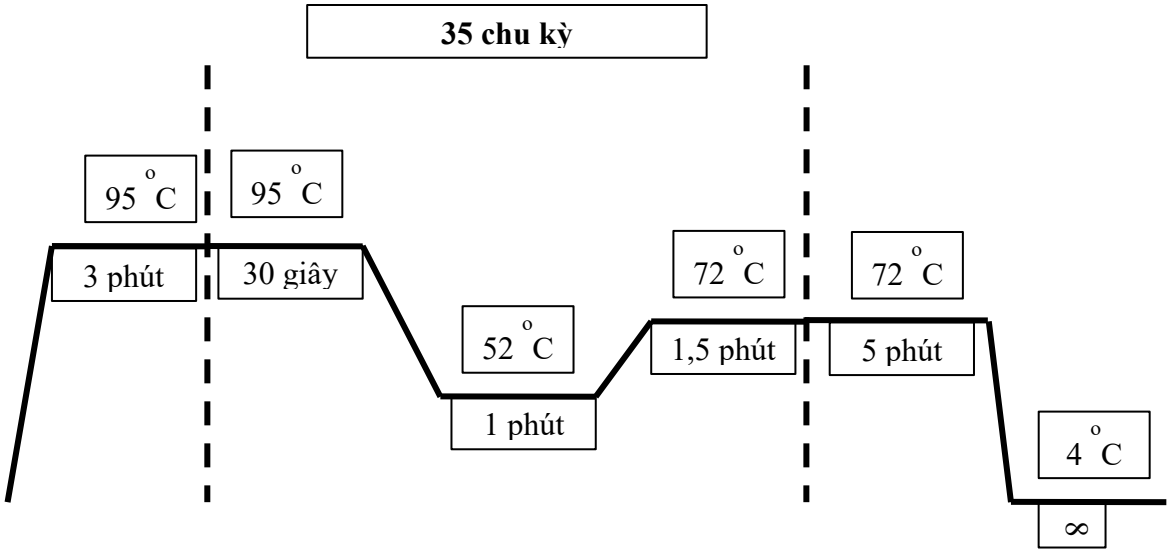
314F (5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′)

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:



Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose (1%) trước khi được gửi đi giải trình tự tại công ty Bioneer (Hàn Quốc).

2.2.2.3. Xác định trình tự 16S rADN và xây dựng mối quan hệ phát sinh chủng loại

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 [188] sử dụng phương pháp kết nối họ hàng [158]. Dựa vào các kết quả thu được chúng tôi tiến hành xây dựng mối quan hệ phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn phân lập được.

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

Nghiên cứu lên men sản xuất PHA được chúng tôi tiến hành trên thiết bị MDL 1000 (B.E. Marubishi, Nhật Bản). Các kỹ thuật nuôi cấy được sử dụng gồm có: (1) nuôi cấy mẻ, (2) nuôi mẻ có bổ sung dinh dưỡng, (3) nuôi cấy hai pha có bổ sung dinh dưỡng.

2.2.3.1. Nghiên cứu lên men mẻ sản xuất PHA

Giống vi khuẩn được sử dụng từ các ống giống bảo quản trong glycerol hoặc ống đông khô nhằm đảm bảo sự đồng đều về chủng giống. Chủng giống bảo quản được hoạt hóa trên môi trường thạch dinh dưỡng trong 24 h, sau khi kiểm tra về mặt hình thái tế bào, các khuẩn lạc mọc tốt được cấy chuyển sang môi trường nhân

giống và được nuôi cấy ở điều kiện 30 ^oC, lắc 180 rpm trong 13 h đến 15 h nhằm đảm bảo đạt được mật độ tế bào cần thiết.

Môi trường lên men sử dụng trong nghiên cứu được xây dựng trên cơ sở môi trường nghiên cứu lên men như trình bày ở mục 2.1.2 ở trên với một số thay đổi cụ thể như sau (g/L): NaCl – 30; $MgSO_4.7H_2O$ – 1,7; $CaCl_2$. $2H_2O$ – 0,18; KCl – 1,0; KBr – 0,12; KH_2PO_4 – 1,1; Peptone – 3; Cao nấm men – 6; Fructose – 25; khoáng vi lượng – 1 ml). Nguồn KH_2PO_4 và fructose được thanh trùng riêng và bổ sung ngay trước khi tiến hành lên men. Thành phần khoáng vi lượng được trình bày chi tiết trong phần phụ lục 2.

Quá trình lên men mẻ được tiến hành ở mức thể tích 3 lít môi trường với lượng giống ban đầu được bổ sung 10 % (v/v) ở nhiệt độ (32 ^oC). Giá trị pH = 7,0 được duy trì trong suốt quá trình lên men một cách tự động thông qua cảm biến điện cực và sử dụng các dung dịch điều chỉnh là NaOH (5N) và HCl (5N). Tốc độ khuấy ban đầu và lượng sục khí được cài đặt ở mức 200 rpm và 1 L/phút. Các thông số tốc độ khuấy và lượng sục khí sẽ được điều chỉnh trong suốt quá trình lên men dựa trên các thông số về mật độ tế bào (dựa trên giá trị mật độ quang ở bước sóng 600 nm) và kiểm tra hình thái cũng như mức độ tích lũy các thể ẩn nhập nội bào sau mỗi lần thu mẫu nhằm đảm bảo cung cấp đầy đủ oxi cho sinh trưởng của tế bào vi khuẩn. Mẫu dịch được thu sau mỗi 3 h nuôi cấy để tiến hành phân tích các thông số động thái lên men (CDW, % PHA, hàm lượng fructose còn lại trong môi trường).

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

Giống vi khuẩn được sử dụng từ các ống giống bảo quản trong glycerol hoặc ống đông khô nhằm đảm bảo sự đồng đều về chủng giống. Chủng giống bảo quản được hoạt hóa trên môi trường thạch dinh dưỡng trong 24 h, sau khi kiểm tra về mặt hình thái tế bào khuẩn lạc mọc tốt được cấy chuyển sang môi trường nhân giống và được nuôi cấy ở điều kiện 30 ^oC, 180 rpm trong 13 đến 15 h nhằm đảm bảo đạt được mật độ tế bào cần thiết.

Môi trường lên men sử dụng trong nghiên cứu được xây dựng trên cơ sở môi trường nghiên cứu lên men mẻ như trình bày phần 2.2.3.1. Dung dịch dinh dưỡng đậm đặc I và II dùng để bổ sung vào môi trường có nồng độ gấp 10 lần môi trường

lên men (phần phụ lục 3; 4).

Các thông số ban đầu của quá trình lên men bán liên tục được cài đặt tương tự như quá trình lên men mẻ ở mục 2.2.3.1. Dung dịch dinh dưỡng đậm đặc I được bổ sung từ thời điểm 3 h cho đến 18 h nuôi cấy nhờ sử dụng bơm nhu động với tốc độ ban đầu 10 ml/h và tăng dần lên 20 ml/h; 30 ml/h; 40 ml/h; 50 ml/h sau mỗi 3 h nuôi cấy nhằm cung cấp môi trường hoàn chỉnh cho sinh trưởng của tế bào vi khuẩn. Sau 18 h dung dịch dinh dưỡng đậm đặc số II được bổ sung với tốc độ 10 ml/h nhằm đảm bảo cung cấp đầy đủ nguồn khoáng và các nguyên tố vi lượng cho quá trình sinh tổng hợp PHA. Hàm lượng fructose trong môi trường nuôi cấy được phân tích sau mỗi 1,5 h của quá trình lên men và được bổ sung thêm tùy thuộc vào mỗi chiến lược lên men nhờ bơm nhu động. Mẫu dịch được thu sau mỗi 3 h nuôi cấy để tiến hành phân tích các thông số động thái lên men (CDW, % PHA).

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

Lên men hai pha có bổ sung dinh dưỡng được thực hiện thông qua hai pha nuôi cấy độc lập. Trong pha đầu tiên, quá trình nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện môi trường giàu dinh dưỡng tương tự quá trình lên men fed-batch cho đến thời điểm 24 h. Sinh khối vi khuẩn được tiến hành lọc, rửa thông qua hệ thống lọc tiếp tuyến vô trùng nhằm loại bỏ các thành phần có trong môi trường. Toàn bộ sinh khối được chuyển sang pha nuôi cấy thứ hai trong điều kiện môi trường nghèo dinh dưỡng (không chưa nguồn nitơ) với nguồn C dư thừa nhằm kích thích quá trình tích lũy PHA của tế bào vi khuẩn. Mẫu dịch được thu sau mỗi 3 h nuôi cấy để tiến hành phân tích các thông số động thái lên men (CDW, %PHA)

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

Sinh khối tế bào thu được sau lên men được tiến hành làm khô trên thiết bị đông khô Flexi Dryer (Kinetics, Mỹ). Hòa sinh khối tế bào với chloroform theo tỷ lệ 1 : 100 (w/v) và khuấy đều trên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày. Dịch huyền phù được lọc qua giấy lọc Whatman No.1 để loại bỏ xác tế bào. Dịch chloroform chứa PHA được cô đặc nhờ máy cất quay. PHA được kết tủa bằng cách

nhỏ từng giọt dịch cô đặc vào dung dịch methanol lạnh với tỷ lệ 1 : 5 (v/v), để qua đêm và lọc qua giấy lọc. PHA kết tủa được làm khô ở nhiệt độ phòng và lưu giữ cho các nghiên cứu tiếp theo [110, 209].

2.2.4.2. Tách chiết và thu hồi PHA nhờ NaOH

Thí nghiệm được tiến hành với các điều kiện khác nhau về nhiệt độ, nồng độ NaOH, và thời gian ủ, nồng độ sinh khối.

Quá trình thí nghiệm được thực hiện như sau: Trộn dịch huyền phù sinh khối tế bào chứa PHA với dung dịch NaOH theo tỷ lệ 1 :1 (v/v) để đạt được các nồng độ sinh khối và nồng độ NaOH theo yêu cầu thí nghiệm. Hỗn dịch sau đó được ủ ở các điều kiện nhiệt độ thí nghiệm khác nhau (30 ^{o}C, 40 ^{o}C, 50 ^{o}C). Sau khi xử lý hoàn thành, hỗn dịch được li tâm ở 15 000 rpm trong 5 phút để thu phần cặn. Rửa cặn bằng nước cất và li tậm loại bỏ hết tác nhân NaOH và các thành phần hòa tan khác (quá trình này được lặp lại 3 lần). Phần cặn cuối cùng được làm khô trên máy Flexi Dryer (Kinetics, Mỹ) trong 24 h. Tiến hành phân tích các chỉ tiêu CDW, độ sạch của PHA, hiệu suất thu hồi PHA của các mẫu thí nghiệm [21].

$$Độ\ tinh\ sạch\ (\%wt) = \frac{Tổng\ khối\ lượng\ PHA\ có\ trong\ mẫu\ (mg)}{Khối\ lượng\ mẫu\ thí\ nghiệm\ sau\ tinh\ sạch\ (mg)}\ x\ 100$$

Hiệu suất thu hồi PHA (H, %) được xác định theo công thức sau:

$$H\ (\%) = \frac{Khối\ lượng\ PHA\ tách\ chiết\ được\ (mg)}{Khối\ lượng\ PHA\ có\ trong\ sinh\ khối\ ban\ đầu\ (mg)}\ x\ 100$$

Khối lượng xác tế bào (RCM) được xác định theo công thức sau:

RCM (g/L) = Tổng CDW – Tổng khối lượng PHA

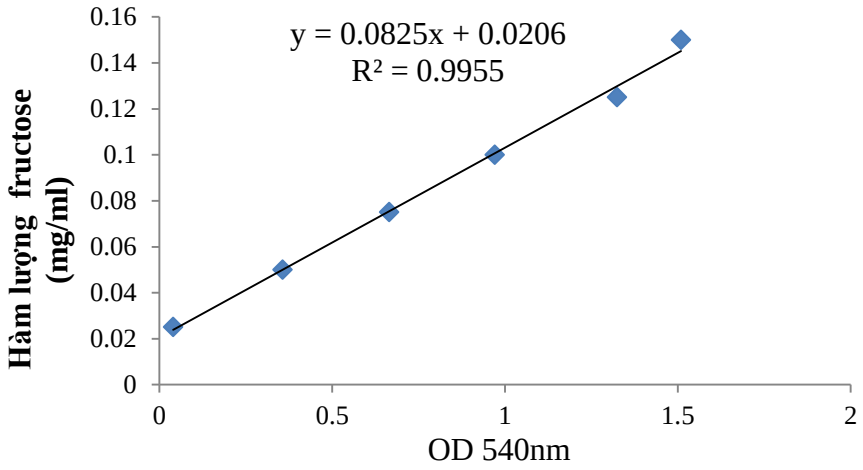
2.2.5. Các phương pháp phân tích

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

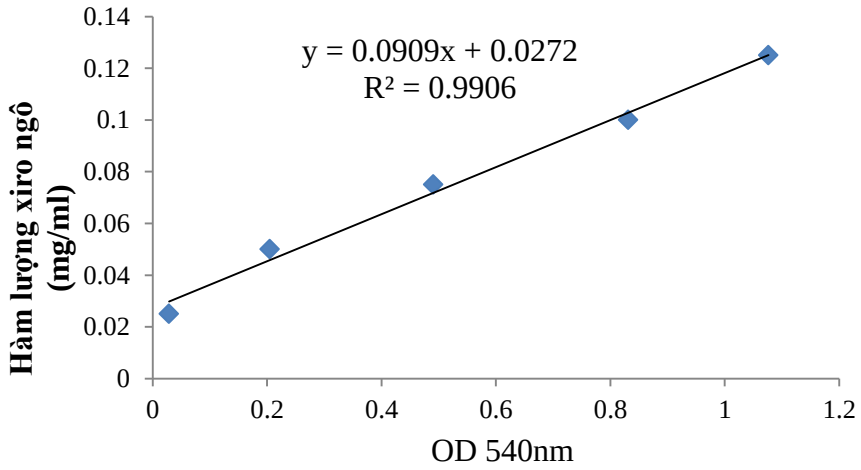
Xây dựng đường chuẩn các nguồn C

Đường chuẩn các nguồn C (fructose tinh khiết, xiro ngô) được xây dựng dựa trên phương pháp định lượng đường khử của Miller và Cs (1959) [132]. Thí nghiệm được tiến hành như sau: Chuẩn bị nguồn C trong nước khử ion với các hàm lượng khác nhau từ 0,05 mg/ml đến 0,3 mg/ml. Sau đó hút 0,5 ml mỗi dung dịch nguồn C vào các ống phản ứng khác nhau, bổ sung thêm 0,75 ml dung dịch thuốc thử DNS. Hỗn hợp phản ứng được đun cách thủy trong thời gian 5 phút ở 100 ^{o}C. Sau đó, các

ống phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Tiến hành đo giá trị độ hấp phụ ở bước sóng 540 nm. Xây dựng mối tương quan giữa hàm lượng C và giá trị độ hấp phụ tương ứng dựa vào chương trình Microsoft Excel



Hình 2.1. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa hàm lượng fructose và giá trị mật độ quang



Hình 2.2. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa hàm lượng xiro ngô và giá trị mật độ quang

Xác định hàm lượng nguồn C có trong dịch lên men

Hàm lượng nguồn C có trong dịch lên men được xác định dựa trên phản ứng DNS và tính toán dựa vào đường chuẩn của mỗi nguồn C tương ứng. Quy trình tiến hành như sau: Li tâm dịch lên men để thu lấy phần dịch trong. Sau đó hút 0,5 ml dịch này chuyển sang ống phản ứng, bổ sung 0,75 ml dung dịch thuốc thử DNS. Tiến hành đun cách thủy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 5 phút ở 100 ^{o}C. Làm nguội hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và tiến hành đo độ hấp

phụ của dịch phản ứng ở bước sóng 540 nm. Dựa vào giá trị độ hấp phụ thu được để tính toán hàm lượng C thực tế có trong môi trường lên men theo phương trình ở hình 2.1 và hình 2.2.

2.2.5.2. Phương pháp xác định khối lượng tế bào khô (CDW)

Dịch nuôi cấy được hút vào ống mẫu đã sấy khô và cân khối lượng ban đầu (m_1). Tiến hành li tâm ở 15 000 rpm (trong 5 phút), đổ bỏ dịch trong, thu lấy phần sinh khối lắng. Bổ sung nước vào sinh khối thu được, trộn đều trên máy Vortex, tiếp tục li tâm ở 15 000 rpm (trong 5 phút), đổ bỏ dịch trong (quá trình này được lặp lại 3 lần) để loại bỏ các thành phần hòa tan của môi trường còn sót lại. Ống mẫu chứa sinh khối được tiến hành làm khô đến khối lượng không đổi trên máy đông khô trong vòng 24 h và cân xác định lại khối lượng (m_2) [150]. Khối lượng khô tế bào (CDW) được tính toán dựa vào công thức sau:

$$CDW = \frac{m_2 - m_1}{V}$$

Trong đó: CDW – Khối lượng sinh khối khô (g/L)

m_1 – Khối lượng ống mẫu ban đầu (gam)

m_2 – Khối lượng ống mẫu sau li tâm và làm khô (gam)

V – Thể tích dịch nuôi cấy đem li tâm (lít)

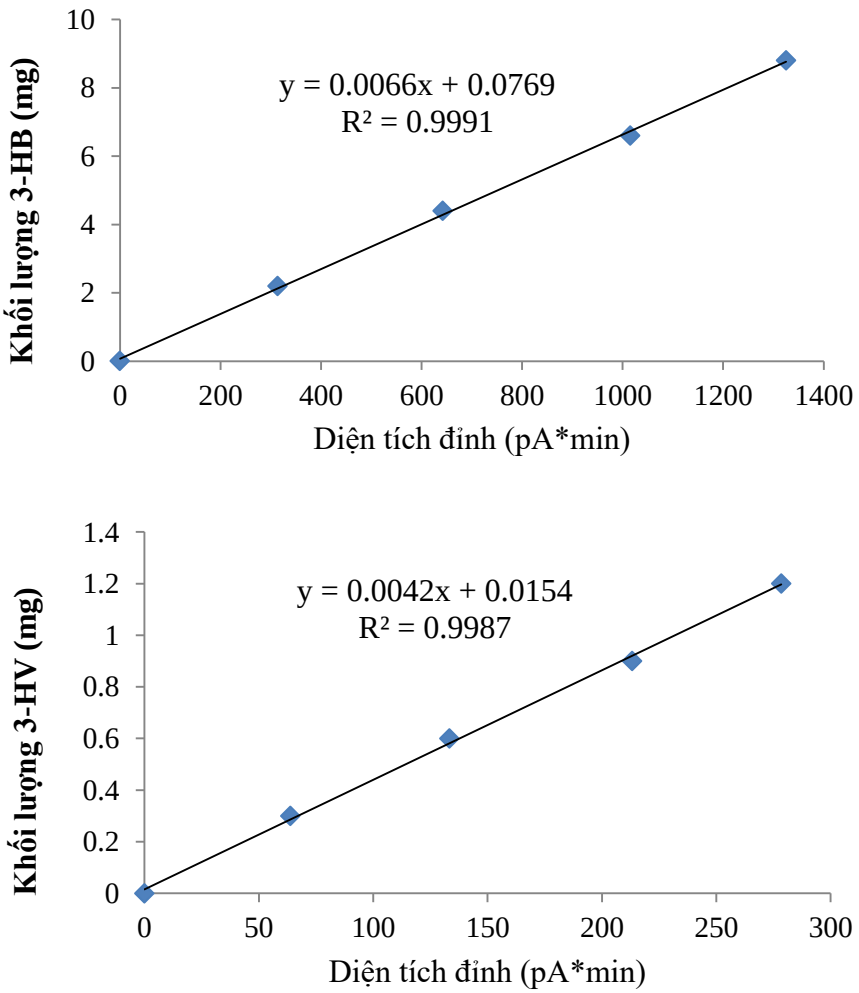
2.2.5.3. Phương pháp định lượng PHA có trong sinh khối tế bào

- *Chuẩn bị mẫu*

Mẫu sắc kí khí được chuẩn bị theo phương pháp thủy phân trong methanol (methanolysis) như trình bày của Braunegg và Cs (1978) [32]. Cân khoảng 10 mg mẫu sinh khối chứa PHA vào ống phá mẫu, bổ sung 1 ml chloroform và 1 ml dung dịch thủy phân methanolysis (85 % methanol; 15 % axit sulfuric) có chứa chất chuẩn benzoic (0,4%). Tiến hành thủy phân mẫu ở 100 ^{o}C trong thời gian 3 h. Để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung 0,5 ml nước khử ion và tiến hành trộn đều trên máy Vortex trong thời gian 30 giây. Hỗn dịch sẽ phân tách thành hai pha khi để tĩnh: trong đó pha dưới là chloroform chứa các methylester, pha trên là pha nước và các thành phần xác tế bào. Dùng pipet Pasteur hút lấy pha dưới đưa qua Na_2SO_4 khan để loại bỏ hết phần nước còn lại, sau đó chuyển vào các ống mẫu để tiến hành phân tích trên máy GC.

Chương trình phân tích

Quá trình phân tích mẫu được thực hiện theo phương pháp trình bày bởi Silva và Cs (2000) [168] trên hệ thống sắc kí khí 7890A (Agilent Technologies, Mỹ), sử dụng cột phân tích mao dẫn HP-5 (Agilent Technologies, Mỹ). P(3HB-co-12 mol% 3HV) (Sigma Aldrich, Mỹ) được sử dụng như là chất ngoại chuẩn. Mẫu phân tích (20 µl) được đưa vào đầu của cột phân tích (front inlet) và được hóa hơi ở nhiệt độ 220 ^{o}C, sau đó được đưa vào cột bởi dòng khí mang N_2. Nhiệt độ cột ban đầu được cài đặt duy trì ở 50 ^{o}C trong 1 phút, sau đó nhiệt độ được tăng lên 185 ^{o}C với tốc độ 20 ^{o}C/phút và duy trì tại điểm nhiệt độ này trong 2 phút. Các hợp chất khác nhau có trong mẫu được nhận diện bởi đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID – flame ionization detector) và được thể hiện trên sắc kí đồ.



Hình 2.3. Mối tương quan giữa khối lượng phân đoạn 3-hydroxyalkanoic với giá trị diện tích phổ sắc kí khí

- *Xây dựng phương trình tương quan:* Mẫu P(3HB-co-12 mol% 3HV) (Sigma) được sử dụng làm chất chuẩn trong quá trình phân tích. Mẫu chất chuẩn với các khối lượng khác nhau được chuẩn bị theo phương pháp thủy phân trong methanol (methanolysis) như trình bày ở trên trước khi tiến hành phân tích sắc kí khí. Mối tương quan giữa hàm lượng mỗi phân đoạn cấu trúc nên PHA chuẩn với các giá trị đỉnh phổ tương ứng đo được được thể hiện ở hình 2.3.

- *Tính toán hàm lượng PHA:* Dựa trên diện tích đỉnh thu được thông qua quá trình sắc kí kết hợp với phương trình tương quan của chất chuẩn ban đầu, phần mềm phân tích trên máy sẽ tự động tính toán để đưa ra khối lượng mỗi phân đoạn của PHA có trong mẫu phân tích. Khối lượng PHA trong mẫu được tính bằng tổng khối lượng các phân đoạn. Từ đó hàm lượng PHA có trong sinh khối tế bào được tính theo công thức sau:

$$\%PHA\ (\%wt) = \frac{Khối\ lượng\ PHA\ có\ trong\ mẫu\ phân\ tích\ (mg)}{Khối\ lượng\ mẫu\ đem\ phân\ tích\ (mg)}\ x\ 100\ \%$$

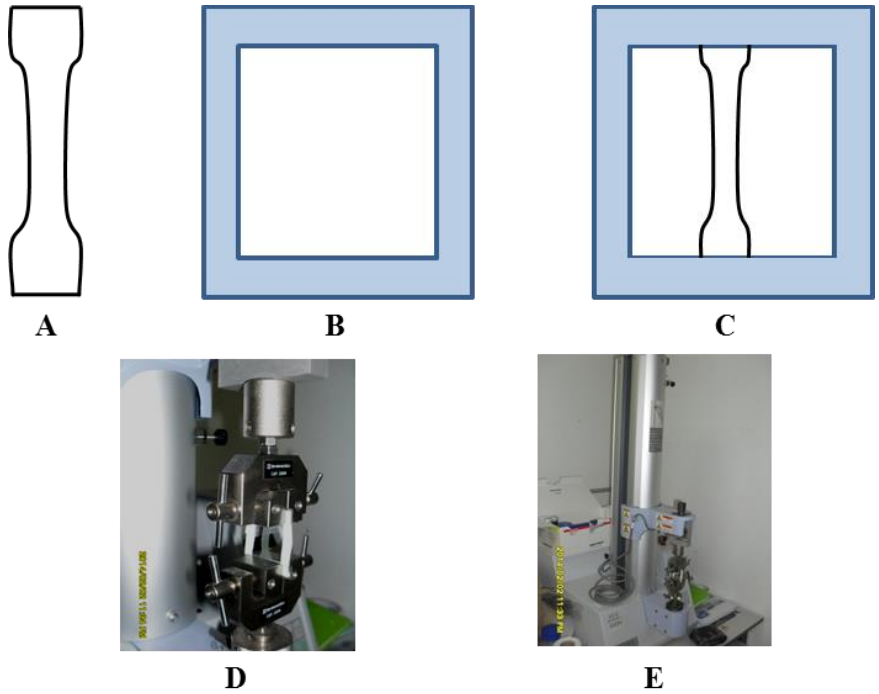
2.2.5.4. Phương pháp phân tích cộng hưởng từ xác định cấu trúc PHA

Mẫu tế bào chứa PHA được tách chiết nhờ phương pháp dung môi sử dụng chloroform như trình bày ở mục 2.2.4.1. 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

- *Phương pháp xác định các thuộc tính cơ học của vật liệu PHA*

- Chuẩn bị mẫu màng PHA: Hòa tan sản phẩm PHA vào chloroform cho đến tan hoàn toàn. Trải lượng dịch này lên đĩa Petri đã được chỉnh thăng bằng và đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng cho đến khi thu được màng PHA khô.



Hình 2.4. Các bước chuẩn bị mẫu và phân tích cơ học vật liệu PHA

- Tiến hành phân tích: Màng PHA được cắt theo hình 2.4-A, các giá trị kích thước bề ngang và độ dày của màng được xác định bằng thiết bị Micrometer. Đặt mẫu màng PHA vào giữa hai khung giấy đã được chuẩn bị sẵn (hình 2.4-B, C). Thuộc tính cơ học của vật liệu PHA được kiểm tra trên máy phân tích sức căng Shimadzu EZTest (Nhật). Đưa mẫu lên máy, kẹp chặt hai đầu của bản mẫu bằng các thanh kẹp và tiến hành phân tích tự động (hình 2.4-D, E).

Phương pháp xác định thuộc tính nhiệt của vật liệu PHA [30]

Thuộc tính nhiệt của vật liệu PHA được phân tích trên máy quét nhiệt vi sai DSC 60A (Shimadzu, Nhật). Cân 0,3 mg mẫu PHA cho vào khay nhôm, đậy nắp và ép chặt nắp với khay bằng thiết bị chuyên dụng. Mẫu đối chứng là khay nhôm không có PHA. Đưa cả mẫu đối chứng và thí nghiệm lên máy và tiến hành phân tích. Chu trình nhiệt được thực hiện như sau: (1) nhiệt độ mẫu được đưa lên 190 ^{o}C với tốc độ 10 ^{o}C/phút và giữ trong 2 phút, (2) nhiệt độ mẫu được hạ xuống – 40 ^{o}C với tốc độ -20 ^{o}C/phút, (3) nhiệt độ mẫu tiếp tục được tăng lên 190 ^{o}C với tốc độ 10 ^{o}C/phút. Dựa trên đường thay đổi mức năng lượng trong quá trình biến thiên nhiệt độ của mẫu để xác định các giá trị nhiệt độ hóa tinh thể (T_g) và điểm nhiệt độ nóng chảy (T_m).

Phương pháp sắc kí gel thẩm thấu (GPC)

Khối lượng phân tử trung bình (M_w), trung bình khối lượng phân tử (M_n), độ phân tán (PDI) của PHA được xác định dựa trên phân tích sắc kí gel thẩm thấu (GPC). Mẫu PHA được hòa vào chloroform để đạt được nồng độ 1 mg/ml. Quá trình phân tích được tiến hành trên hệ thống sắc kí 1200 GPC (Agilent, Mỹ) sử dụng đầu dò khúc xạ (RI) và hệ cột phân tích Shodex K-802 và K-806M (Showa Denko, Tokyo, Nhật Bản) ở 40 ^oC. Chloroform được sử dụng làm pha động với tốc độ dòng 1 ml/phút [30]. Các giá trị M_w, M_n, PDI được xác định dựa trên phần mềm chương trình của máy.

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

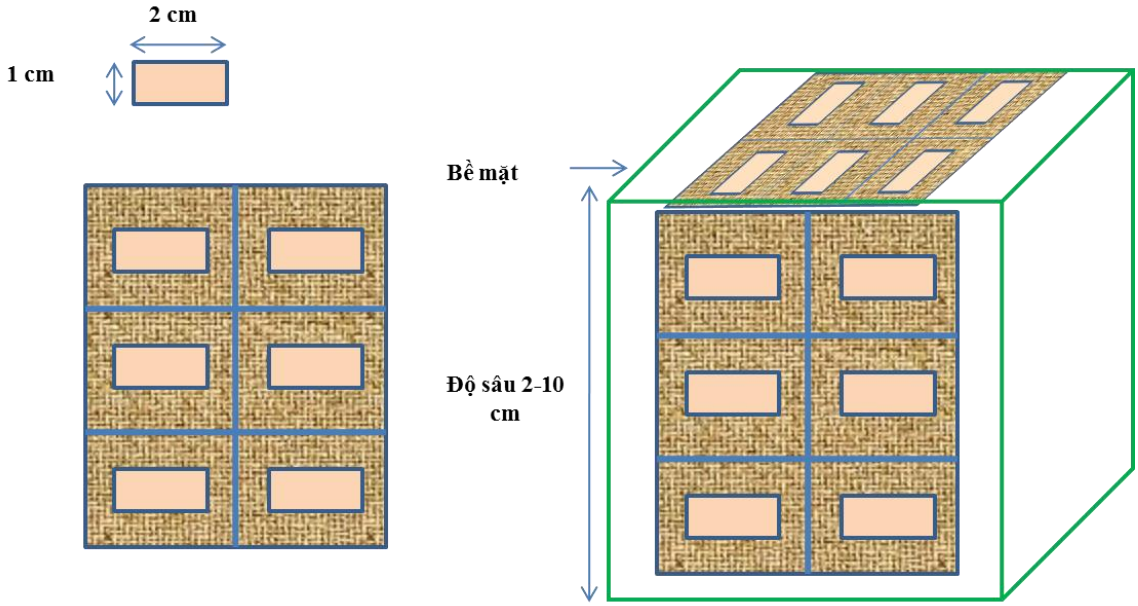
2.2.6.1. Phương pháp tạo vật liệu màng PHA

Sản phẩm PHA được hòa trong chloroform cho đến tan hoàn toàn. Trải dịch thu được lên đĩa Petri sạch đã được đặt thăng bằng và cố định. Phủ một lớp màng nhôm có đục lỗ nhỏ lên phía trên đĩa Petri và để ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 h. Màng PHA thu được có màu trong, dai. Để màng PHA ổn định ở nhiệt độ phòng trong thời gian 7 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm kiểm tra phân hủy sinh học [178].

2.2.6.2. Thí nghiệm nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA [178]

Mẫu màng PHA được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước 1 x 2 cm. Các mẫu được cân trước khi tiến hành thí nghiệm (m_1) và được đặt trong các túi lưới (hình 2.5). Thí nghiệm phân hủy được tiến hành ở 3 địa điểm với hai loại mẫu (thu hồi nhờ chloroform – kí hiệu NT, thu hồi nhờ NaOH – kí hiệu T) có độ dày khác nhau (0,06 mm và 0,12 mm) trong điều kiện bề mặt (S) hoặc chôn lấp (B). Các mẫu được kí hiệu thống nhất theo quy luật sau: *Địa điểm thí nghiệm – Loại mẫu thí nghiệm và độ dày – điều kiện thí nghiệm*. Ví dụ: L_1-NT_1-S là thí nghiệm được thực hiện ở địa điểm 1 với mẫu PHA thu hồi nhờ chloroform có độ dày 0,06 mm và điều kiện thí nghiệm bề mặt.

Các mẫu được chôn lấp ở các vị trí thí nghiệm khác nhau với các độ sâu khác nhau. Sau các khoảng thời gian khác nhau, các túi mẫu được thu thập, rửa bằng nước cất. Các mẫu PHA được sấy khô ở nhiệt độ 40 ^oC trong thời gian 24 h.



Hình 2.5. Mô hình thí nghiệm nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học

Cân khối lượng mẫu sau khi sấy khô (m_2) và xác định mức độ giảm khối lượng của mẫu. Sự thay đổi trạng thái bề mặt của mẫu màng thí nghiệm được xác định trên kính hiển vi điện tử quét (SEM). Thay đổi cấu trúc hóa học của sợi PHA được xác định dựa trên phân tích sắc kí gel thẩm thấu (GPC).

2.2.7. Phương pháp toán học

Các số liệu phân tích được thu thập và xử lý thống kê theo hàm ANOVA dựa trên chương trình MS Excel. Các giá trị thu được đem so sánh chuẩn Fisher ở mức ý nghĩa 95 %.

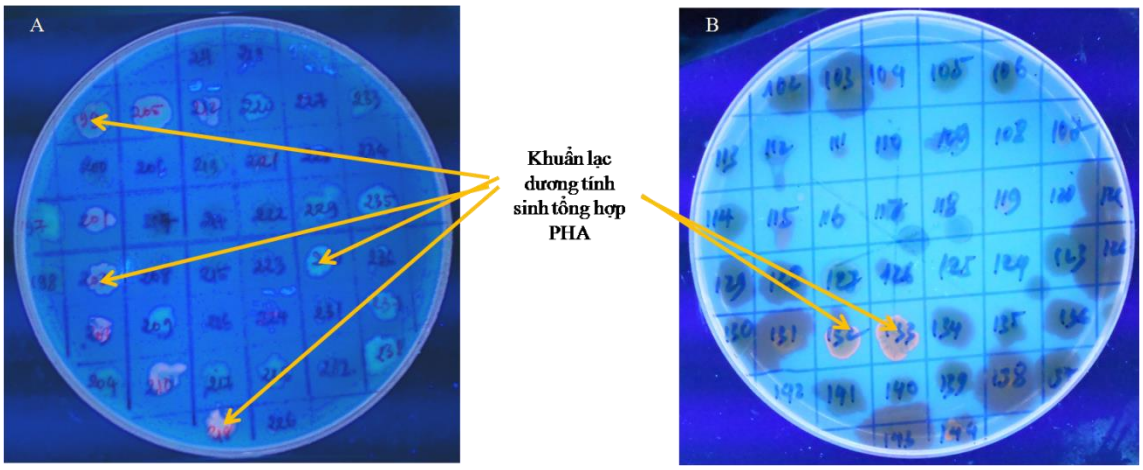
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Các mẫu đất, bùn và nước thải thu thập tại các điều kiện sinh thái khác nhau chúng tôi đã tiến hành phân lập và tách thuần được 869 chủng vi khuẩn, trong đó có 300 chủng từ đất RNM Yên Hưng – Quảng Ninh, 425 chủng thu được từ đất RNM Giao Thủy – Nam Định, và 144 chủng từ đất – bùn – nước thải từ làng nghề sản xuất bún Mạch Tràng. Tập hợp các vi khuẩn này được sử dụng làm nguồn tuyển chọn chủng giống vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA.

Nuôi cấy các chủng vi khuẩn này trên môi trường sử dụng glucose là nguồn C duy nhất và có bổ sung chất chỉ thị Nile Blue A. Sau 48 h, sàng lọc các chủng có khả năng sinh tổng hợp PHA bằng cách soi dưới tia UV ở bước sóng 254 nm (hình 3.1) kết hợp với quan sát các thể ẩn nhập trong tế bào trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000x. Kết quả chúng tôi thu được 50 chủng vi khuẩn (chiếm khoảng 6 % tổng số các chủng phân lập được) có biểu hiện dương tính (khuẩn lạc phát màu cam sáng khi được chiếu tia UV – hình 3.1) và có xuất hiện các thể ẩn nhập khi quan sát dưới kính hiển vi quang học, trong đó 17 chủng có nguồn từ đất RNM Yên Hưng – Quảng Ninh (chiếm 5,67 % tổng số chủng phân lập 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 % các 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 các chủng phân lập được taại 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).



Hình 3.1. Hình ảnh tuyển chọn sơ bộ các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA trên môi trường có chứa Nile Blue A

(A – Các vi khuẩn từ rừng ngập mặn; B – Các vi khuẩn từ làng sản xuất bún Mạch Tràng)

Dựa trên kết quả thu được chúng tôi thấy rằng chỉ khoảng 6 % trong tổng số 869 chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện khả năng tích lũy PHA (khi sử dụng glucose như là nguồn C). Tỷ lệ xuất hiện vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA dao động từ 3 % đến 13,9 % tùy theo khu vực lấy mẫu đất. Trong đó khu vực làng bún Mạch Tràng (Đông Anh, Hà Nội) có tỷ lệ cao hơn so với hai khu vực đất ngập mặn (Yên Hưng – Quảng Ninh; Giao Thủy – Nam Định). Hàm lượng dinh dưỡng cao, đặc biệt là nguồn C dồi dào, có thể là nguyên nhân chính khiến cho tỷ lệ các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA ở khu vực làng sản xuất bún cao hơn so với hai khu vực nghiên cứu còn lại. Kết quả tỷ lệ vi khuẩn đất có khả năng sinh tổng hợp PHA thu được trong nghiên cứu này là khá tương đồng với một số công bố khác. Nghiên cứu của Kung và Cs (2007) cho thấy có khoảng 10 % trong tổng số 1027 chủng vi khuẩn phân lập được ở các điều kiện sinh thái đất khác nhau có biểu hiện tích lũy PHA [107]. Các kết quả thu được khi phân lập vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA ở các điều kiện sinh thái đất vườn và đất ngập mặn ven biển của Shrivastav và Cs (2010) cũng cho kết quả tương tự với 23/160 chủng (khoảng 14 %) thể hiện dương tính khi sử dụng nguồn phụ phẩm của công nghiệp sản xuất biodiesel [167]. Chỉ có 4/42 (chiếm 9,5 %) chủng vi khuẩn phân lập được từ các vùng ngập mặn khác nhau thể hiện khả năng sinh tổng hợp PHA đã được Arun và Cs (2009) công bố [23]. Trong khi đó theo Wu và Cs (2000) tỷ lệ các vi khuẩn có

khả năng sinh tổng hợp PHA trong đất có thể cao hơn và lên tới 30 % [210]. Mặc dù vậy một số nghiên cứu cũng đã chứng minh rằng việc sử dụng các kỹ thuật phân lập truyền thống thường cho kết quả phát hiện vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA thấp hơn nhiều so với các phương pháp sử dụng kỹ thuật phân tử nhằm phát hiện sự có mặt của gen *pha*C ở các vi khuẩn phân lập từ đất [67].

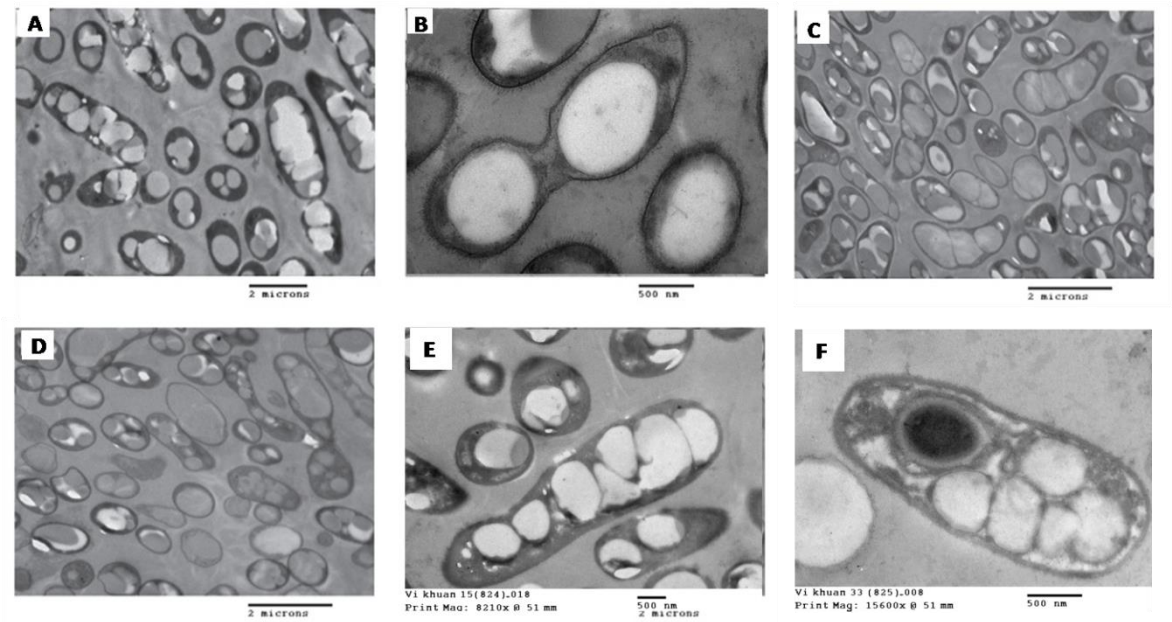
3.1.2. Khả năng sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn (50 chủng) thu được thông qua quá trình chọn lọc sơ bộ được nuôi cấy trên môi trường lên men tuyển chọn với nguồn C là glucose. Sinh khối sau nuôi cấy được làm khô và tiến hành phân tích định lượng nhằm xác định chính xác khả năng sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn này. Kết quả phân tích cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng tích lũy PHA với các mức độ khác nhau (phụ lục 5). Phần lớn các chủng vi khuẩn có mức độ tích lũy thấp hơn 20 %wt. Trong khi 10 chủng vi khuẩn (với các kí hiệu NĐ97, NĐ153, NĐ199, NĐ218, NĐ240, QN187, QN194, QN271, MT15, và MT33) có khả năng tích lũy PHA nội bào trên 20 %wt như trình bày ở bảng 3.1.

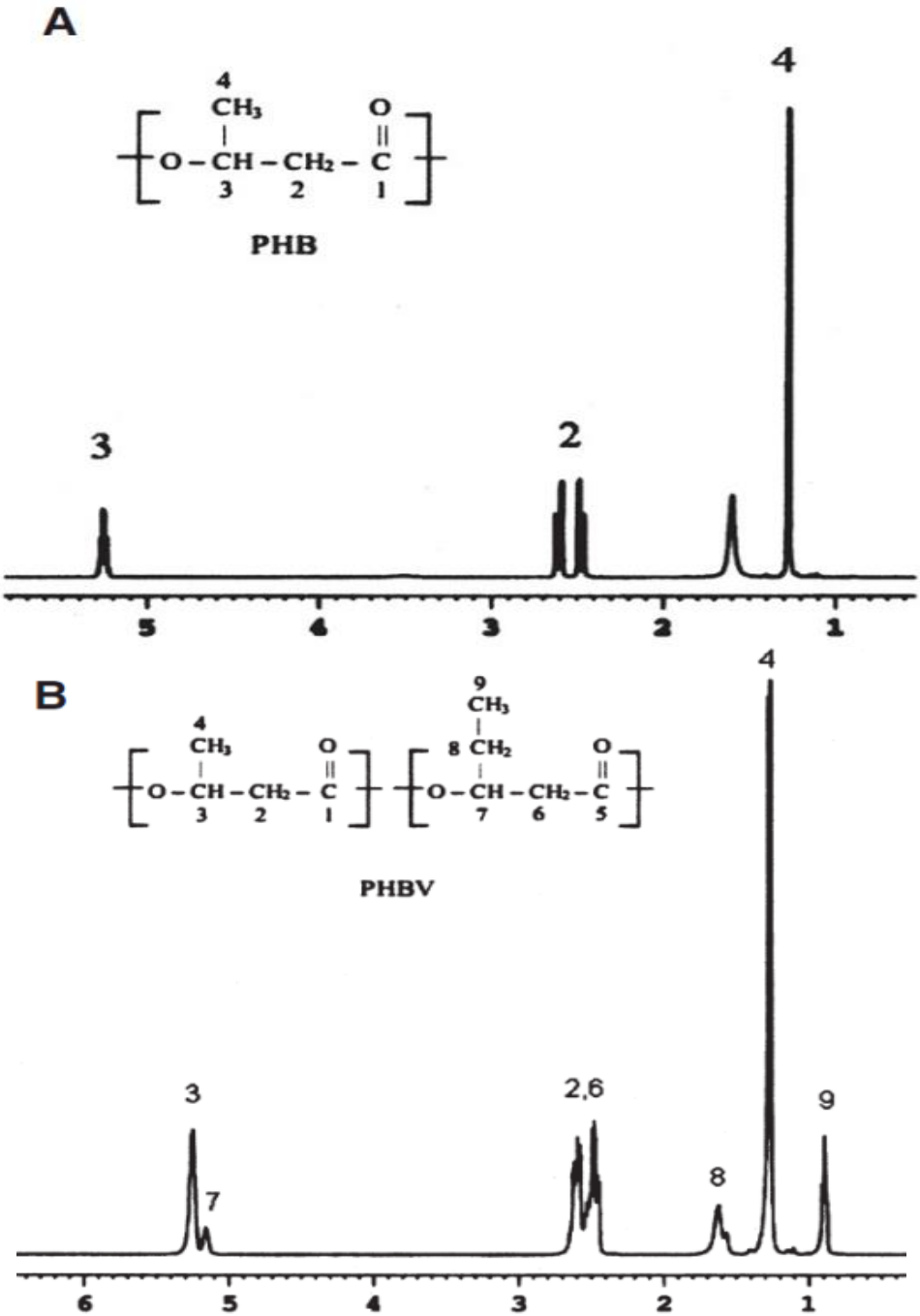
Trong số 10 chủng vi khuẩn ở trên, chủng vi khuẩn kí hiệu NĐ153 thể hiện khả năng sinh tổng hợp polymer cao nhất với hàm lượng tích lũy đạt 65 %wt. Trong cùng điều kiện nuôi cấy, các chủng vi khuẩn được kí hiệu NĐ97, QN187, QN271, MT15, MT33 thể hiện mức độ tích lũy PHA thấp hơn (48 %wt; 44 %wt; 48 %wt; 53 %wt; và 51 %wt, theo thứ tự). Ba chủng vi khuẩn còn lại có hàm lượng PHA trong tế bào đạt dưới 35 %wt (bảng 3.1). Tiến hành phân tích tế bào của 10 chủng vi khuẩn này bằng phương pháp nhuộm soi trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000x chúng tôi thấy rằng tế bào các chủng vi khuẩn này đều có chứa các khoảng sáng nội bào không bắt màu (phụ lục 6). Tiến hành phân tích kỹ hơn trên kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương) chúng tôi thấy rằng tế bào các chủng vi khuẩn này đều tích lũy các hạt polymer phân bố ngẫu nhiên trong tế bào với số lượng trung bình dao động từ 2 - 5 hạt/tế bào và có màu trắng với kích thước khác nhau (hình 3.2).

Bảng 3.1. Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn (trích từ phụ lục 5)

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



Hình 3.2. Ảnh chụp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) hạt PHA được tích lũy nội bào bởi các chủng vi khuẩn tuyển chọn
(A – NĐ153; B – NĐ199; C – QN187; D – QN271; E – MT15; F – MT33)



Hình 3.3. Phổ 500 MHz 1H-NMR của P(3HB) tách chiết từ sinh khối chủng QN194 (A) và NĐ199 (B) khi nuôi cấy trên nguồn glucose

PHA được tổng hợp từ 10 chủng vi khuẩn này được tách chiết và tiến hành phân tích cộng hưởng từ hạt nhân proton ^{1}H-NMR tại Viện Hóa Học (Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam) nhằm xác định chính xác thành phần cấu tạo của chúng. Kết quả cho thấy các mẫu PHA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn

NĐ199, NĐ218, MT15, và MT33 có phổ tương đồng với phổ của loại copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] với hàm lượng phân đoạn 3HV từ 2-3 mol%. Trong khi poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn còn lại (bảng 3.1, hình 3.3).

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

10 chủng vi khuẩn tuyển chọn được tiến hành phân tích các đặc điểm về hình thái tế bào và khuẩn lạc theo các phương pháp được trình bày ở mục 2.2.1.6 (chương 2). Kết quả phân tích được trình bày tóm tắt dưới đây với hình ảnh được trình bày chi tiết trong phần phụ lục 7.

Chủng vi khuẩn NĐ97, khuẩn lạc dẹt, trắng ngà, bề mặt gợn, không bóng, khuẩn lạc không tròn, có mép răng cưa. Có chấm ở giữa hơi lồi, màu sẫm. Đường kính khuẩn lạc d: 14,0-15,0 mm. Tế bào hình que ngắn, kích thước dao động 0,7-1,2 x 1,6-3,0 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương có khả năng hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn NĐ153, khuẩn lạc dẹt, màu trắng ngà, bề mặt có gợn. Khuẩn lạc không tròn có mép răng cưa. Có chấm ở giữa hơi lồi, màu sẫm. Đường kính khuẩn lạc d: 8,0-10,0 mm. Tế bào hình que ngắn, kích thước dao động 0,8-1,2 x 2,0-3,5 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương có khả năng hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn QN194, khuẩn lạc dẹt, hơi bóng, màu trắng ngà. Bề mặt gợn, khuẩn lạc không tròn có mép răng cưa. Có chấm ở giữa hơi lồi. Đường kính khuẩn lạc d: 9,0-14,0 mm. Tế bào hình que ngắn, kích thước dao động 0,5-0,7 x 1,0-2,5 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương có khả năng hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn QN187, khuẩn lạc tròn, hơi lồi, màu vàng sẫm. Bề mặt bóng, trơn nhẵn, nhầy nhớt. Đường kính khuẩn lạc d: 5,0-7,0 mm. Tế bào hình que ngắn, có khả năng di động, kích thước tế bào dao động từ 0,4-0,7 x 1,5-3,0 µm. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm không hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn NĐ199, khuẩn lạc tròn, hơi lồi, màu vàng sẫm. Bề mặt bóng,

trơn nhẵn, nhầy nhớt, không viền. Đường kính khuẩn lạc d: 5,0-7,0 mm. Tế bào hình que ngắn, kích thước dao động 0,8-1,1 x 1,2-2,2 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm không hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn NĐ218, khuẩn lạc tròn nhỏ, hơi lồi, màu vàng sẫm. Bề mặt bóng, trơn nhẵn, nhầy nhớt. Đường kính khuẩn lạc d: 2,5-3,0 mm. Tế bào hình que ngắn, kích thước dao động từ 0,4-0,6 x 1,0-3,0 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm không hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn NĐ240, khuẩn lạc tròn, hơi lồi, màu vàng sẫm. Bề mặt bóng, trơn nhẵn, nhầy nhớt, không viền. Đường kính khuẩn lạc d: 4,0-5,0 mm. Tế bào có dạng hình que ngắn, kích thước dao động từ 0,3-0,5 x 1,5-3,5 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm không hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn QN271, Khuẩn lạc tròn, hơi lồi, màu vàng sẫm. Bề mặt bóng, trơn nhẵn, nhầy nhớt, không viền, không có chấm ở giữa. Đường kính khuẩn lạc d: 4,0-5,0 mm. Tế bào có dạng hình que ngắn, kích thước dao động từ 0,4-0,7 x 1,4-2,5 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm không hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn MT15, Khuẩn lạc tròn đều, khô, màu trắng ngà, mép khuẩn lạc có viền răng cưa. Đường kính khuẩn lạc d: 3,0-5,0 mm. Tế bào có dạng hình que, tế bào lớn kích thước dao động từ 1,25-1,35 x 4,1-6,94 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương có khả năng hình thành nội bào tử.

Chủng vi khuẩn MT33, Khuẩn lạc tròn đều, màu vàng nhạt, lồi ở giữa, mép khuẩn lạc trơn. Đường kính khuẩn lạc d: 4,0-6,0 mm. Tế bào hình que ngắn, kích thước dao động từ 1,01-1,35 x 2,14-2,95 µm, có khả năng di động. Được xác định thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương có khả năng hình thành nội bào tử.

Kết quả phân tích cho thấy các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất ở cả 3 khu vực thu thập mẫu phân bố ở cả hai nhóm vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Nhiều nghiên cứu đã công bố về các vi khuẩn sinh tổng hợp PHA cũng cho những kết quả tương tự như trong nghiên cứu của chúng tôi. Trong số 15 chủng vi

khuẩn thể hiện khả năng sinh tổng hợp PHA phân lập được từ các nguồn bùn thải của công nghiệp giấy được Bhuwal và Cs (2013) công bố thì có 4 chủng được xếp vào nhóm Gram âm và 6 chủng còn lại thuộc vi khuẩn Gram dương [30].

Tổng hợp kết quả phân tích các đặc điểm hình thái cùng với các kết quả phân tích định lượng thu được ở trên (mục 3.1.2) chúng tôi kết luận cả 10 chủng vi khuẩn tuyển chọn được đều có khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA tốt trên nguồn C là glucose. Tuy nhiên trong quá trình thực nghiệm chúng tôi nhận thấy hai chủng vi khuẩn MT15 và MT33 phân lập được từ làng sản xuất bún Mạch Tràng là các vi khuẩn thuộc nhóm Gram dương, đồng thời có hiện tượng hình thành nội bào tử khá sớm trong quá trình nuôi cấy tích lũy PHA (hình 3.1-E và 3.1-F). Đây là những đặc điểm bất lợi đối với quá trình sản xuất PHA bởi: (1) sự hình thành bào tử trong quá trình nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và tích lũy polymer của tế bào, và (2) gây khó khăn trong quá trình tách chiết-thu hồi và tinh sạch sản phẩm, (3) rất ít các chủng vi khuẩn Gram dương được nghiên cứu và sử dụng trong sản xuất hiện nay bởi khó khăn trong quá trình tách chiết-thu hồi sản phẩm. Ngoài ra, trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu công bố về các vi khuẩn sinh tổng hợp PHA phân lập từ các hệ sinh thái nước ngọt, song lại có rất ít các nghiên cứu về nhóm vi khuẩn này ở hệ sinh thái đất rừng ngập mặn. Vì vậy chúng tôi quyết định lựa chọn 8 chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được phân lập từ đất rừng ngập mặn để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về đa dạng và khả năng sinh tổng hợp PHA.

3.1.4. Đặc điểm sinh lý – hóa sinh của các chủng vi khuẩn tuyển chọn phân lập từ đất rừng ngập mặn

Tóm tắt các đặc điểm sinh lý-hóa sinh của 8 chủng vi khuẩn tuyển chọn được trình bày ở bảng 3.2. 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. Trong khi phần lớn các vi khuẩn tuyển chọn có pH sinh trưởng tối thích tương đối trung tính (6,0 đến 7,0) thì hai chủng NĐ218 và NĐ240 lại sinh trưởng tốt trong môi trường bazơ nhẹ (7,0 – 8,0).

Phân tích tác động của nồng độ muối NaCl đến khả năng sinh trưởng của cả 8 chủng vi khuẩn tuyển chọn, chúng tôi nhận thấy 3 chủng vi khuẩn Gram dương (NĐ97, NĐ153, QN194) có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong điều kiện nồng độ muối từ 0-10 ‰, chứng tỏ đây là các chủng vi khuẩn chịu mặn. Trong khi 5 chủng vi khuẩn Gram âm còn lại (với các kí hiệu NĐ199, NĐ218, NĐ240, QN187, QN271) lại sinh trưởng tốt trong điều kiện độ mặn cao hơn nhiều. Nồng độ NaCl thích hợp cho 5 chủng này dao động từ 30 ‰ đến 70 ‰ (bảng 3.2).

Rừng ngập mặn là khu vực giao thoa giữa môi trường nước ngọt và nước mặn, ở đó sự thay đổi nồng độ muối được diễn ra một cách rất thường xuyên. Đây có thể là nguyên nhân giải thích mức độ đáp ứng đa dạng với các nồng độ muối khác nhau của các vi khuẩn phân lập được từ khu vực này. Ngoài ra, việc tích lũy PHA nội bào không chỉ thực hiện nhiệm vụ tích trữ vật chất/năng lượng, mà nó còn đóng một vai trò giúp tế bào vi khuẩn sống sót trong những điều kiện bất lợi của môi trường [124-125]. Chính vì thế các chủng vi khuẩn chịu mặn mà chúng tôi phân lập được vẫn có thể tồn tại được trong điều kiện nồng độ muối cao của hệ sinh thái đất rừng ngập mặn.

Chúng tôi cũng đã tiến hành so sánh các đặc điểm sinh lý – hóa sinh của 8 chủng vi khuẩn phân lập từ đất RNM với với hai chủng vi khuẩn có nguồn gốc từ hệ sinh thái ngập mặn đã được nghiên cứu rất kỹ là *Bacillus cereus* và *Yangia pacifica* [50, 102]. Hầu hết các đặc điểm hình thái và sinh lý – hóa sinh của 3 chủng vi khuẩn Gram dương là khá tương đồng so với ở loài *B. cereus* trừ một vài khác biệt nhỏ. Kết quả tương tự thu được khi chúng tôi đối chiếu các đặc điểm của 5 chủng vi khuẩn Gram âm thu được với chủng vi khuẩn *Yangia pacifica*. Phần lớn các đặc điểm hình thái và sinh lý – hóa sinh của các chủng này là tương tự nhau và giống với ở *Y. pacifica*. Bên cạnh đó có một vài điểm khác biệt về khả năng sinh tổng hợp các enzyme thủy phân casein, gelatin, tinh bột cũng như khả năng sử dụng một số nguồn C (bảng 3.2).

Bảng 3.2. Đặc điểm sinh lý – hóa sinh của các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất rừng ngập mặn

Đặc điểm	**NĐ97**	**NĐ153**	**QN194**	***B. cereus* [102]**	**QN187**	**NĐ199**	**NĐ218**	**NĐ240**	**QN271**	***Y. pacifica* [50]**
1. Điều kiện sinh trưởng tối thích										
Nhiệt độ (^oC)	35-37	35-37	37-40	37	30-33	30-33	33-35	30-33	33-35	37
pH	6-7	6-7	6-7	6-8	6.5-7.5	6.5-7.5	7-8	7-8	6.5-7.5	7.5
NaCl (‰, w/v)	0-10	0-10	0-10	<20	20-30	40-50	60-70	40-50	40-50	50
Hiếu khí	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
2. Đặc điểm sinh lý										
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
Urease	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Caseinase	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Amylase	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Tạo indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thử Methyl đỏ	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Thử Voges-Proskauer	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3. Sử dụng nguồn C										

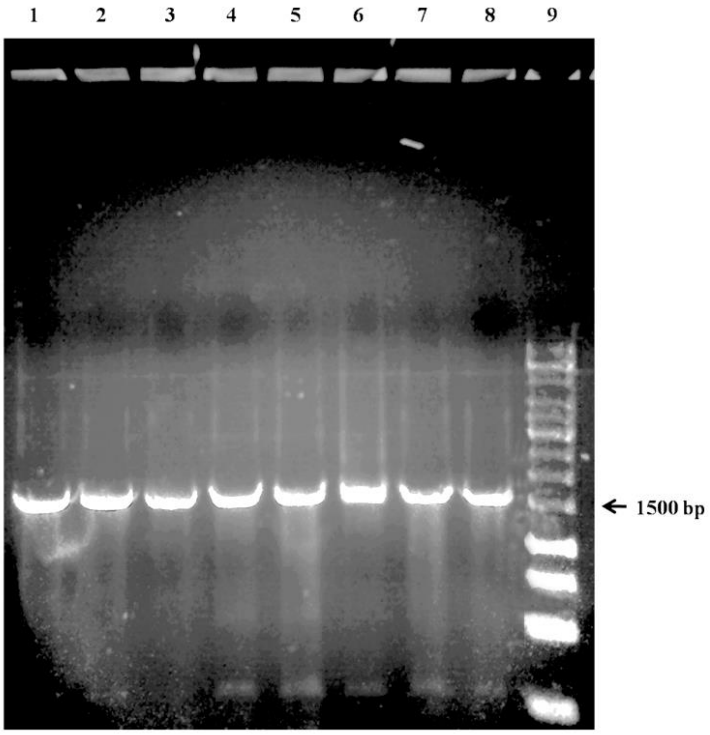
Citrate	-	-	+	+	+	+	+	+	+	NR
D-Galactose	-	-	+	-	+	+	+	+	+	NR
D-Gluconate	-	-	+	-	+	+	+	+	+	NR
D-Fucose	-	-	-	NR	+	+	+	+	+	NR
L-Fucose	-	-	-	NR	+	+	+	+	+	NR
L-Arabitol	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	NR
Tinh bột	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
D-Rafinose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	NR
Maltodextrin	+	+	+	NR	+	+	+	+	+	NR
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	NR
D-Xylose	-	-	+	-	+	+	+	+	+	NR
Inositol	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Sorbitol	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Inulin	+	+	+	NR	+	+	+	+	+	NR
Salicin	-	-	+	+	-	-	-	-	-	NR
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Carboxyl methyl cellulose	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	NR
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NR
α-Methyl-D-mannose	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	NR
α-Methyl-D-glucose	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	NR
Dextrin	+	+	+	NR	+	+	+	+	+	NR
Glycerol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	NR
Rỉ đường	+	+	+	NR	+	+	+	+	+	NR

(Ghi chú: +: dương tính; - : âm tính; NR : không nghiên cứu)

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

Vật liệu di truyền của 8 chủng vi khuẩn tuyển chọn phân lập từ đất RNM được tách chiết để tiến hành khuếch đại đoạn trình tự gen 16S rADN bằng phản ứng PCR (hình 3.4), sản phẩm được gửi sang công ty Bioneer (Hàn Quốc) để tiến hành xác định trình tự nucleotide. Dựa trên việc so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rADN thu được từ các chủng vi khuẩn với các trình tự lưu trữ trên GeneBank chúng tôi thấy rằng các chủng vi khuẩn với kí hiệu NĐ97, NĐ153, QN194 có mối quan hệ gần gũi với các loài thuộc chi *Bacillus*. Trong đó chủng vi khuẩn NĐ97 và NĐ153 có quan hệ gần gũi với nhau (với mức độ tương đồng đạt 98,3 %) và gần gũi với loài *B. cereus* (99,3 % và 98 %, theo thứ tự). Trong khi mức độ tương đồng trình tự 16S rADN của chủng QN194 là 98,2 % so với trình tự của hai chủng *Bacillus aryabhattaii* và *Bacillus megaterium* (hình 3.5-A).

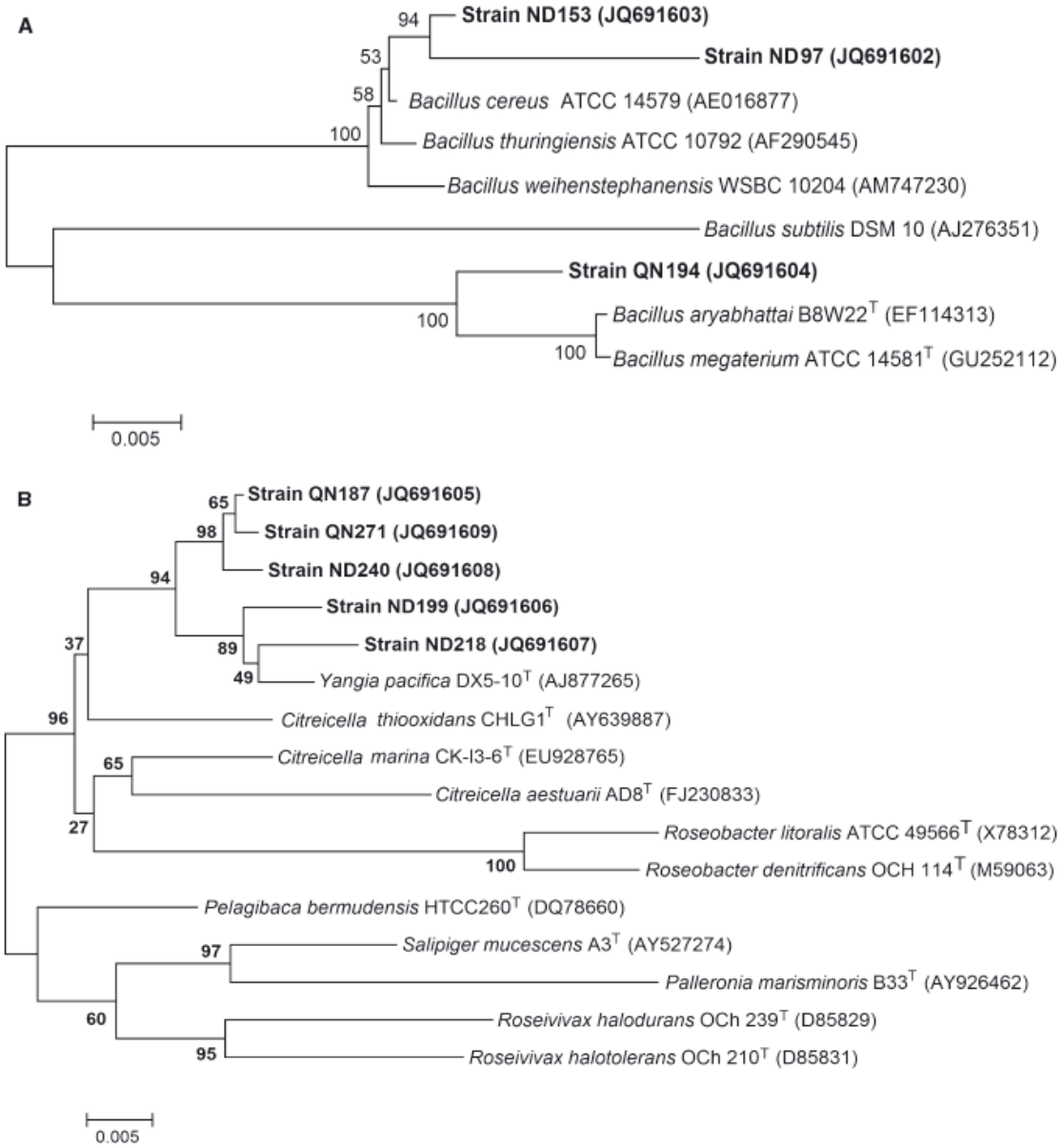


Hình 3.4. Kiểm tra kết quả phản ứng khuếch đại trình tự 16S rADN trên agarose

(Thứ tự giếng từ 1-9 như sau: NĐ97; NĐ153; QN194; QN187; NĐ199; NĐ218; NĐ240; QN271; 1 kb ladder)

Tiến hành phân tích tương tự với các chủng vi khuẩn Gram âm (QN187, QN271, NĐ199, NĐ218, và NĐ240) chúng tôi nhận thấy rằng chúng có mối quan

hệ gần gũi với loài *Yangia pacifica* thuộc nhóm α-proteobacterium. Mức độ tương đồng trình tự 16S rADN của các chủng này với *Yangia pacifica* dao động từ 98,4 % đến 98,9 %. Bên cạnh đó, các vi khuẩn nhóm α-proteobacterium khác thuộc các chi *Citreicella* và *Roseivivax* có mức độ tương đồng tới 97.4 % với 5 chủng vi khuẩn nói trên (hình 3.5-B).



Hình 3.5. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA phân lập từ đất rừng ngập mặn

Tóm lại, dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý - hóa sinh, kết hợp với các phân tích di truyền chúng tôi đã có thể định loại và đặt tên cho các chủng vi khuẩn

tuyển chọn phân lập từ đất rừng ngập mặn như sau: *Bacillus* sp. NĐ97, *Bacillus* sp. NĐ153, *Bacillus* sp. QN194, *Yangia* sp. NĐ199, *Yangia* sp. NĐ218, *Yangia* sp. NĐ240, *Yangia* sp. QN187, *Yangia* sp. QN271. Các trình tự 16S rADN của 8 chủng vi khuẩn này đã được chúng tôi đăng ký trên cơ sở dữ liệu NCBI với các kí hiệu từ JQ691602 đến JQ691609 (chi tiết trong phần phụ lục 8).

Bacillus là chi vi khuẩn khá phổ biến trong tự nhiên, đồng thời đây cũng là chi tiềm năng với nhiều loài đã được báo cáo có khả năng sinh tổng hợp PHA [166, 193]. P(3HB) là loại PHA phổ biến được tích lũy bởi các chủng thuộc chi này trên nguồn cacbohydrate, ngoài ra một số ít chủng có thể tích lũy các copolymer khi được bổ sung nguồn tiền chất C thích hợp [193]. Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được đối với 3 chủng vi khuẩn được xác định thuộc chi *Bacillus* (NĐ97, NĐ153, QN194) cũng không phải ngoại lệ với sản phẩm PHA chỉ chứa phân đoạn 3HB khi sinh trưởng trên nguồn C là glucose. Nhiều nghiên cứu đã được công bố gần đây đối với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* phân lập từ môi trường ngập mặn cũng thu được những kết quả tương tự như trong nghiên cứu của chúng tôi [54, 126, 159, 200].

Ngoài chi *Bacillus,* các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA được phân lập từ môi trường ngập mặn là khá đa dạng thuộc nhiều chi như *Staphylococcus, Micrococcus, Rhodococcus, Methylobacterium* [126],*Paracoccus* [126, 127], *Vibrio* [23, 140], *Pseudomonas* [200], *Shaccharophagus* [71] đã được công bố gần đây. Bên cạnh đó, nhiều chủng vi khuẩn ưa mặn phân lập tại các môi trường nước mặn thuộc chi *Halomonas* đã được chứng minh có tiềm năng trong sản xuất PHA [36, 104, 149, 166]. Hầu hết các chi vi khuẩn này cũng đều thuộc nhóm vi khuẩn proteobacteria. Bên cạnh đó, các kết quả thu được của nghiên cứu này cho thấy khả năng tích lũy PHA đa dạng (cả P(3HB) và P(3HB-co-3HV)) của các vi khuẩn phân lập từ đất rừng ngập mặn thuộc chi *Yangia*. Trong khi đó, bên cạnh các dẫn liệu về đặc điểm hình thái, sinh lý – hóa sinh, thì chủng vi khuẩn *Yangia pacifica* DX5-10T chỉ được nhắc tới khả năng tích lũy P(3HB) [50].

Cho đến nay các dẫn liệu được công bố về hệ vi khuẩn sinh tổng hợp PHA ở Việt Nam còn rất hạn chế. Chủng vi khuẩn V23-X1.1 đã được Mai và Cs (2010) phân lập được từ vỏ xoài cát có khả năng sinh tổng hợp P(3HB) khi sử dụng nguồn

glucose và được định danh đến loài *Bacillus cereus* [4]. Nhóm nghiên cứu Viện Công nghệ Sinh học (Viện Hàn lâm & Khoa học Việt Nam) đã sử dụng chủng vi khuẩn đột biến *Alcaligenes latus* VN1-20 trong nghiên cứu sản xuất P(3HB) [1]. Tuy nhiên, chưa có nhóm nghiên cứu nào công bố khả năng sinh tổng hợp PHA từ các vi khuẩn phân lập từ đất thu thập ở Việt Nam. Kết quả thu được trong nghiên cứu của chúng tôi góp phần bổ sung số liệu về sự đa dạng của hệ vi khuẩn đất có khả năng sinh PHA ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, ngoài các chủng vi khuẩn chịu mặn thuộc chi *Bacillus* (NĐ97, NĐ153, QN194) có khả năng sinh tổng hợp P(3HB) thì các chủng vi khuẩn ưa mặn thuộc chi *Yangia* có khả năng tích lũy cả P(3HB) (ở chủng NĐ240, QN187, QN271) và P(3HB-co-3HV) (chủng NĐ199 và NĐ218) cũng đã được chúng tôi xác định.

Như vậy, từ 50 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng tích lũy PHA (30 chủng từ đất rừng ngập mặn; 20 chủng từ đất bùn và nước thải làng nghề sản xuất bún), chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sâu hơn về 8 chủng vi khuẩn tiềm năng nhất. Trong số đó chủng vi khuẩn NĐ199 được chúng tôi lựa chọn cho các nghiên cứu sâu hơn về lên men và tinh sạch polymer bởi các lí do sau: (1) thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, (2) có khả năng tích lũy copolymer P(3HB-*co*-3HV). Bên cạnh đó chủng vi khuẩn này đã được phân tích di truyền và được xác định rất gần gũi với loài *Yangia pacifica* DX5-10T và được định tên là *Yangia* sp. NĐ199. *Yangia* là một chi khá mới trong hệ thống phân loại với số lượng thành viên được công bố vô cùng khiêm tốn. Đặc biệt chưa có công trình nào trước đây trên thế giới và Việt Nam nghiên cứu một cách hệ thống và chi tiết về khả năng tích lũy PHA bởi các vi khuẩn thuộc chi này.

3.2. Nghiên cứu các điều kiện lên men tích lũy PHA của chủng vi khuẩn *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 C

Đối với các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA thì nguồn C không chỉ cung cấp vật liệu và năng lượng cấu trúc tế bào mà đây còn là nguồn nguyên liệu

chính phục vụ cho quá trình tích lũy các hạt polymer nội bào. Nguồn C có ảnh hưởng quan trọng đến quá trình trao đổi chất nội bào qua đó chi phối con đường sinh tổng hợp PHA của tế bào vi khuẩn.

Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra ảnh hưởng của một số nguồn C thông thường đến sinh trưởng và mức độ tích lũy hạt PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Kết quả trình bày ở bảng 3.3 cho thấy rằng trong số các nguồn C thử nghiệm thì fructose thể hiện như là nguồn C phù hợp nhất cho quá trình tích lũy polymer nội bào của chủng vi khuẩn này với hàm lượng PHA đạt được là 66,9 %wt. Tiếp đến là nguồn xiro ngô (thanh trùng và không thanh trùng) với hàm lượng PHA đạt lần lượt là 58,3 %wt và 54,6 %wt. Trên nguồn glucose, mặc dù mức độ tích lũy PHA nội bào có cải thiện hơn so với khi tuyển chọn sơ bộ, song giá trị này chỉ đạt 47,5 %wt thấp hơn khá nhiều so với khi nuôi cấy trên nguồn fructose. Rỉ đường và glycerol cũng là những nguồn C tiềm năng cho sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 với hàm lượng polymer đạt lần lượt là 35 % wt và 40,1 %wt. Mức độ tích lũy PHA nội bào của chủng vi khuẩn này chỉ đạt dưới 20 %wt khi nuôi cấy trên nguồn C là saccharose và maltose (bảng 3.3).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn C đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Nguồn C	**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

Bản chất của quá trình sinh tổng hợp PHA là một quá trình chuyển hóa vật chất nội bào có liên quan mật thiết và ảnh hưởng qua lại đến các con đường trao đổi chất của tế bào vi khuẩn. Đối với phần lớn các vi khuẩn hiếu khí, các loại đường hexose là nguồn C dễ được sử dụng nhằm phục vụ cho quá trình sinh trưởng và trao đổi chất. Trong trường hợp vi khuẩn sinh tổng hợp PHA, sự sinh trưởng nhanh chóng của quần thể tế bào có thể dẫn đến sự suy giảm nhanh của các thành phần môi trường khác như nguồn N và các nguyên tố khoáng gây nên tình trạng mất cân bằng dinh dưỡng. Chính vì vậy mức độ tích lũy PHA nội bào của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên các nguồn glucose, fructose và xiro ngô cao hơn so với những nguồn C còn lại. Bên cạnh đó, ảnh hưởng qua lại giữa quá trình sinh tổng hợp PHA với các hoạt động trao đổi chất nội bào khác nhằm cấu trúc tế bào vi khuẩn còn được thể hiện ở chỉ số khối lượng tế bào còn lại (residual cell mass – RCM). Mức độ tích lũy PHA nội bào diễn ra càng mạnh mẽ khiến cho mức độ sinh tổng hợp các thành phần cấu trúc tế bào trở nên yếu đi. Kết quả là sự tăng sinh khối tế bào tỷ lệ nghịch với mức độ tích lũy PHA nội bào (bảng 3.3).

Mặc dù glucose được sử dụng như là một nguồn C thông dụng trong nghiên cứu sinh tổng hợp PHA đối với nhiều loại vi khuẩn đã được công bố [95, 97, 131, 164]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi thấy rằng có sự khác biệt lớn về khả năng sinh trưởng và mức độ tích lũy PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên hai nguồn cơ chất glucose và fructose (bảng 3.3). Ở hầu hết vi khuẩn hiếu khí, quá trình chuyển hóa đường hexose thành axit pyruvic được thực hiện theo con đường đường phân. Theo con đường này, việc sử dụng fructose có thể giúp cho tế bào vi khuẩn chuyển hóa cơ chất C nhanh chóng hơn so với khi sử dụng glucose. Đây có thể nguyên nhân giải thích cho sự chênh lệch khá lớn về mức độ tích lũy PHA nội bào khi nuôi cấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên hai nguồn C này.

Một nguồn C rẻ tiền khác rất đáng quan tâm là nguồn rỉ đường từ công nghiệp sản xuất đường mía và đường củ cải. Kết quả trình bày ở bảng 3.3 cho thấy, mặc dù chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 chỉ tích lũy PHA nội bào đạt 35 %wt

song phân tích cho thấy giá trị RCM thu được cao gấp 1,5 lần so với khi sử dụng nguồn fructose. Bên cạnh thành phần chính là saccharose, rỉ đường còn chứa một lượng nhỏ đường đơn (glucose và fructose). Bởi vậy mức độ tích lũy PHA thu được của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khi nuôi cấy trên rỉ đường cao hơn so với khi sử dụng saccharose tinh khiết trong khi giá trị RCM đạt được không hề thua kém. Các kết quả thu được ở trên cho thấy rỉ đường và xiro ngô hoàn toàn có thể là là những nguồn C tiềm năng giúp giảm chi phí sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn này nếu có các công nghệ lên men phù hợp.

Trên các nguồn C thử nghiệm, sản phẩm P(3HB-co-3HV) thu được có thành phần phân đoạn 3HV thay đổi tùy vào từng trường hợp cụ thể. Mặc dù lượng PHA tích lũy cao nhất khi sử dụng fructose làm nguồn C, song hàm lượng 3HV lại chiếm tỷ lệ thấp (< 1 mol%). Trong khi ngược lại hàm lượng này đạt tới 20,5 mol% khi maltose được sử dụng làm nguồn C trong môi trường nuôi cấy. Sản phẩm PHA từ nguồn xiro ngô cũng chứa phân đoạn 3HV dao động từ 1,4 đến 1,6 mol%, đồng thời hàm lượng polymer tích lũy nội bào thu được khá cao (trên 54 %).

Sản phẩm P(3HB-co-3HV) thường được tổng hợp khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn trên nguồn C kết hợp giữa glucose và propionate hoặc valerate [94, 160, 186]. Tuy nhiên một số vi khuẩn cũng có thể sinh tổng hợp P(3HB-co-3HV) khi sử dụng cacbohydrate như là nguồn C duy nhất thông qua con đường sinh tổng hợp một số loại axit amin [128, 190]. Một số công bố cũng đã cho thấy các chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126 [78], *Bacillus* sp-256 [106], *Bacillus* sp. 88D [153], *Halogranum amyloticum* [219] có khả năng sinh tổng hợp P(3HB-co-3HV) khi nuôi cấy trên các nguồn đường đơn. Dựa vào hệ enzyme nội bào, vi khuẩn sử dụng các con đường trao đổi chất khác nhau để chuyển hóa nguồn C thành sản phẩm PHA như trình bày ở mục 1.3.2. Khả năng sinh tổng hợp P(3HB-co-3HV) của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khi được nuôi cấy trên các nguồn đường cho thấy có thể quá trình chuyển hóa vật chất để tạo PHA được thực hiện theo các con đường H và K (hình 1.5, mục 1.3.2). Tuy nhiên để xác định chính xác con đường chuyển hóa nguồn C thành PHA của chủng vi khuẩn này cần có những nghiên cứu phân tử sâu hơn nữa về các quá trình trao đổi chất nội bào.

Khả năng tích lũy PHA với hàm lượng cao và sản phẩm polymer chứa chủ yếu phân đoạn 3HB (> 99 %mol) thu được khi nuôi cấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên nguồn fructose. Vì vậy chúng tôi lựa chọn fructose như là nguồn C cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về khả năng sinh tổng hợp cũng như nghiên cứu lên men sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn này.

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

Thành phần cấu trúc và thuộc tính của sản phẩm PHA từ vi khuẩn phụ thuộc vào nguồn C ban đầu, con đường trao đổi chất để chuyển hóa nguồn C đó thành tiền chất cấu trúc polymer, và tính đặc hiệu cơ chất của PHA synthase. Sản phẩm P(3HB) có tính chất cứng và giòn là loại PHA phổ biến được tạo ra từ hầu hết các loài vi khuẩn. Các loại PHA khác như P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-3HHx),… có tính linh động và đàn hồi hơn song ít chủng vi khuẩn có thể tạo ra các polymer này khi nuôi cấy vi khuẩn trên nguồn cacbohydrate mà thường phải được bổ sung các tiền chất vào môi trường [128]. Tiền chất là các hợp chất có bộ khung C gần tương đồng với các đơn phân mong muốn, do đó khi được bổ sung vào môi trường có thể giúp đa dạng các sản phẩm PHA thu được trong quá trình nuôi cấy. Các copolymer như poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] hay poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] có thể thu được khi bổ sung một số tiền chất liên quan như propionic acid, valeric acid, 1,4-Butanediol, γ-Butyolactone trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn [37, 52, 115, 173]. Chính vì thế chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm bổ sung một số tiền chất có bộ khung cabon khác nhau (từ C4 đến C8) vào môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 nhằm nghiên cứu sự ảnh hưởng đến sinh trưởng và tích lũy PHA, đồng thời giá khả năng tạo ra sự đa dạng sản phẩm PHA từ chủng vi khuẩn này.

Như trình bày ở bảng 3.4, CDW và hàm lượng PHA cao nhất (4,3 g/L và 61,6 %wt, theo thứ tự) thu được khi fructose được sử dụng như là nguồn C duy nhất. Ở hầu hết các lô thí nghiệm còn lại, khi các tiền chất được bổ sung vào môi trường thì CDW và hàm lượng PHA bị giảm đáng kể. Kết quả thu được chứng tỏ sự sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 bị ức

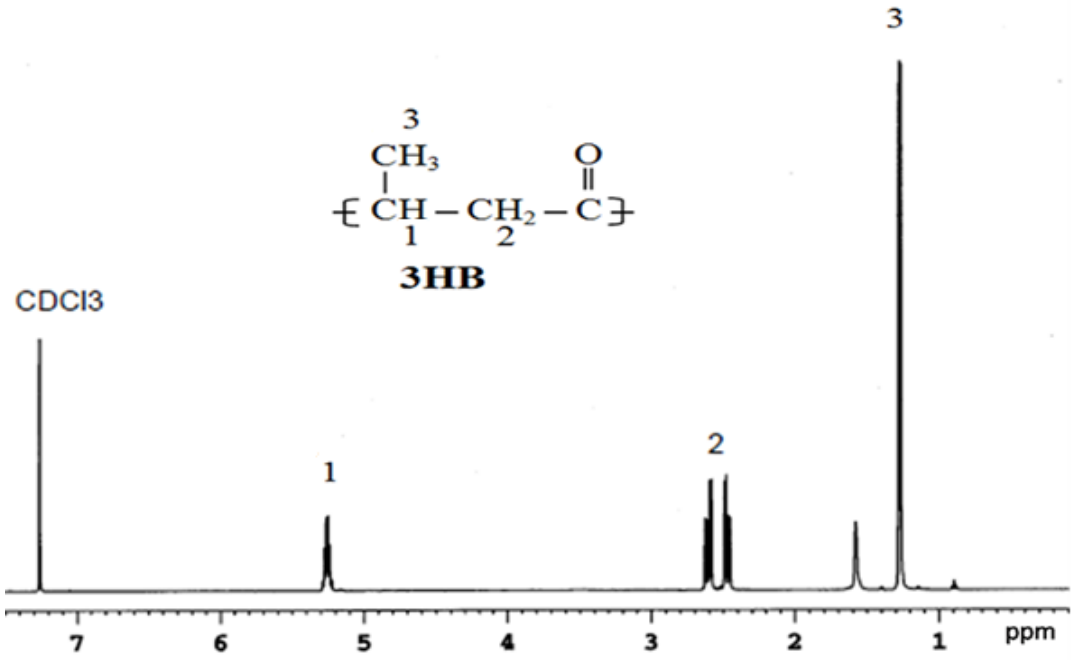
chế khi các tiền chất được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sự suy giảm mức độ sinh trưởng cũng như khả năng sinh tổng hợp PHA của vi khuẩn khi bổ sung tiền chất vào môi trường nuôi cấy đã được một số tác giả ghi nhận [116, 145].

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của các tiền chất C đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Nguồn C	**CDW (g/L)**	**Hàm lượng PHA (%wt)**	**Thành phần PHA (mol%)**		
			3HB	**4HB**	**3HV**
Fructose	4,32 ± 0,03	61,6 ± 0,4	100	0	0
Fructose + 1,4-butanediol	2,37 ± 0,1	54,6 ± 0,7	94,3	5,7	0
Fructose + 1,5-pentanediol	2,17 ± 0,02	45,7 ± 1,2	100	0	0
Fructose + 1,6-hexanediol	2,17 ± 0,03	43,3 ± 1,6	100	0	0
Fructose + γ-butyrolactone	2,27 ± 0,03	36,1 ± 2,5	92,9	7,1	0
Fructose + natri 4-hydroxybutyrate	2,47 ± 0,09	55,2 ± 1,8	96,0	4,0	0
Fructose + natri valerate	2,08 ± 0,12	39,3 ± 2,9	91,9	0	8,1
Fructose + natri hexanoate	2,22 ± 0,03	43,7 ± 0,1	100	0	0
Fructose + natri heptanoate	2,61 ± 0,06	55,5 ± 1,1	95,1	0	4,9
Fructose + natri octanoate	1,67 ± 0,03	33,1 ± 1,9	100	0	0

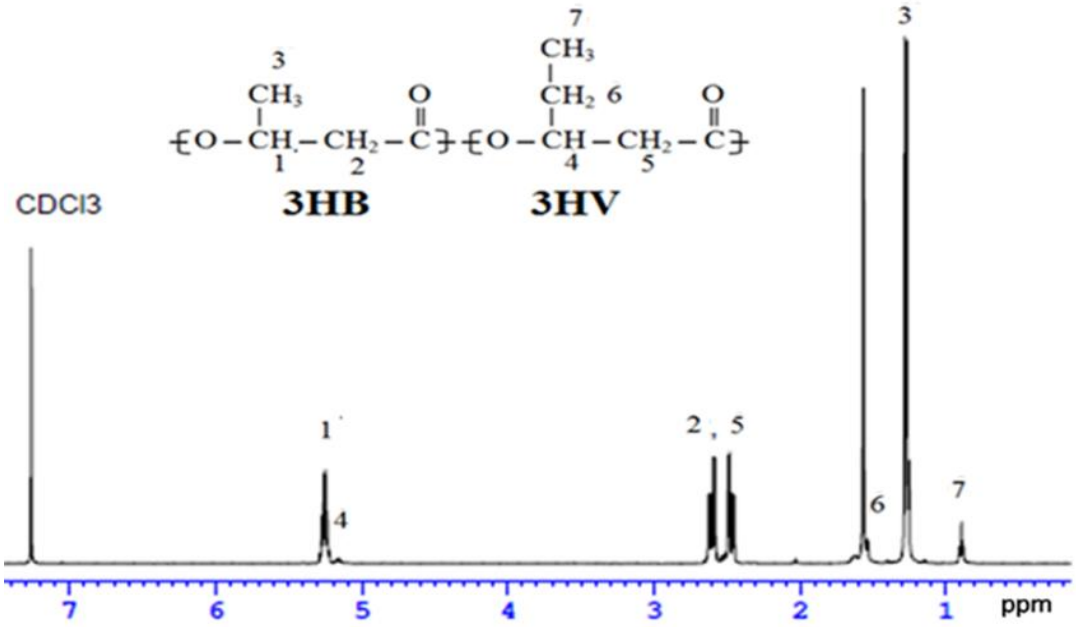
Như thể hiện ở bảng 3.4, khi fructose và tổ hợp của fructose với các tiền chất như 1,5-pentanediol, 1,6-hexanediol, natri hexanoate, và natri octanoate được sử dụng như là nguồn C, sản phẩm PHA thu được có thành phần là P(3HB) và được xác định dựa trên phân tích cộng hưởng từ hạt nhân proton (^{1}H NMR) (hình 3.6). Các tiền chất 1,5-pentanediol, 1,6-hexanediol, natri hexanoate, và natri octanoate đã được sử dụng để tạo ra các phân đoạn 3-hydroxypropionate (3HP), 4-hydroxybutyrate (4HB), và 3-hydroxyhexanoate (3HHx) khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn *Alcaligenes eutrophus* [56], *Alcaligenes latus* [198] hoặc *Bacillus* sp. INT005 [186]. Tuy nhiên kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy rằng chủng vi

khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 không có khả năng chuyển hóa các nguồn tiền chất này để tạo các phân đoạn tương đương trong polymer.



Hình 3.6. Phổ 1H NMR của PHA tách chiết từ chủng Yangia sp NĐ199 *khi nuôi trên nguồn fructose*

Copolymer P(3HB-co-3HV) có thể được sinh tổng hợp khi các đơn phân 3HB và 3HV được tạo ra trong quá trình trao đổi chất nội bào. Một số vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp P(3HB-co-3HV) trên những nguồn C thông thường như dầu thực vật [14, 137], glucose và glycerol [153]. Trong khi các vi khuẩn khác cần phải được bổ sung các tiền chất như propionate, valerate hoặc heptanoate vào môi trường nuôi cấy để có thể tạo ra P(3HB-co-3HV) [94, 160, 186]. Trong nghiên cứu này khi các tiền chất như natri valerate và natri heptanoate được sử dụng giúp tế bào chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 tích lũy P(3HB-co-3HV) với hàm lượng 3HV tương ứng đạt được là 8,1 mol% và 4,9 mol% dựa trên phân tích sắc kí khí. Kết quả phân tích phổ ^{1}H NMR cũng cho thấy các đỉnh tương ứng của loại copolymer P(3HB-co-3HV) (hình 3.7).



Hình 3.7. Phổ 1H NMR của P(3HB-co-3HV) tách chiết từ Yangia sp. NĐ199 *khi nuôi cấy trên nguồn fructose kết hợp với tiền chất natri valerate*

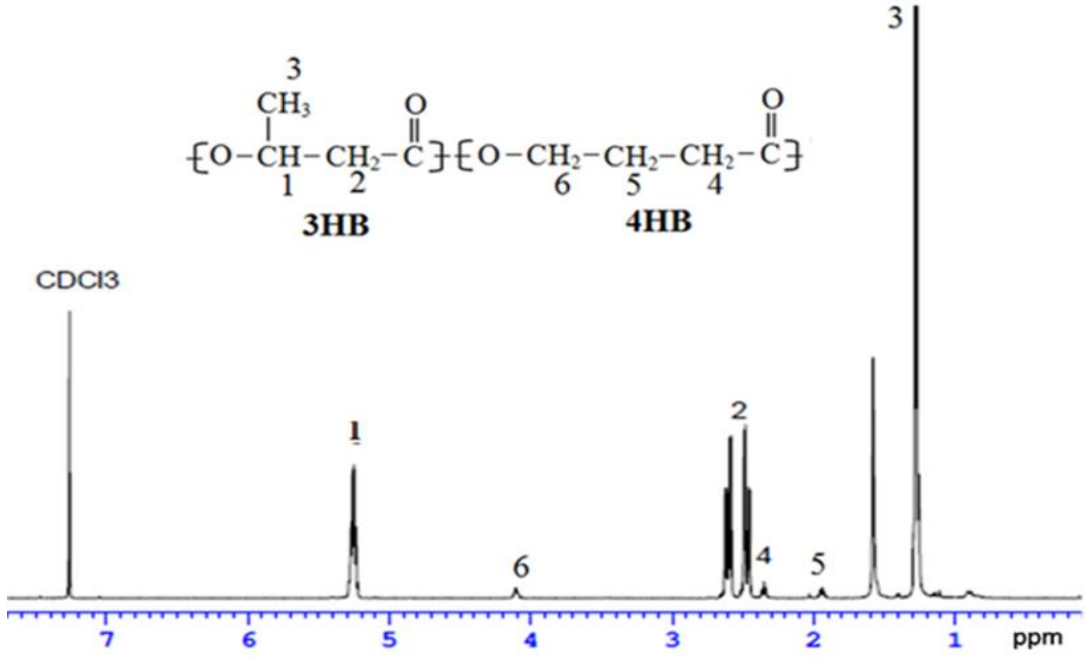
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của các nồng độ natri heptannoate đến sinh tổng hợp P(3HB-co-3HV) của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Nồng độ natri heptanoate (g/L)	**CDW (g/L)**	**Hàm lượng PHA (wt%)**	**Thành phần PHA (mol%)**	
			3HB	**3HV**
0,5	2,61 ± 0,06	55,5 ± 1,1	95,1	4,9
1	2,42 ± 0,03	57,5 ± 1,6	90,7	9,3
1,5	2,37 ± 0,02	51,1 ± 2,3	85,4	14,6
2	2,33 ± 0,02	52,3 ± 1,3	82,3	17,7
2,5	2,32 ± 0,03	54,0 ± 1,5	81,2	18,8
3	2,03 ± 0,05	51,6 ± 2,0	80,7	19,3

Ảnh hưởng của nồng độ natri heptanoate đến sinh trưởng và sinh tổng hợp P(3HB-co-3HV) bởi chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 cũng được chúng tôi kiểm tra và kết quả được trình bày ở bảng 3.5. Sinh khối khô (CDW, g/L) thu được giảm

từ 2,61 g/L xuống 2,03 g/L khi nồng độ heptanoate bổ sung vào môi trường tăng từ 0,5 g/L đến 3 g/L. Mặc dù khả năng tích lũy P(3HB-co-3HV) dường như không chịu tác động của việc thay đổi nồng độ heptanoate, song tỷ lệ phân đoạn 3HV có sự sai khác rõ rệt theo chiều hướng tăng dần từ 4,9 mol % lên 19,3 mol%. Kết quả thu được phù hợp với những báo cáo trước đây về ảnh hưởng của tiền chất của 3HV tới tỷ lệ phân đoạn 3HV trong PHA, nhưng có thể ức chế sự sinh trưởng và tích lũy polymer [30, 45, 94]. Tỷ lệ phân đoạn 3HV trong P(3HB-co-3HV) tăng lên giúp cho sản phẩm PHA giảm bớt mức độ kết tinh và trở nên đàn hồi hơn (bảng 1.1). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng mức độ kết tinh của P(3HB-co-14 mol% 3HV) và P(3HB-co-20 mol% 3HV) ở khoảng 56 % và 50 %, theo thứ tự, và thấp hơn nhiều so với P(3HB) đồng hình (dao động khoảng 60 đến 80 %) [20].

Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] cũng là một trong những PHA rất đáng chú ý với các thuộc tính quý (bảng 1.1). Tương tự như P(3HB-co-3HV), để có thể tổng hợp được P(3HB-co-4HB) cũng cần có các đơn phân tương ứng. Một vài công bố cho thấy P(3HB-co-4HB) có thể được tổng hợp bởi các vi khuẩn tái tổ hợp như *E. coli* từ nguồn C thông thường [119, 195]. Trong khi phần lớn các vi khuẩn còn lại (kể cả chủng dại và tái tổ hợp) cần được bổ sung các tiền chất liên quan tương ứng như 1,4-butanediol, γ-butyrolactone, hoặc natri 4-hydroxybutyrate trong quá trình nuôi cấy để có thể sinh tổng hợp copolymer này [16-17, 25, 81, 98, 133]. Kết quả nghiên cứu chúng tôi thu được cũng cho thấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có khả năng tổng hợp P(3HB-co-4HB) khi các tiền chất 1,4-butanediol, γ-butyrolactone, hoặc natri 4-hydroxybutyrate được bổ sung trong quá trình nuôi cấy (bảng 3.4, hình 3.8). Như trình bày ở bảng 3.4, phân đoạn 4HB cao nhất (7,1 mol%) thu được khi γ-butyrolactone được bổ sung, tiếp đến là 1,4-butanediol (5,7 mol%) và natri 4-hydroxybutyrate (4,0 mol%). Ngược lại, CDW đạt 2,47 g/L và hàm lượng polymer đạt 55,2 %wt thu được khi natri 4-hydroxybutyrate được bổ sung lại cao hơn so với hai nguồn tiền chất còn lại.



Hình 3.8. Phổ 1H NMR của P(3HB-co-4HB) tách chiết từ Yangia sp. NĐ199 *khi nuôi cấy trên nguồn fructose kết hợp với natri 4-hydroxybutyrate*

Một số chủng vi khuẩn ưa mặn có khả năng sinh tổng hợp P(3HB) và P(3HB-co-3HV) từ các nguồn C khác nhau đã được công bố [36, 93, 105, 152]. Tuy nhiên chưa có báo cáo nào về khả năng sinh tổng hợp P(3HB-co-4HB) bởi các vi khuẩn ưa mặn. Khả năng sinh tổng hợp P(3HB-co-4HB) trên nguồn cơ chất fructose kết hợp với một số tiền chất cho thấy *Yangia* sp. NĐ199 là một chủng vi khuẩn tiềm năng trong tương lai bởi khả năng ứng dụng cao của vật liệu P(3HB-co-4HB) trong lĩnh vực y học và dược phẩm.

Ảnh hưởng của nồng độ các tiền chất cho đơn phân 4HB đến sinh trưởng và sinh tổng hợp P(3HB-co-4HB) bởi chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 đã được chúng tôi kiểm tra. Kết quả trình bày ở bảng 3.6 cho thấy rằng sự thay đổi nồng độ 1,4-butanediol hầu như ít ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, sinh tổng hợp polymer, và thành phần phân đoạn 4HB ở chủng vi khuẩn này. Kết quả thu được tương tự đối với chủng *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 khi tăng nồng độ 1,4-butyrolactone. Tuy nhiên, phân đoạn 4HB có thể tăng lên khi tăng nồng độ hỗn hợp 1,4-butyrolactone và γ-butyrolactone bổ sung vào môi trường nuôi cấy [195].

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của các nồng độ 1,4-butanediol đến sinh tổng hợp P(3HB-co-4HB) của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

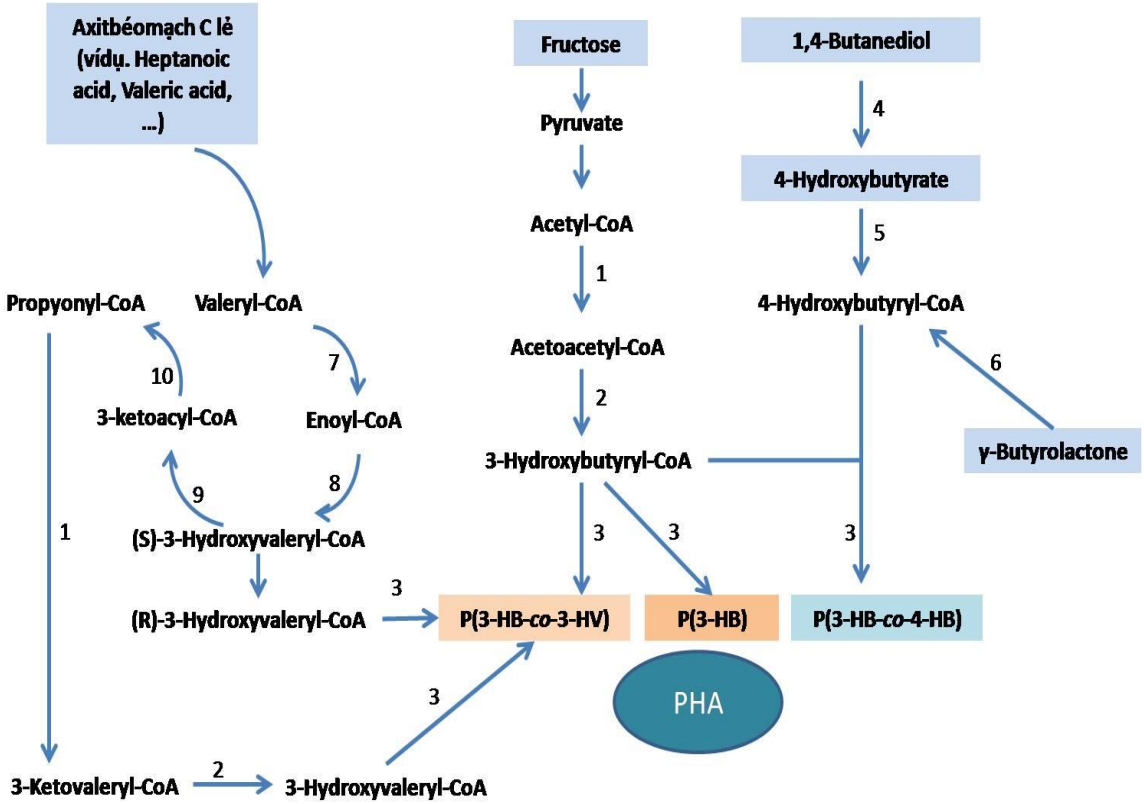
Tiền chất	**Nồng độ (g/L)**	**CDW (g/L)**	**Hàm lượng PHA (wt%)**	**Thành phần PHA (mol%)**	
				3HB	**4HB**
1,4-butanediol	0,5	2,37 ± 0,1	54,6 ± 0,7	94,3	5,7
	1	2,33 ± 0,05	55,6 ± 0,6	94,7	5,3
	1,5	2,34 ± 0,02	54,9 ± 0,3	94,6	5,4
	2	2,27 ± 0,09	55,0 ± 2,5	95,2	4,8
	2,5	2,30 ± 0,04	55,0 ± 1,2	94,9	5,1
	3	2,23 ± 0,02	54,4 ± 1,7	95,0	5,0
γ-butyrolactone	0,5	2,27 ± 0,04	36,1 ± 2,5	92,9	7,1
	1	2,2 ± 0,01	24,8 ± 0,6	93,3	6,7
	1,5	2,06 ± 0,08	20,5 ± 1,5	93,7	6,3
	2	2,00 ± 0,14	19,7 ± 2,3	94,1	5,9
	2,5	1,85 ± 0,01	17,6 ± 0,3	93,8	6,2
	3	1,75 ± 0,02	18,3 ± 1,1	94,2	5,8
Natri 4-hydroxybutyrate	0,5	2,47 ± 0,09	55,2 ± 1,8	96,0	4,0
	1	2,43 ± 0,04	55,3 ± 1,2	94,78	5,2
	1,5	2,39 ± 0,03	52,2 ± 0,7	94,4	5,6
	2	2,37 ± 0,03	53,6 ± 1,0	94,1	5,9
	2,5	2,35 ± 0,05	53,7 ± 1,2	94,0	6,0
	3	2,35 ± 0,04	54,3 ± 1,4	93,7	6,3

Trong khi đó các giá trị CDW, hàm lượng P(3HB-co-4HB), cũng như tỷ lệ phân đoạn 4HB giảm đi đáng kể khi nồng độ γ-butyrolactone tăng từ 0,5 g/L lên 3 g/L. Sự có mặt của γ-butyrolactone với nồng độ cao trong môi trường có thể đã gây độc đối với tế bào vi khuẩn và vì thế ức chế mạnh sự sinh trưởng cũng như sinh

tổng hợp polymer của tế bào. Các kết quả đã công bố đối với hai chủng vi khuẩn *Cupriavidus* sp. USMAA 1020 và *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 cũng cho thấy sự giảm CDW và mức độ tích lũy P(3HB-co-4HB) trong khi thành phần phân đoạn 4HB lại có xu hướng tăng khi nồng độ γ-butyrolactone bổ sung vào môi trường nuôi cấy tăng lên [17, 195]. Ngược lại, mặc dù CDW và hàm lượng P(3HB-co-4HB) không có sự sai khác giữa các nồng độ bổ sung natri 4-hydroxybutyrate, tuy nhiên phân đoạn 4HB lại có xu hướng tăng nhẹ khi nồng độ tiền chất natri 4-hydroxybutyrate được bổ sung vào môi trường tăng lên (bảng 3.6).

Cấu trúc hóa học của hầu hết các PHA đã biết - ngoại trừ P(3HB), P(3HB-co-3HV) và P(3HB-co-3HHx) - thường không thể được tổng hợp từ các nguồn C thông dụng. Do đó để có thể tạo được các PHA chứa đơn phân mong muốn thì các tiền chất liên quan thường được bổ sung vào môi trường trong quá trình nuôi cấy. Bên cạnh đó, mức độ đặc hiệu cơ chất của PHA synthase cũng là một yếu tố quan trọng quyết định loại PHA được tạo ra từ các nguồn C tiền chất này [128]. Kết quả nghiên cứu thu được ở trên cho thấy các tiền chất C4 (1,4-butanediol, γ-butyrolactone, natri 4-hydroxybutyrate) và C5 (natri valerate) và C7 (natri heptanoate) có thể là nguồn tác nhân cảm ứng tổng hợp các loại enzyme nội bào cần thiết của các con đường trao đổi chất tạo nguyên liệu cho quá trình sinh tổng hợp PHA ở chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Quá trình sinh tổng hợp PHA ở chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên các nguồn cơ chất khác nhau một lần nữa cho thấy sự thích ứng của bộ máy di truyền ở vi khuẩn trong tự nhiên đối với nguồn C có mặt trong môi trường sống. Dựa vào các dữ liệu thực nghiệm và lý thuyết chúng tôi có thể tạm thời xây dựng giả thuyết các con đường trao đổi chất cơ bản trong quá trình sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 như trình bày ở hình 3.9. Các con đường giả thuyết này có thể là cơ sở tiền đề cho định hướng nghiên cứu sâu hơn về di truyền cũng như tìm hiểu cơ chế sinh lý – hóa sinh của quá trình sinh tổng hợp PHA ở chủng vi khuẩn này trong tương lai.

Khả năng sử dụng phổ cơ chất rộng bởi PHA synthase là một ưu thế của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ19 cho phép tạo ra các loại polymer mong muốn. Tỷ lệ các phân đoạn 3HV và 4HB trong sản phẩm PHA có thể thay đổi được bằng cách điều chỉnh nồng độ các tiền chất bổ sung trong quá trình nuôi cấy. Do đó hoàn toàn có thể tạo ra được các PHA với mol% các đơn phân này cao bằng cách bổ sung các tiền chất tương ứng như natri heptanoate (cho 3HV) hay natri 4-hydroxybutyrate (cho 4HB) với nồng độ cao vào môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, như kết quả thu được ở trên thì phần lớn các tiền chất này đều thể hiện tác động ức chế sinh trưởng của tế bào chủng vi khuẩn này. Đặc biệt đối với γ-butyrolactone còn làm giảm khả năng tích lũy cũng như thành phần 4HB trong copolymer.



Hình 3.9. Các con đường giả thuyết quá trình sinh tổng hợp PHA của chủng Yangia sp. NĐ199 *từ các nguồn C khác nhau.*

(1: β-Ketothiolase; 2: NADPH acetoacetyl-CoA reductase; 3: PHA synthase; 4: Alcohol dehydrogenase; 5: Hydroxyacyl-CoA synthase; 6: Esterase; 7: Acyl-CoA dehydrogenase; 8: Enoyl-CoA hydratase; 9: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; 10: 3-Ketoacyl-CoA thiolase; 11: Epimerase)

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

Sử dụng phương pháp tách chiết polymer nhờ dung môi chloroform, chúng tôi đã thu được các sản phẩm PHA ở dạng sợi trắng (phần phụ lục 10). Sử dụng các phương pháp phân tích như trình bày ở mục 2.2.5.5, chúng tôi đã xác định được các thuộc tính lý học của sản phẩm PHA thu được từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199.

Bảng 3.7. Thuộc tính lực của PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Mẫu PHA	**Lực kéo dãn (Mpa)**	**Suất đàn hồi (Young's Modulus, Mpa)**	**Độ dãn tới hạn (%)**	**Tham khảo**
P(3HB)	43	3,5	5,0	Doi, 1995 [57]
PHA từ *Yangia* sp. NĐ199 trên cơ chất fructose	41	5,1	4,8	Nghiên cứu này

Bảng 3.8. 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 C		**Loại PHA**	M_w (x10^6 Da)	M_n (x10^5 Da)	**PDI** (M_w/M_n)	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-HB	P(3HB-*co*-5,8%4HB)	1,8	5,5	3,2	155	-18
	Na HP	P(3HB-*co*-13%3HV)	1,8	6,9	2,6	173	-11

(Ghi chú: Na-4-HB: Natri 4-hydroxybutyrate; Na HP: Natri heptanoate)

Kết quả thể hiện ở bảng 3.7 cho thấy PHA tách chiết được từ sinh khối tế bào chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khi nuôi cấy trên nguồn C là fructose mang các thuộc tính lực tương tự như đối với sản phẩm P(3HB) do Doi (1995) công bố [57]. Sự sai khác ở đây có thể là bởi những sai khác trong cấu trúc sợi polymer cũng như sự sắp xếp các sợi polymer trong hạt PHA. Sự sai khác này do nhiều yếu tố tác động như: nguồn C, hoạt động của PHA synthase, điều kiện nuôi cấy, ….

Một số đặc điểm hóa-lý của các sản phẩm PHA thu được từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên các nguồn cơ chất khác nhau như tổng khối lượng phân tử trung bình (M_w), trung bình của khối lượng phân tử (M_n), mức độ phân tán PDI đã được chúng tôi tiến hành kiểm tra. Kết quả thể hiện ở bảng 3.8 cho thấy giá trị M_w của các PHA thu được từ *Yangia* sp. NĐ199 trên các nguồn C khác nhau dao động từ 1,3 x 10^6 đến 2,2 x 10^6 Da, và giá trị M_n nằm trong khoảng 4,2 x 10^5 đến 6,9 x 10^5 Da. Có thể nói rằng các giá trị M_w và M_n của PHA từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 là cao hơn so với sản phẩm PHA từ một số chủng vi khuẩn đã được công bố, chẳng hạn như chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. INT005 [186], *Paracoccus denitrificans* [214], *Bacillus* sp. MG12 [135], hay các chủng vi khuẩn tái tổ hợp *Ralstonia eutropha* [90]. Giá trị M_w của P(3HB) thu được khi nuôi cấy trên nguồn fructose là cao nhất đạt 2,2 x 10^6 Da. Tuy nhiên, sản phẩm polymer này cũng có độ phân tán cao nhất (PDI = 3,4). Trong khi việc bổ sung các tiền chất vào môi trường nuôi cấy khiến cho các giá trị M_w và PDI của PHA giảm. Điều này có thể là do hoạt động sinh tổng hợp của PHA synthase khi nuôi cấy trên nguồn fructose diễn ra mạnh mẽ hơn do không chịu sự tác động ức chế của các tiền chất đã dẫn đến sự không đồng đều của các sợi polymer trong hạt PHA. Kết quả này là phù hợp với các kết quả về sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn này khi có tác động của các tiền chất như đã trình bày ở trên (bảng 3.4 - 3.7).

Nhiệt độ nóng chảy (melting point temperature, T_m) và nhiệt độ thủy tinh hóa (glass transition temperature, T_g) là hai thuộc tính vật lý quan trọng của bất cứ loại vật liệu polymer nào. T_g là điểm nhiệt độ mà tại đó polymer chuyển từ dạng vật chất rắn, cứng sang dạng vật chất mềm dẻo, đàn hồi và ngược lại. Sự thay đổi về mặt lý

học của các sản phẩm PHA thu được khi nuôi cấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên các nguồn cơ chất khác nhau có sự sai khác có ý nghĩa. Sản phẩm PHA thu được trên môi trường chứa fructose mang những thuộc tính nhiệt đặc trưng của P(3HB) với giá trị T_m và T_g tương ứng khoảng 175 ^oC và 4 ^oC theo thứ tự. Do đó sản phẩm P(3HB) thường trở nên cứng và giòn trong điều kiện nhiệt độ thường. Trong khi đó các sản phẩm P(3HB-co-3HV) và P(3HB-co-4HB) thu được trên môi trường có bổ sung các tiền chất vẫn có nhiệt độ nóng chảy cao từ 155 ^oC đến 173 ^oC, song lại có giá trị T_g rất thấp (từ -20 đến 0 ^oC). Với giá trị T_g như vậy nên các sản phẩm này có mức độ linh động và dai hơn so với P(3HB) [37].

3.2.1.4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ (N)

Bên cạnh nguồn C thì nguồn nitơ (N) là yếu tố ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng của vi sinh vật nói chung. Trong nuôi cấy các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA, nguồn nitơ không chỉ có vai trò quan trọng đối với quá trình sinh trưởng của tế bào mà nó còn ảnh hưởng đến quá trình tích lũy polymer. Ảnh hưởng của các nguồn N (N) vô cơ và hữu cơ đến sinh trưởng và tích lũy PHA bởi chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 đã được chúng tôi tiến hành nghiên cứu. Kết quả thu được cho thấy tất cả các nguồn N đều cho thấy ảnh hưởng tốt đến mức độ tích lũy PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 (hàm lượng PHA > 40 %wt). Trong số đó, cao nấm men, KNO_3, natri glutamate (MSG), và $NaNO_3$ là các nguồn N phù hợp hơn cả cho sự sinh trưởng cũng như tích lũy polymer của tế bào. Sinh khối khô (CDW) và hàm lượng PHA cao nhất, lần lượt là 4,95 g/L và 67,7 %wt, thu được khi nguồn cao nấm men được sử dụng. Tiếp đến là KNO_3 (CDW – 4,23 g/L; P(3HB) – 57,7 %wt), MSG (CDW – 3,85 g/L; PHA – 47,8 %wt), và $NaNO_3$ (CDW – 3,16 g/L; PHA – 44,8 %wt) (bảng 3.9). Trong khi đó kết quả thu được cho thấy các gốc amoni (NH_4^+) không thích hợp cho quá trình sinh trưởng đối với chủng vi khuẩn này (CDW chỉ đạt từ 0,64 đến 1,48 g/L) mặc dù hàm lượng PHA nội bào là khá cao (43 %wt đến 58 %wt) (bảng 3.9).

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của các nguồn N đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

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
$(NH_4)_2SO_4$	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

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn N đối với chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CFR67 cho thấy nguồn N hữu cơ có tác động tốt hơn đến khả năng tích lũy PHA nội bào so với các nguồn N vô cơ [177]. Trong khi các nguồn N hữu cơ có thể được tế bào vi khuẩn sử dụng trực tiếp cho quá trình sinh tổng hợp các thành phần cấu trúc tế bào và enzyme khác thì các nguồn N vô cơ cần trải qua một quá trình biến đổi hóa học sau khi được tế bào hấp thu. Quá trình sử dụng amoni và nitrate bởi vi khuẩn nói chung đều phải trải qua quá trình glutamine hóa nội bào dựa trên hoạt động của glutamine synthetase làm cơ sở cho sinh tổng hợp protein cấu trúc tế bào và các enzyme khác. Tuy nhiên chúng tôi nhận thấy có sự sai khác rõ rệt về khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn này khi sử dụng hai nguồn N vô cơ. Sự tiêu thụ NH_4^+ dẫn đến pH môi trường trở nên axit hóa có thể là nguyên nhân dẫn đến ức chế sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn này. Kết quả trình bày ở bảng 3.9 cũng cho thấy sự khác biệt về khả năng sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp PHA của hai nguồn muối nitrate. Điều kiện môi trường có nồng độ Na^+ cao (khoảng 30 ‰) có thể là nguyên nhân cơ bản dẫn đến khả năng sử dụng $NaNO_3$ thấp hơn so với

KNO_3. Do đó mức độ sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn này trên nguồn KNO_3 có ưu thế hơn.

Ở quy mô công nghiệp, sử dụng các môi trường xác định cho phép kiểm soát chính xác thành phần và hàm lượng dinh dưỡng trong quá trình sản xuất, qua đó đảm bảo sự ổn định về năng suất qua các lần lên men. Với các kết quả thu được ở trên chúng tôi nhận thấy rằng nguồn muối nitrate (NO_3^-) có thể là nguồn N thay thế tiềm năng cho cao nấm men nhằm giảm chi phí trong quá trình sản xuất. Do đó mức độ sinh trưởng cũng như khả năng tích lũy PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trong điều kiện nguồn cao nấm men được thay thế một phần/hoàn toàn bởi KNO_3 đã được kiểm tra.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Nguồn nitơ (g/L)		**CDW (g/L)**	**Hàm lượng PHA (%wt)**	**Nồng độ PHA (g/L)**	**RCM (g/L)**
Cao nấm men	2,0	4,51 ± 0,31	71,26	3,21	1,24
	0,5	3,78 ± 0,04	69,87	2,65	1,14
Cao nấm men : KNO_3	0,5 : 0,25	3,69 ± 0,12	58,54	2,16	1,53
	0,5 : 0,5	4,38 ± 0,27	66,02	2,89	1,49
	0,5 : 1,0	4,27 ± 0,1	61,62	2,63	1,64
	0,5 : 1,5	4,19 ± 0,22	53,91	2,26	1,93
	0,5 : 2,0	4,35 ± 0,11	48,63	2,12	2,24
KNO_3	2,0	4,03±0,12	55,85	2,25	1,78

Sự thay đổi hàm lượng cao nấm men (từ 2 g/L xuống 0,5 g/L) ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 với CDW giảm từ 4,51 g/L xuống 3,78 g/L và khối lượng xác tế bào (RCM) giảm từ 1,24 g/L xuống 1,14 g/L. Tuy nhiên không thấy sự sai khác về khả năng tích lũy polymer nội bào trong cả hai trường

hợp (71,26 %wt so với 69,87 %wt) (bảng 3.10). Điều đó chứng tỏ rằng quá trình sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 ít bị chi phối bởi nồng độ cao nấm men trong môi trường.

Kết hợp giữa nguồn cao nấm men và KNO_3 cho kết quả tác động khá tốt đối với sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khi so sánh với việc sử dụng chỉ nguồn cao nấm men. Mức độ tích lũy PHA của chủng vi khuẩn này tăng khi lượng KNO_3 được bổ sung vào môi trường tăng từ 0,25 g/L lên 0,5 g/L, sau đó hàm lượng tích lũy PHA có xu hướng giảm khi lượng KNO_3 được bổ sung vào môi trường lên men vượt quá 0,5 g/L trong khi giá trị sinh khối tế bào (RCM) vẫn có xu hướng tăng (bảng 3.10). Giá trị RCM thu được trong các lô thí nghiệm bổ sung KNO_3 thu được cao hơn so với khi sử dụng nguồn cao nấm men chứng tỏ ảnh hưởng tốt của nguồn N này đối với sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Khối lượng PHA đạt tới 2,89 g/L trong lô thí nghiệm kết hợp (0,5 g/L cao nấm men và 0,5 g/L KNO_3) là rất khả quan khi so sánh với việc sử dụng đơn thuần 2 g/L cao nấm men (đạt 3,21 g/L) và 2 g/L KNO_3 (đạt 2,25 g/L). Như vậy, các kết quả thu được cho thấy KNO_3 có thể là nguồn N tiềm năng giúp giảm chi phí trong quá trình sản xuất PHA khi sử dụng chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 ở quy mô công nghiệp.

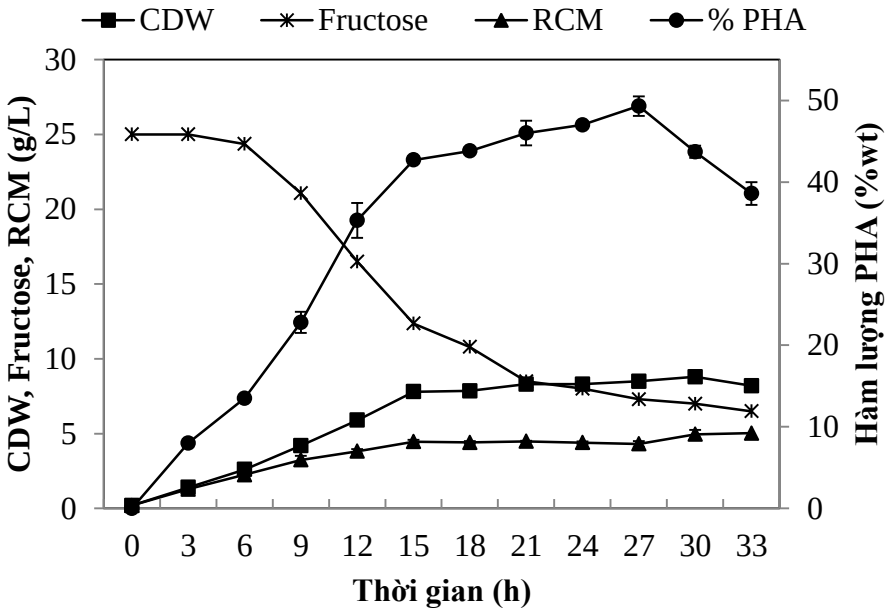
3.2.2. Kết quả nghiên cứu lên men tích lũy PHA trên nồi lên men

Quá trình sản xuất PHA từ vi khuẩn cần phải tiến hành qua hai giai đoạn chính: (1) lên men thu sinh khối tích lũy PHA, và (2) tách chiết – thu hồi PHA. Để tạo cơ sở cho sản xuất trên quy mô công nghiệp thì việc nghiên cứu lên men trong điều kiện thiết bị lên men quy mô phòng thí nghiệm là vô cùng quan trọng. Chính vì vậy chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 sử dụng các hình thức nuôi cấy và các nguồn C khác nhau trong điều kiện thiết bị lên men MDL 1000 (B.E. Marubishi, Nhật Bản).

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

Dựa trên các kết quả thu được trong quá trình nghiên cứu nuôi cấy trong điều kiện bình nón, chúng tôi đã tiến hành lên men mẻ sản xuất PHA từ chủng vi

khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Quá trình nuôi cấy được tiến hành trên thiết bị lên men MDL 1000 (B.E. Marubishi, Nhật) với thể tích 3 lít. Hình 3.10 thể hiện động thái quá trình lên men mẻ của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 với nồng độ 25 g/L fructose được sử dụng làm nguồn C. Như thể hiện trên hình 3.10, pha sinh trưởng cấp số của quá trình lên men diễn ra từ giờ nuôi cấy thứ 3 cho đến thời điểm 15 h với tổng khối lượng tế bào khô (CDW) đạt được tăng từ 1,4 g/L lên 7,8 g/L. Tiếp đó pha cân bằng trong khoảng thời gian từ 18 h cho đến 30 h nuôi cấy với CDW thu được ổn định trong khoảng 8,3 đến 8,8 g/L, và giá trị này có xu hướng giảm dần sau 33 h nuôi cấy.



Hình 3.10. Động thái lên men mẻ sản xuất PHA trên nguồn fructose của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Phân tích hàm lượng PHA có trong tế bào ở mỗi thời điểm lấy mẫu cho thấy quá trình sinh tổng hợp polymer bởi chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 xảy ra ngay từ giai đoạn đầu của quá trình lên men với hàm lượng đạt tới 8 %wt ở thời điểm lấy mẫu sau 3 h nuôi cấy. Nồng độ fructose cao trong môi trường nuôi cấy có thể là nguyên nhân kích thích quá trình sinh tổng hợp PHA của tế bào vi khuẩn kể cả trong điều kiện không có sự thiếu hụt các nguồn dinh dưỡng khác. Hàm lượng PHA tích lũy được cũng

tăng mạnh trong giai đoạn sinh trưởng cấp số cùng với sự tăng của giá trị RCM (g/L) từ 1,29 g/L lên 4,47 g/L. Đồng thời khi phân tích dinh dưỡng cho thấy nồng độ fructose trong giai đoạn này cũng giảm một cách nhanh chóng từ 25 g/L xuống 12,5 g/L. Hiện tượng trên chứng tỏ quá trình sinh tổng hợp PHA và sinh trưởng tế bào xảy ra một cách đồng thời trong quá trình nuôi cấy, chúng tôi dự đoán chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có thể thuộc nhóm vi khuẩn có khả năng tích lũy polymer mà không phụ thuộc vào điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng [112-113].

Phân tích sắc kí khí các mẫu sinh khối cho thấy hàm lượng PHA cao nhất đạt 49 %wt ở thời điểm 27 h nuôi cấy, sau đó giảm xuống 44 %wt và 38 %wt ở các thời điểm 30 h và 33 h nuôi cấy, theo thứ tự, ngay cả khi nồng độ fructose trong môi trường ở các thời điểm này ở mức 6,5 đến 7,0 g/L. Các nghiên cứu thường cho thấy sự suy giảm hàm lượng PHA trong điều kiện môi trường thiếu hụt C, khi đó nguồn polymer sẽ được sử dụng nhằm cung cấp năng lượng và vật chất cho quá trình cấu trúc tế bào [173]. Tuy nhiên, kết quả công bố của một số tác giả cũng cho thấy sự suy giảm đồng thời cả CDW cũng như hàm lượng PHA do quá trình thủy phân polymer xảy ra ngay cả trong điều kiện nguồn C chưa thực sự thiếu hụt [72, 73, 82, 95].

Phân tích giá trị RCM (g/L) chúng tôi thấy rằng giá trị này thay đổi theo các pha sinh trưởng của quần thể tế bào vi khuẩn. Tuy nhiên ở thời điểm 27 h nuôi cấy, khi hàm lượng PHA nội bào bắt đầu có xu hướng giảm thì giá trị này vẫn có xu hướng tăng nhẹ. Điều đó chứng tỏ đã có sự chuyển hóa nội bào sản phẩm PHA thành nguồn cơ chất phục vụ cho các quá trình cấu trúc tế bào trong điều kiện thiếu hụt nói chung về các nguồn dinh dưỡng khác (nitơ, khoáng, vitamin, …).

Trong quá trình lên men mẻ, khả năng sản xuất PHA cao nhất đạt 0,078 g/L/h và hiệu suất chuyển hóa PHA được cao nhất đạt 0,22 g/g fructose thu được ở thời điểm 15 h nuôi cấy, sau đó các giá trị này có xu hướng giảm dần cho đến kết thúc nuôi cấy. Các kết quả thu được đối với chủng vi khuẩn này khi tiến hành lên men mẻ là chưa cao so với một số chủng vi khuẩn khác nghiên cứu đã công bố trước đây [72, 82, 95]. Hàm lượng dinh dưỡng thấp trong lên men mẻ khiến cho mật độ tế bào thấp cũng như các

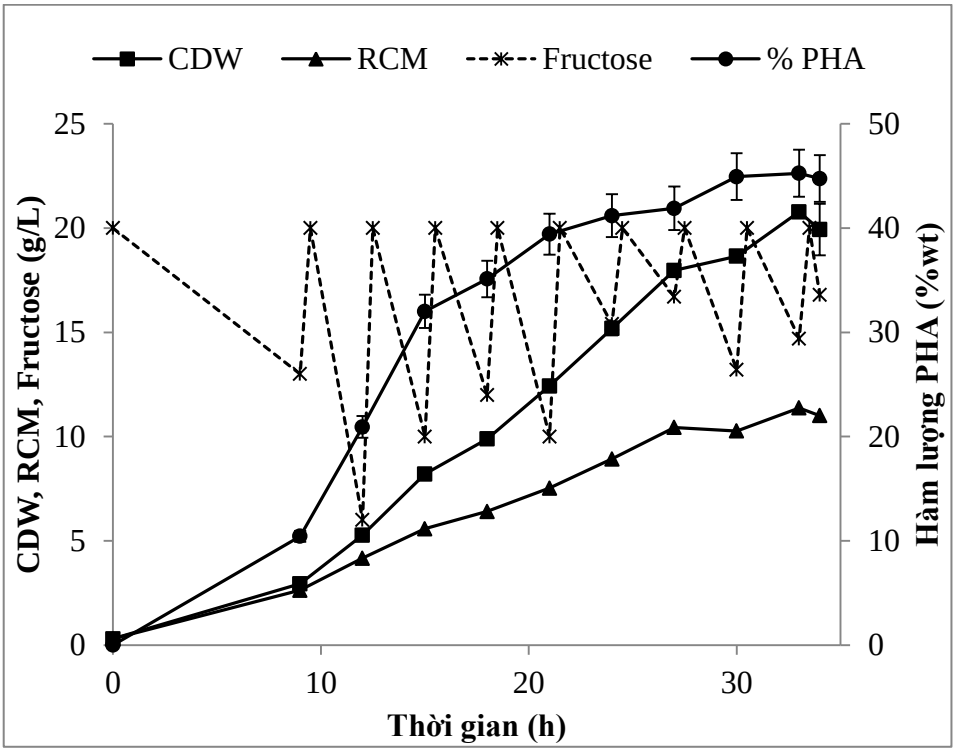
quá trình trao đổi chất nội bào bị ảnh hưởng nghiêm trọng có thể là nguyên nhân chính khiến cho hiệu suất lên men không đạt được kết quả cao.

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

Kết quả nghiên cứu động thái lên men trong nuôi cấy mẻ cho thấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có khả năng sinh tổng hợp PHA song song với quá trình sinh trưởng của tế bào. Do đặc điểm của các vi khuẩn tích lũy PHA không yêu cầu điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng, bởi vậy việc duy trì một môi trường lên men phù hợp nhằm đảm bảo thu được năng suất cao là vô cùng quan trọng. Dựa trên các thông số động thái trong lên men mẻ, chúng tôi đánh giá nguồn C có thể là yếu tố chủ đạo ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất PHA của chủng vi khuẩn này. Chính vì thế chúng tôi đã tiến hành các thực nghiệm nuôi cấy mẻ có bổ sung dinh dưỡng với chiến lược duy trì nồng độ fructose khác nhau đối với chủng vi khuẩn này nhằm xác định điều kiện thích hợp giúp nâng cao năng suất sản xuất PHA.

Trong chiến lược lên men thứ nhất, nồng độ fructose trong môi trường được chúng tôi duy trì ở mức 20 g/L trong suốt quá trình nuôi cấy bằng cách xác định nồng độ đường thực tế và bổ sung một cách thường xuyên vào môi trường lên men sau mỗi 1,5 h nuôi cấy. Như thể hiện ở hình 3.11, động thái tích lũy PHA thu được có dạng gần tương tự như trong quá trình lên men mẻ thu được ở trên. Hàm lượng PHA tăng nhanh chóng từ 10,4 %wt lên 32 %wt ngay trong giai đoạn đầu của quá trình nuôi cấy (từ 9 h đến 15 h nuôi cấy) kể cả trong điều kiện môi trường giàu dinh dưỡng được cung cấp một cách liên tục. Mức độ tích lũy tiếp tục tăng ổn định trong giai đoạn tiếp theo và đạt giá trị cao nhất là 45,3 %wt ở thời điểm 33 h nuôi cấy.

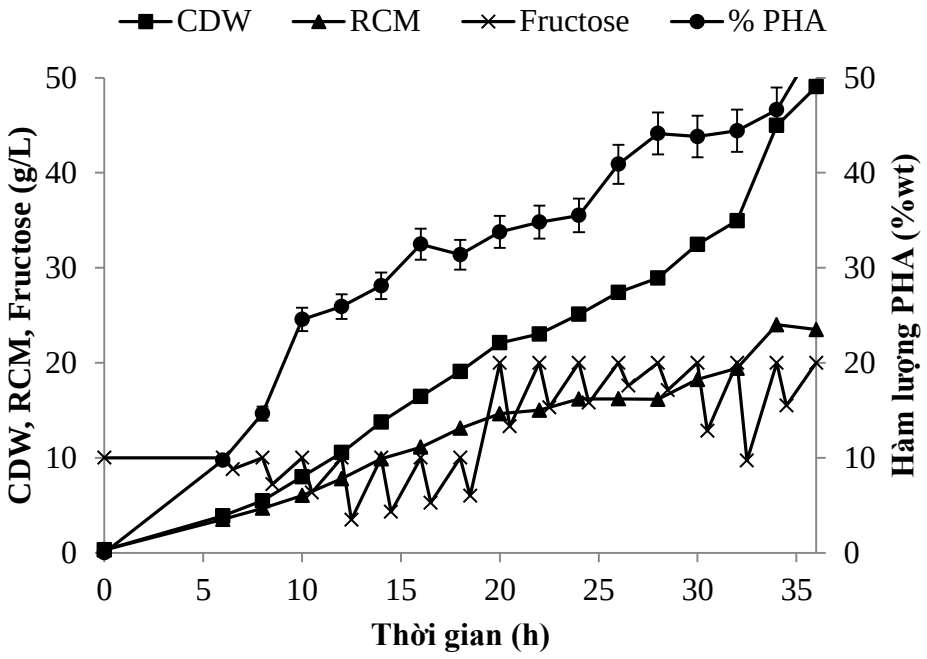


Hình 3.11. Lên men sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 với nồng độ 20 g/L fructose

Với việc bổ sung môi trường giàu dinh dưỡng trong giai đoạn đầu (giai đoạn từ 3h đến 18 h nuôi cấy), CDW thu được cao gấp 2,3 lần so với trong quá trình lên men mẻ ở cùng thời điểm nuôi cấy. Tuy nhiên sự tăng CDW phần lớn là do lượng sinh khối tế bào (RCM) tăng lên, trong khi mức độ tích lũy PHA nội bào hầu như không có sự sai khác so với kết quả thu được trong quá trình lên men mẻ mặc dù nồng độ fructose vẫn được duy trì ở mức cao. Có thể sự tích lũy PHA sớm và nhanh chóng ở giai đoạn nuôi cấy đầu tiên đã phần nào có tác động ức chế ngược đến cả sinh trưởng tế bào cũng như quá trình sinh tổng hợp polymer ở giai đoạn sau. Do đó sự thay đổi nồng độ fructose trong quá trình lên men được chúng tôi đặt ra là phương án giải quyết nhằm cải thiện quá trình lên men sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn này.

Chiến lược lên men thứ hai, chúng tôi tiến hành một thay đổi nhỏ về nồng độ fructose duy trì trong môi trường theo từng giai đoạn nuôi cấy. Cụ thể, nồng độ fructose được duy trì xung quanh mức 10 g/L trong giai đoạn đầu tiên (ban đầu cho đến 18 h nuôi cấy), và sau đó nâng lên mức 20 g/L trong giai đoạn sau cho đến khi kết thúc quá trình nuôi cấy. Quá trình duy trì và thay đổi nồng độ fructose được tiến

hành bằng cách xác định nồng độ đường thực tế trong dịch nuôi cấy và bổ sung liên tục như trình bày ở trên.



Hình 3.12. Lên men sản xuất PHA từ chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *với sự thay đổi nồng độ fructose hai giai đoạn*

Như thể hiện ở hình 3.12, CDW cao nhất đạt 49 g/L với hàm lượng PHA đạt 54 %wt khi kết thúc quá trình lên men (thời điểm 36 h nuôi cấy). Sự thay đổi chiến lược bổ sung nguồn C thể hiện ảnh hưởng rõ qua động thái sinh trưởng cũng như quá trình tích lũy PHA. Với nồng độ fructose không quá cao trong giai đoạn đầu, CDW thu được cao gấp đôi khi so sánh với giá trị này trong chiến lược lên men thứ nhất ở cùng thời điểm lấy mẫu trong khi hàm lượng PHA tích lũy được thấp hơn. Điều đó chứng tỏ có một sự cân bằng nhất định giữa hai quá trình sinh trưởng và tích lũy PHA của tế bào. Mật độ tế bào cao là tiền đề quan trọng để nâng cao hiệu quả sản xuất PHA trong quá trình lên men [82]. Phân tích sắc kí khí các mẫu sinh khối tế thu thập trong quá trình lên men, chúng tôi thấy rằng quá trình tích lũy polymer cũng xảy ra ngay ở giai đoạn sớm với hàm lượng PHA đạt khoảng 32 %wt sau 18 h nuôi cấy và hiệu suất chuyển hóa khá cao đạt 0,26 g PHA /g fructose, tuy nhiên năng suất sản xuất thấp (đạt 0,2 g/L/h) (hình 3.12). Điều

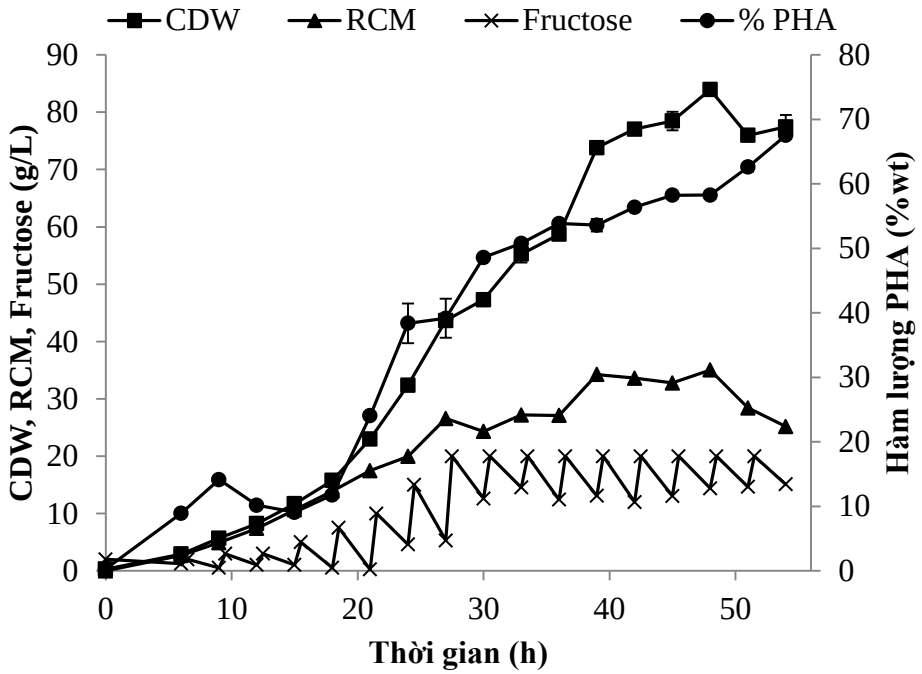
đó chứng tỏ với nồng độ 10 g/L fructose, mặc dù vẫn có vai trò kích hoạt quá trình sinh tổng hợp PHA của tế bào, tuy nhiên mức độ ức chế sự sinh trưởng của tế bào đã giảm đi rõ rệt. Quá trình tích lũy P(3HB) cao ngay ở pha sinh trưởng cấp số đã được thấy ở *Azotobacter vinelandii* UWD khi nuôi cấy trong điều kiện 10 g/L glucose [141]. Ngược lại, hiệu suất chuyển hóa thành P(3HB) thấp (0,08 g/g) nhưng hiệu suất chuyển hóa thành sinh khối tế bào cao (0,38 g/g) trong pha sinh trưởng cấp số khi nuôi cấy chủng vi khuẩn *Alcaligenes eutrophus* với nồng độ glucose được duy trì trong khoảng 10 g/L đến 20 g/L đã được báo cáo bởi Kim và Cs (1994). Trong điều kiện nguồn amoni được cung cấp đầy đủ, chủng vi khuẩn *A. eutrophus* tích lũy P(3HB) với hàm lượng rất thấp (< 5 g/L) mặc dù nguồn C trong môi trường dư thừa [96].

Giai đoạn thứ hai được tiếp tục sau 18 h nuôi cấy và kết thúc ở thời điểm 36 h khi giá trị mật độ quang của dịch nuôi cấy đo được ở bước sóng 600 nm hầu như không thay đổi. Kết thúc giai đoạn này, giá trị CDW và hàm lượng PHA đạt được cao nhất song giá trị RCM lại có xu hướng giảm. Hiệu suất chuyển hóa cũng như năng suất sản xuất trong giai đoạn hai (đạt 0,33 g PHA/g fructose và 0,73 g/L/h) thu được cao hơn so với giai đoạn đầu. Bên cạnh đó mặc dù giá trị RCM vẫn tăng nhưng với tốc độ chậm dần và có xu hướng giảm sau thời điểm 34 h (hình 3.11), chứng tỏ rằng trong giai đoạn này quá trình sinh tổng hợp PHA chiếm ưu thế trong tế bào trong khi sự tăng sinh tế bào diễn ra chậm. Khác với kết quả chúng tôi thu được, trong nghiên cứu của Kim và Cs (1994) cho thấy giá trị RCM khi nuôi cấy *A. eutrophus* có xu hướng giảm khi nguồn amoni bổ sung bị dừng lại, tuy nhiên mức độ tích lũy P(3HB) lại tăng mạnh mẽ [95]. Sử dụng chiến lược nuôi cấy tương tự đối với chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. EL-2, Son và Cs (2000) đã thu được các kết quả tương đương về hàm lượng và khả năng sản xuất PHA (53 %wt và 0,84 g/L/h, theo thứ tự), song CDW và hiệu suất chuyển hóa cơ chất (38 g/L và 0,2 g/g, theo thứ tự) của chủng này thấp hơn trong nghiên cứu của chúng tôi khi sử dụng chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 [173]. So sánh với chủng vi khuẩn ưa mặn khác là *Halomonas boliviensis* LC1 khi nuôi cấy trong điều kiện nồng độ

glucose duy trì ở 20 g/L thì kết quả CDW chúng tôi thu được là tương đương, song mức độ tích lũy PHA lại thấp hơn [150].

Các kết quả CDW, hàm lượng PHA tích lũy trong quá trình lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng đối với chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 đã được cải thiện thông qua thay đổi nhỏ đối với nguồn C duy trì trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, chúng tôi nhận thấy quá trình sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 xảy ra mạnh mẽ khi nồng độ fructose cao kể cả trong điều kiện môi trường giàu dinh dưỡng. Quá trình sinh tổng hợp PHA là một phần của chuỗi chuyển hóa vật chất nội bào có liên quan đến các quá trình sinh lý khác của tế bào vi khuẩn thông qua vật chất trung gian là acetyl-coA. Do đó hoạt động tích lũy PHA xảy ra mạnh có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và tăng số lượng tế bào vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy, qua đó làm giảm hiệu quả sản xuất PHA của chủng vi khuẩn này. Vì lí do đó, chúng tôi tiếp tục điều chỉnh chiến lược duy trì nồng độ cơ chất fructose phù hợp nhằm hạn chế quá trình sinh tổng hợp PHA ở giai đoạn sớm của quá trình lên men để tạo điều kiện cho quá trình tăng sinh khối tế bào diễn ra thuận lợi hơn.

Chiến lược lên men thứ ba, với mục đích hạn chế hoạt động sinh tổng hợp PHA và tạo điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng của tế bào vi khuẩn. Nồng độ fructose trong giai đoạn đầu (18 h đầu) của quá trình lên men được duy trì ở khoảng 2 đến 3 g/L cùng với dung dịch giàu dinh dưỡng đậm đặc được bổ sung liên tục (pha 1). Sau đó nồng độ fructose trong môi trường được điều chỉnh tăng dần và duy trì theo từng nấc từ 3 g/L lên 15 g/L sau mỗi khoảng thời gian 3 h cho đến thời điểm giờ thứ 33. Đồng thời dung dịch khoáng đậm đặc không chứa nguồn nitơ được bổ sung liên tục với tốc độ 10 ml/h (pha 2). Quá trình tích lũy PHA được tăng cường bằng cách duy trì nồng độ fructose ở mức 20 g/L sau 33 h cho đến khi kết thúc quá trình nuôi cấy.



Hình 3.13. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *với nồng độ fructose tăng dần*

Như thể hiện ở hình 3.13, sự thay đổi chiến lược duy trì nồng độ fructose trong lên men thu được kết quả vô cùng khả quan. Mặc dù vẫn có sự tích lũy PHA thấp (dao động 9 đến 15 %wt) khi nồng độ fructose duy trì thấp trong suốt pha 1, tuy nhiên sự sinh trưởng của tế bào đạt được rất cao với giá trị RCM tăng từ 2,6 g/L lên 14 g/L thu được ở cuối pha nuôi cấy. Sự tăng mật độ tế bào một cách nhanh chóng cũng có thể theo dõi được thông qua việc xác định giá trị mật độ quang ở bước sóng 600 nm tại mỗi thời điểm lấy mẫu. Trong suốt 18 h nuôi cấy đầu tiên hầu như không thấy có sự tăng lên của hàm lượng PHA nội bào, chứng tỏ hoạt động sinh tổng hợp polymer của tế bào trong giai đoạn này hầu như không xảy ra. Lượng fructose được duy trì ở hàm lượng thấp chủ yếu được sử dụng để cấu trúc tế bào vi khuẩn. Kết quả thu được cho thấy mức độ mẫn cảm của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 đối với nồng độ C trong môi trường nuôi cấy. Đây là một điểm khá đặc biệt của chủng vi khuẩn này so với một số loài khác. Trong pha 1 của quá trình nuôi cấy bán liên tục, chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* BM01 hầu như không tích lũy PHA kể cả trong điều kiện nồng độ glucose được duy trì

liên tục dao động từ 10 đến 20 g/L [97]. Kết quả tương tự đối với chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. EL-2 cũng được Son và Cs (2000) công bố [173]. Ngược lại, nồng độ glucose thấp lại là điều kiện thích hợp cho chủng vi khuẩn *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 sinh trưởng và tích lũy polymer với nồng độ tế bào đạt 154 g/L và hàm lượng P(3HB) đạt 62 %wt [164].

Mức độ nhạy cảm với nguồn C của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 thể hiện rõ ràng khi nồng độ fructose tăng dần trong pha thứ hai của quá trình nuôi cấy. Hoạt động sinh tổng hợp PHA xảy ra mạnh mẽ trong pha này với hàm lượng polymer nội bào tăng nhanh chóng từ 12 %wt lên tới 51 %wt, cùng với năng suất sản xuất và hiệu suất chuyển hóa cao đạt 0,85 g/L/h và 0,31 g PHA/g fructose, theo thứ tự, ở thời điểm 33 h nuôi cấy. Bên cạnh đó giá trị RCM tăng gấp đôi từ 14 g/L lên 27,16 g/L cho thấy sự sinh trưởng của tế bào hầu như không ảnh hưởng trong pha này, đây là tiền đề giúp cải thiện quá trình tích lũy PHA ở giai đoạn sau của quá trình lên men (hình 3.13).

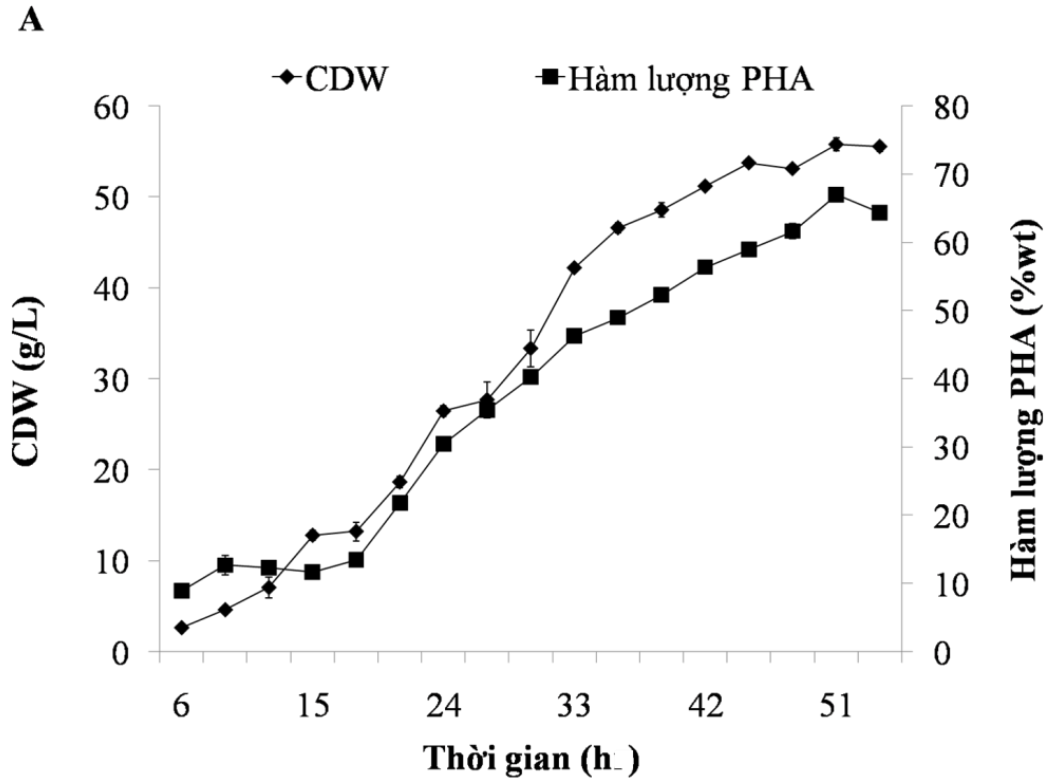
Khi nồng độ fructose tăng lên 20 g/L, hiệu suất chuyển hóa trong suốt giai đoạn này ổn định ở mức 0,3 g/g cơ chất và năng suất sản xuất đạt 1 g/L/h. Hàm lượng PHA thu được tăng từ 53,8 %wt lên 67,5 %wt khi kết thúc quá trình lên men. Trong khi đó RCM gần như ổn định và có xu hướng suy giảm vào cuối quá trình lên men. Kết quả thu được của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 là khá cao so với một số vi khuẩn ưa mặn đã được công bố. Năng suất sản xuất P(3HB) tương đương nhưng CDW thấp hơn (44 g/L) và hàm lượng polymer cao hơn (81 %wt) thu được bởi *Halomonas boliviensis* LC1 trên nguồn glucose [150]. Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy bán liên tục mở đối với chủng vi khuẩn *Halomonas* TD1 thu được CDW tương đương (80 g/L) với hàm lượng P(3HB) cao hơn (80 %wt) trên nguồn cơ chất glucose đã được Tan và Cs (2011) công bố [189]. Trong khi đó các nghiên cứu đối với chủng vi khuẩn *Haloferax mediterranei* trên các nguồn cơ chất khác nhau cho kết quả thấp hơn so với trong nghiên cứu này [40, 58, 79].

b) Lên men sử dụng xiro ngô (high fructose corn syrup-HFCS)

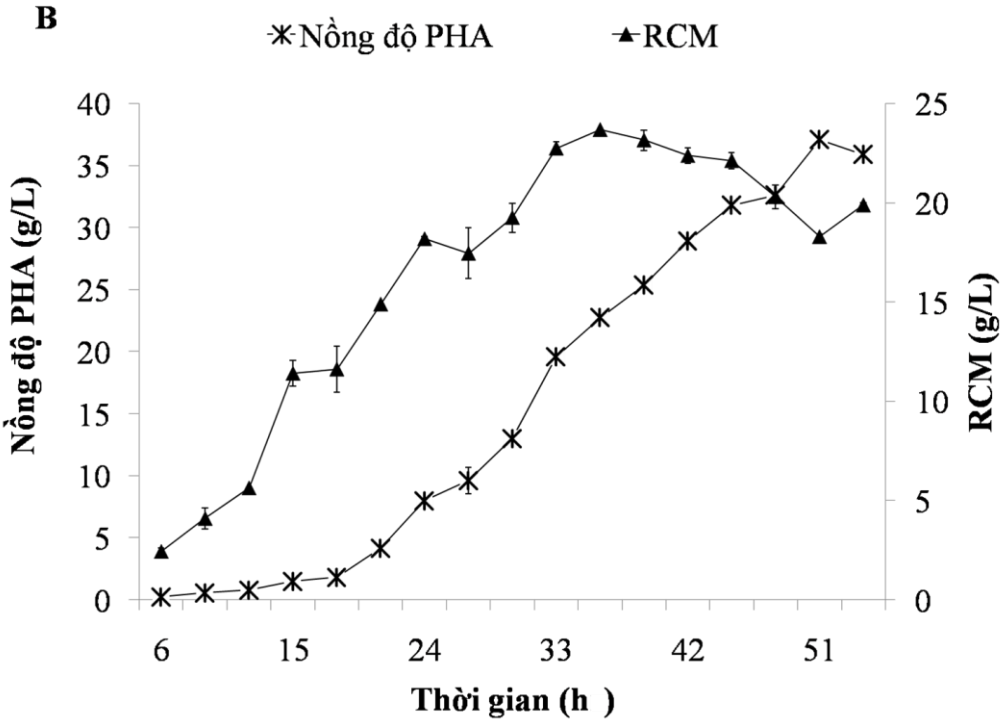
Quá trình lên men bán liên tục sản xuất PHA từ chủng *Yangia* sp. NĐ199 sử dụng nguồn xiro ngô được tiến hành dựa trên chiến lược nuôi cấy đã được nghiên cứu ở trên. Trong giai đoạn đầu, CDW tăng từ 2,7 g/L lên 13,2 g/L cũng với sự tăng

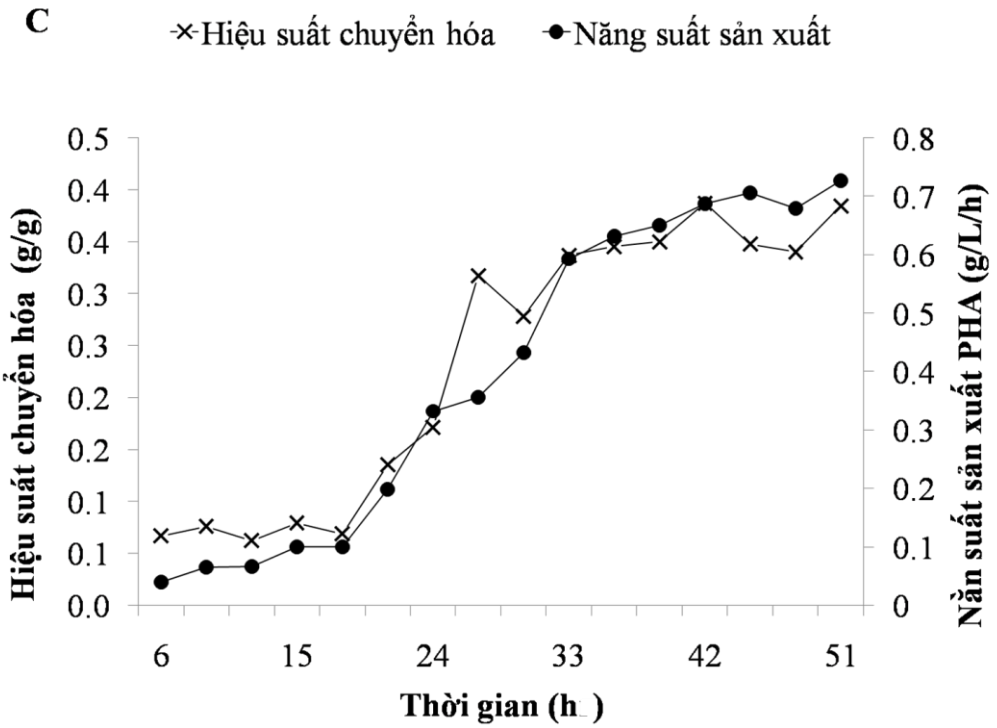
của giá trị RCM (từ 2,4 g/L lên 11,6 g/L) trong khi hàm lượng PHA tích lũy được chỉ đạt 13,5 %wt sau 18 h nuôi cấy (hình 3.14-A và 3.14-B). Nồng độ đường thấp trong khi hàm lượng các nguồn dinh dưỡng khác trong môi trường cao đã thúc đẩy sự sinh trưởng của tế bào trong khi hạn chế quá trình sinh tổng hợp PHA. Kết quả thu được trong giai đoạn này là tương đương với nghiên cứu ở trên khi sử dụng fructose tinh khiết làm nguồn C.

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 giai đoạn hai đạt 46,3 %wt và cao nhất đạt 67 %wt ở thời điểm 51 h của quá trình nuôi cấy (hình 3.14-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 C tinh khiết (hình 3.14-A và 3.14-C).



Hình 3.14. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *sử dụng nguồn xiro ngô không thanh trùng*





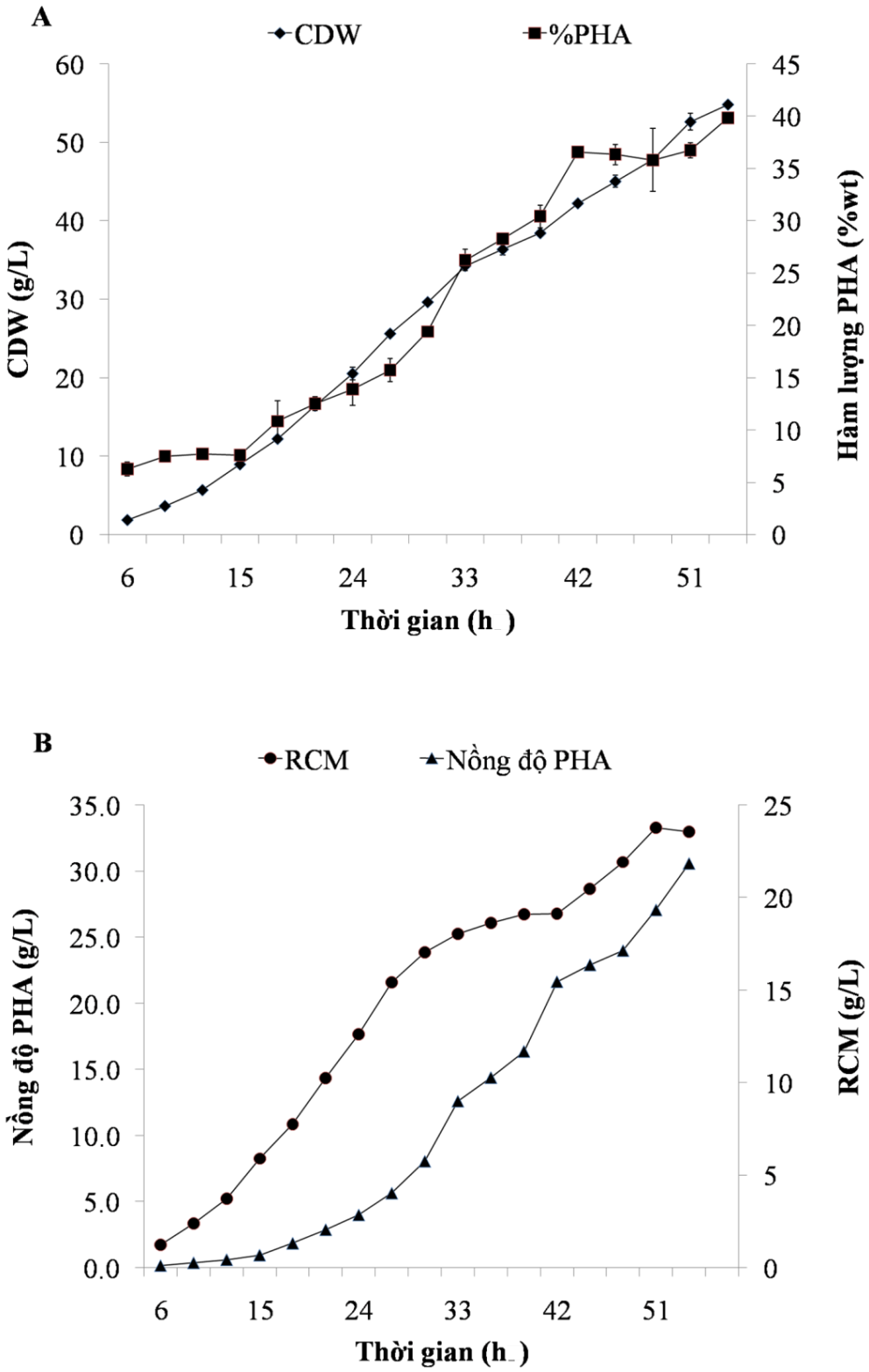
Hình 3.14. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *sử dụng nguồn xiro ngô không thanh trùng (tiếp)*

Sản phẩm xiro ngô thương mại thường được dùng trong công nghiệp sản xuất thực phẩm, do đó luôn có một lượng nhỏ chất bảo quản được bổ sung nhằm duy trì và bảo quản sản phẩm. Đây có thể là một trong những yếu tố tác động không nhỏ đến hiệu quả sử dụng nguồn cơ chất này bởi chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trong quá trình lên men. Mặc dù vậy, như kết quả nghiên cứu ở trên thì sự có mặt của thành phần glucose trong xiro ngô giúp tạo ra sản phẩm polymer có giá trị hơn. Bên cạnh đó xiro ngô là nguồn cơ chất dễ kiếm, rẻ tiền, và có thể được sử dụng trực tiếp không qua thanh trùng bởi chủng vi khuẩn này, do đó có thể giúp giảm giá thành sản xuất PHA.

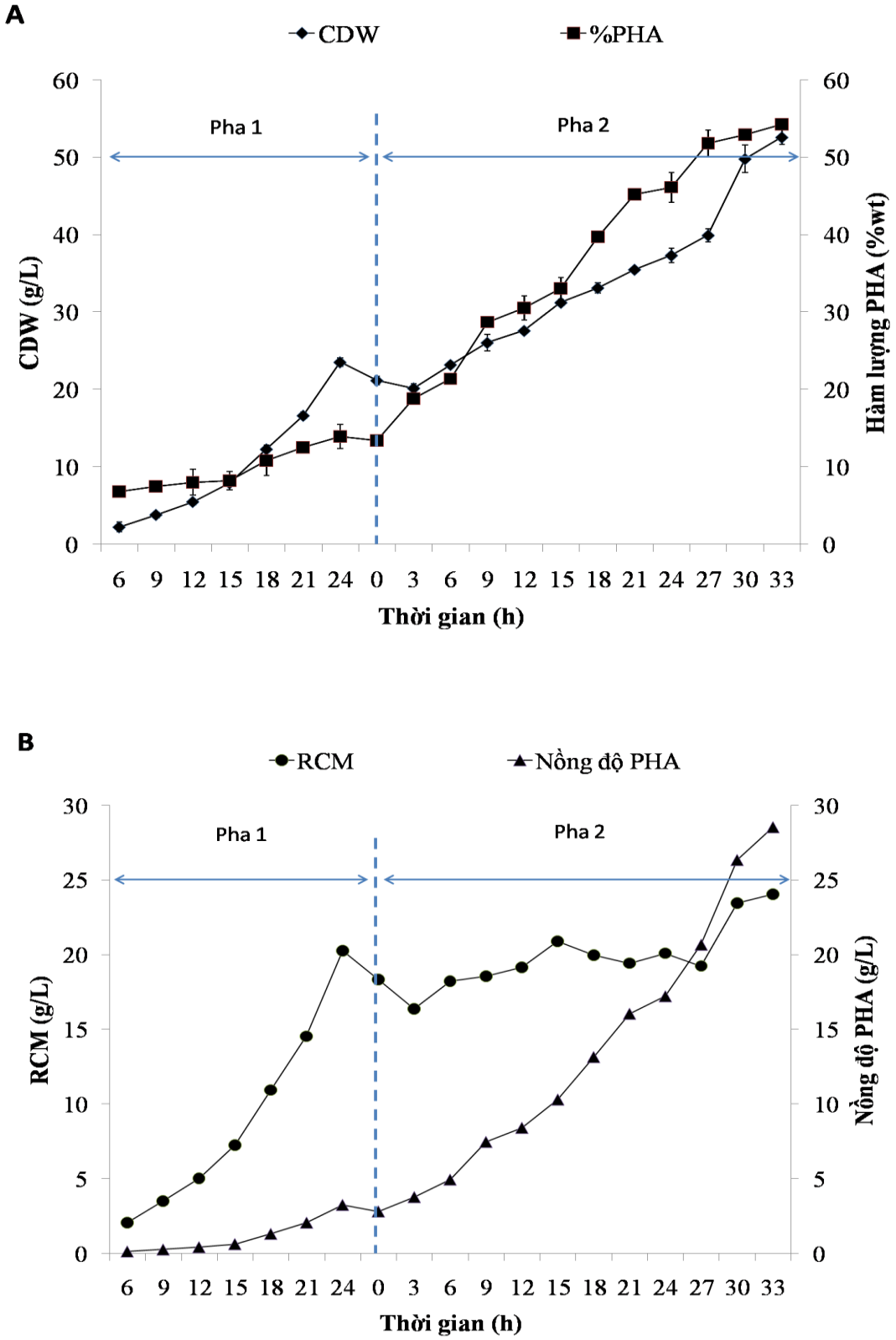
c) Lên men sử dụng rỉ đường

Rỉ đường là nguồn phụ phẩm của công nghiệp sản xuất đường. Bên cạnh hàm nguồn C dồi dào, nó còn chứa nhiều loại vitamin và các chất khoáng. Đặc biệt đây là nguồn dinh dưỡng dễ kiếm, rẻ tiền có tiềm năng trở thành nguồn nguyên liệu giúp giảm giá thành sản xuất PHA. Chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm khả năng sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trên nguồn cơ chất này bằng cách sử dụng phương pháp lên men bán liên tục hai giai đoạn như đã trình bày phần phương pháp.

Như thể hiện ở hình 3.15, 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 C đã sử dụng ở trên. CDW và hàm lượng PHA nội bào thu được cao nhất sau 54 h nuôi cấy đạt 54,8 g/L và 39,8 %wt, theo thứ tự (hình 3.15-A). Giá trị RCM (g/L) sau 54 h nuôi cấy đạt 33 g/L thu được khi sử dụng rỉ đường là tương đương so với khi sử dụng fructose tinh khiết (hình 3.15-B). Tuy nhiên mức độ tích lũy PHA thấp khiến cho hiệu quả lên men của chủng vi khuẩn này trên nguồn cơ chất rỉ đường là không cao với năng suất sản xuất polymer chỉ đạt 0,4 g/L/h. Kết quả tương tự thu được đối với chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. JMa5 trên nguồn rỉ đường với CDW đạt 70 g/L những hàm lượng P(3HB) chỉ đạt 30 %wt [211]. Ngược lại, đối với chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* lại có khả năng tích lũy P(3HB) rất cao (80 %wt) song CDW thu được (39,5 g/L) thấp hơn so với kết quả thu được trong nghiên cứu này [120].



Hình 3.15. Lên men sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *sử dụng nguồn rỉ đường*



Hình 3.16. Lên men hai pha sản xuất PHA bởi chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199 *trên nguồn rỉ đường và glucose*

Nguồn saccharose là thành phần C chính trong rỉ đường có thể là nguyên nhân chủ yếu ảnh hưởng đến hiệu quả sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn này. Bên cạnh đó, việc bổ sung liên tục rỉ đường vào môi trường cũng có thể khiến hàm lượng các chất ức chế trong môi trường tăng lên đã ảnh hưởng không nhỏ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của tế bào vi khuẩn. Để hạn chế ảnh hưởng không mong muốn của các thành phần rỉ đường đối với sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199, kỹ thuật lên men hai pha có bổ sung dinh dưỡng đã được sử dụng kết hợp với sự thay đổi nguồn C được sử dụng cho quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA ở mỗi pha. Ở pha nuôi cấy đầu tiên, dung dịch dinh dưỡng chứa nguồn C là rỉ đường được sử dụng nhằm tối ưu sự tăng sinh tế bào vi khuẩn. Sau 24 h nuôi cấy, toàn bộ sinh khối được lọc, rửa qua màng lọc khuẩn để loại bỏ các thành phần gây ức chế đối với sinh tổng hợp polymer có trong môi trường. Tiếp đó sinh khối được chuyển sang pha nuôi cấy thứ hai với môi trường hoàn toàn mới. Dung dịch dinh dưỡng dùng để bổ sung chứa glucose nồng độ cao (nguồn C đơn giản, dễ kiếm) và không chứa nguồn nitơ nhằm tăng khả năng tích lũy PHA bởi tế bào vi khuẩn.

Kết quả được thể hiện trong hình 3.16 cho thấy sau 54 h lên men (thời điểm 30 h 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 3.16-A). Hàm lượng PHA vẫn có xu hướng tăng và đạt giá trị 54,3 %wt sau 57 h nuôi cấy (thời điểm 33 h 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 3.16-B). Kết quả thu được cho thấy quá trình lên men hai pha có bổ sung dinh dưỡng giúp cải thiện khả năng sản xuất PHA của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khi sử dụng rỉ đường làm nguồn cơ chất chủ yếu.

Qua các kết quả nghiên cứu thu được chúng tôi nhận thấy chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có khả năng sinh trưởng trên nhiều nguồn C khác nhau và sinh tổng hợp PHA đa dạng bao gồm cả P(3HB) và copolymer của nó. Khả năng sinh trưởng trên nhiều nguồn C cho thấy khả năng thích ứng cao của chủng vi khuẩn này

trong những điều kiện môi trường khác nhau. Ngoài ra, khả năng sinh tổng hợp nhiều loại PHA trên các nguồn C khác nhau chứng tỏ mức độ trao đổi chất nội bào đa dạng của chủng vi khuẩn này. Khả năng sinh tổng hợp các loại copolymer mang các đặc tính hóa – lý ưu việt của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 là một lợi thế trong sản xuất PHA với nhiều ứng dụng khác nhau ở quy mô công nghiệp. Một số vi khuẩn ưa mặn được công bố gần đây cho thấy sản phẩm P(3HB) thu được khi nuôi cấy trên nguồn C thông thường như carbohydrate hoặc glycerol [92, 150, 152, 159, 189]. Phần lớn các vi khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp copolymer khi được bổ sung những tiền chất phù hợp [83, 189]. Trong khi số khác lại được thông báo có khả năng sinh tổng hợp copolymer trên các nguồn C thông thường [104, 219].

Chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có thể được xếp vào nhóm các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA không phụ thuộc vào điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng dựa trên những kết quả nghiên cứu thực nghiệm thu được. Chính vì thế, việc sử dụng chiến lược lên men hợp lý đã giúp khả năng sản xuất của chủng này được cải thiện đáng kể. Khả năng sản xuất của một chủng vi khuẩn được đánh giá trên nhiều phương diện khác nhau và tập trung vào một số giá trị cụ thể như CDW (g/L), hàm lượng PHA (%wt) và năng suất (g/L/h) thu được trong quá trình lên men. Với kỹ thuật lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng với chiến lược duy trì hàm lượng C tăng dần theo từng giai đoạn một cách hợp lý, giá trị CDW của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NDD199 thu được cao hơn so với các chủng vi khuẩn *Halomonas boliviensis* LC1 với nguồn glucose [149] và tương đương với chủng vi khuẩn *Halomonas* TD1 khi nuôi trên nguồn glucose [189]. Tuy nhiên hàm lượng PHA tích lũy và năng suất thu được của chủng vi khuẩn này thấp hơn so với hai chủng vi khuẩn trên (bảng 3.11). Tương tự như chủng vi khuẩn *Haloferax mediterranei* [40, 79], hiệu quả sản xuất của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 cũng có sự thay đổi đáng kể khi sản xuất trên các nguồn C khác nhau (bảng 3.11).

Bảng 3.11. Khả năng sản xuất PHA của một số chủng vi khuẩn ưa mặn

STT	Vi khuẩn	Kiểu lên men	Nguồn C	Loại PHA	CDW (g/L)	%PHA (%wt)	Năng suất (g/L/h)	Tham khảo
1	*Halomonas boliviensis* LC1	Mẻ bổ sung dinh dưỡng	Glucose	P(3HB)	44	81	1,1	[149]
2	*Halomonas* TD1	Mẻ bổ sung dinh dưỡng	Glucose	P(3HB)	83	78	1,46	[189]
3	*Haloferax mediterranei*	Mẻ bổ sung dinh dưỡng	Tinh bột đùn	P(3HB-co-3HV)	39,4	50,8	-	[40]
4	*Haloferax mediterranei*	Mẻ bổ sung dinh dưỡng lặp lại	Cám và tinh bột ngô đùn (1:8)	-	140	55,6	-	[79]
			Tinh bột ngô đùn	-	62,6	38,7	-	
5	*Yangia* sp. NĐ199	Mẻ bổ sung dinh dưỡng	Fructose	P(3HB)	78	67,5	1	Nghiên cứu này
			Xiro ngô	P(3HB-co-3HV)	55,8	67	0,73	
			Rỉ đường	P(3HB-co-3HV)	54,8	39,8	0,4	
		Hai pha bổ sung dinh dưỡng	Rỉ đường (pha 1), glucose (pha 2)	P(3HB-co-3HV)	50	52,9	0,48	

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

Trong số các phương pháp tách chiết và thu hồi hiện nay, chúng tôi lựa chọn phương pháp thủy phân các thành phần không phải polymer nhằm xây dựng quy trình thu hồi và tinh sạch PHA trực tiếp từ sinh khối lên men chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 nhằm đảm bảo các yếu tố: (1) đơn giản, (2) hiệu quả cao, (3) ít ảnh hưởng đến môi trường, (4) rẻ tiền. Dựa trên các nghiên cứu khảo sát chúng tôi cũng

lựa chọn NaOH như là tác nhân chính để tiến hành các nghiên cứu thu hồi và tinh sạch PHA trực tiếp từ sinh khối sau quá trình lên men của chủng vi khuẩn *Yangia* sp.NĐ199.

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

Thí nghiệm được thực hiện nhằm xác định sự ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ cũng như nồng độ của tác nhân NaOH đến hiệu quả tinh sạch và chất lượng sản phẩm PHA thu được. Mô hình thí nghiệm được tiến hành như trình bày ở bảng 3.12. Sự thay đổi các thông số trong quá trình xử lý có ảnh hưởng đến độ tinh sạch và hiệu quả thu hồi polymer [215]. Tuy nhiên việc sử dụng nồng độ cao NaOH (0,2 M đến 0,5 M) để tách chiết PHA từ sinh khối vi khuẩn đôi khi không cho thấy sự khác biệt về độ sạch [134]. Ngoài ra, việc sử dụng nồng độ NaOH cao (0,5 M) trong tách chiết PHA từ tế bào có thể là nguyên nhân dẫn đến sự phá hủy polymer [77]. Vì những lý do trên, dải nồng độ NaOH thấp (0,05 M đến 0,2 M) được chúng tôi sử dụng nhằm thu hồi PHA trực tiếp từ sinh khối của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý và nồng độ NaOH đến hiệu quả tinh sạch PHA từ sinh khối Yangia sp. NĐ199

Nồng độ NaOH (M)	**30 ^{o}C**		**40 ^{o}C**		**50 ^{o}C**	
	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

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH (ở 50 ^oC) đến một số thuộc tính của sản phẩm PHA thu được

Điều kiện xử lý	**M_w** (10^5 Da)	**M_n** (10^5 Da)	**PDI** (M_w/M_n)	**Thuộc tính nhiệt**	
				T_m (^oC)	**T_g (^oC)**
ĐC	18,6	4,79	3,9	173,21	3,59
0,05	11,7	3,65	3,2	168,48	7,23
0,075	10,2	4,48	2,3	174,54	6,56
0,1	9,7	3,9	2,5	173,03	6,33
0,125	9,1	3,62	2,5	173,29	6,19
0,15	7,8	2,65	2,9	171,05	6,26
0,2	6,5	1,73	3,7	168,05	4,28

Kết quả trong bảng 3.12 cho thấy độ tinh sạch (%wt) của các mẫu xử lý tăng khi nồng độ NaOH tăng và đạt cực đại ở nồng độ 0,2 M NaOH. Độ tinh sạch cao nhất thu được là 85 ± 0,4 %wt ở điều kiện xử lý 40 ^oC và 0,2 M NaOH, song hiệu suất thu hồi polymer chỉ đạt 95,2 ± 0,7 %. Độ sạch của sản phẩm PHA tương đương (84 %wt) cũng thu được với các điều kiện xử lý với 0,125 M NaOH và 0,2 M NaOH ở 50 ^oC với hiệu suất thu hồi polymer lần lượt là 98,3% và 91,9%. Quá trình xử lý NaOH không chỉ hòa tan một số thành phần tế bào mà còn giúp tăng tính thấm của thành tế bào dẫn đến sự giải phóng các thành phần hòa tan khỏi tế bào được dễ dàng hơn [77].

Độ tinh sạch của PHA cũng có xu hướng xu hướng tăng nhẹ khi nhiệt độ xử lý tăng từ 30 ^oC lên 40 ^oC, tuy nhiên sự thay đổi thể hiện không rõ ràng khi tăng nhiệt độ từ 40 ^oC lên 50 ^oC (bảng 3.12). Ngược lại với độ sạch, hiệu suất thu hồi có xu hướng giảm khi tăng nhiệt độ và nồng độ NaOH, hiệu suất thu hồi giảm xuống chỉ còn 91 % ở điều kiện xử lý 50 ^oC và 0,2 M NaOH. Hiệu suất thu hồi PHA giảm khi tăng nồng độ NaOH hoặc/và nhiệt độ xử lý cũng đã được thông báo trong nhiều nghiên cứu trước đây [21, 44, 215].

Mẫu PHA thu được khi xử lý sinh khối với các nồng độ NaOH ở 50 ^{o}C được chúng tôi tiến hành kiểm tra một số chỉ tiêu hóa-lý. Kết quả trình bày ở bảng 3.13 cho thấy có sự suy giảm nhẹ về giá trị M_w của các mẫu PHA thí nghiệm, trong khi giá trị độ phân tán PDI lại có xu hướng giảm đi. Kết quả thay đổi này phù hợp với sự thay đổi của hiệu suất thu hồi khi nồng độ NaOH dược sử dụng tăng lên. Đây có lẽ là hậu quả do tác động bào mòn của NaOH đối với hạt PHA trong quá trình xử lý. Sự suy giảm M_w của PHA từ 4,8 kDa xuống 2,6 kDa cũng xảy ra khi nồng độ NaOH được sử dụng tăng từ 0,1 M lên 0,3 M trong nghiên cứu của Anis và Cs (2012) đối với chủng *C. necator* tái tổ hợp [21]. Bên cạnh đó các giá trị thuộc tính nhiệt (T_m và T_g) của mẫu PHA thí nghiệm trong nghiên cứu này đều không thể hiện sự khác biệt so với mẫu PHA tách chiết từ sinh khối ban đầu (bảng 3.13). Điều đó chứng tỏ chất lượng của PHA thu hồi từ sinh khối chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 nhờ xử lý NaOH là không có sự thay đổi đáng kể. Độ sạch (%wt) và hiệu suất thu hồi (%) là hai tiêu chí quan trọng trong quy trình thu nhận PHA từ sinh khối vi khuẩn. Bên cạnh đó nồng độ tác nhân xử lý cũng là một yếu tố quan trọng nhằm hạn chế lượng hóa chất thừa thải ra môi trường cũng như đảm bảo chất lượng của sản phẩm PHA. Vì các lý do trên chúng tôi quyết định lựa chọn điều kiện xử lý ở 50 ^{o}C với tác nhân xử lý 0,125 M NaOH để tiến hành các nghiên cứu xử lý tiếp theo.

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

Ảnh hưởng của thời gian xử lý đến độ tinh sạch, hiệu quả thu hồi và chất lượng của PHA được thể hiện ở bảng 3.14. Độ tinh sạch của mẫu PHA tăng dần từ 72,2 %wt lên 91,9 %wt khi thời gian xử lý mẫu tăng từ 0 đến 5 h, trong khi đó hiệu suất thu hồi của các thời gian xử lý không có sự sai khác rõ rệt. Tiến hành thí nghiệm song song với xử lý chỉ bằng nước chúng tôi thấy rằng độ tinh sạch cũng như hiệu quả thu hồi theo thời gian của mẫu đối chứng là hầu như không có sự sai khác. Bên cạnh đó, phân tích DSC và GPC các mẫu PHA thu hồi được nhờ xử lý NaOH cũng cho thấy sự đồng đều ở các chỉ tiêu và không có sự sai khác nhiều so với mẫu ban đầu (bảng 3.14).

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của thời gian xử lý tới hiệu quả tinh sạch PHA từ sinh khối vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Thời gian (phút)	**Độ sạch** (%wt)	**Hiệu suất (%)**	**M_w** (10^6 Da)	**M_n** (10^5 Da)	**PDI** (M_w/M_n)	**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

Sự ổn định của các thuộc tính hóa-lý chứng tỏ việc xử lý kiềm nhẹ (0,125 M) sinh khối thu được sau lên men của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trong thời gian dài giúp tăng độ sạch của mẫu PHA nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả thu hồi và chất lượng của polymer. So sánh với các kết quả công bố của Anis và Cs (2012) trên đối tượng *Cupriavidus necator* [21] hay công bố của Yang và Cs (2011) trên đối tượng *Ralstonia eutropha* H16 [215] chúng tôi thấy rằng việc sử dụng NaOH để tách chiết và thu hồi PHA từ sinh khối chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có hiệu quả cao.

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

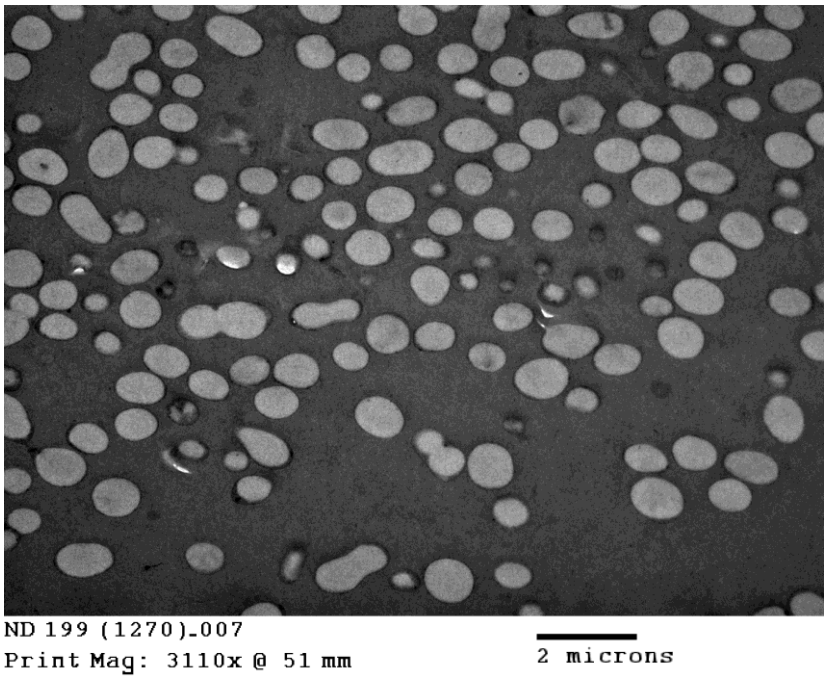
Ở thí nghiệm tiếp theo chúng tôi tiến hành xử lý sinh khối tế bào vi khuẩn (hàm lượng khác nhau) với 0,125 M NaOH ở 50 ^oC trong 5 h. Kết quả trong bảng 3.15 cho thấy, độ tinh sạch thu được dao động từ 89,3 %wt đến 90,6 %wt với mức độ thu hồi đạt xấp xỉ 97% khi hàm lượng sinh khối trong dịch xử lý từ 50 g/L đến 90 g/L. Các báo cáo của Choi và Cs (1999) [44], Anis và Cs (2012) [21] lại cho thấy khi hàm lượng sinh khối được xử lý vượt quá 30 g/L khiến cho mức độ tinh sạch giảm dần trong khi hiệu suất thu hồi tăng trên các đối tượng *E. coli* tái tổ hợp

và *Cupriavidus necator* tái tổ hợp. Độ nhớt tăng trong quá trình xử lý với NaOH gây khó khăn trong quá trình li tâm và thu hồi sản phẩm [78]. Đồng thời hàm lượng NaOH dư thừa trong mẫu xử lý cũng có thể là nguyên nhân dẫn đến sự giảm hiệu suất thu hồi sản phẩm [21]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy việc xử lý dịch huyền phù tế bào với hàm lượng sinh khối tăng dần hầu như không gây ra sự sai khác đối với độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi với các giá trị tương ứng khoảng 90 %wt và trên 96 %, theo thứ tự (bảng 3.15, hình 3.17).

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của hàm lượng sinh khối đến hiệu quả tinh sạch PHA từ sinh khối vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

CDW ban đầu (g/L)	**Độ sạch (%wt)**	**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)



Hình 3.17. Ảnh chụp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) các hạt PHA từ sinh khối Yangia sp. NĐ199 *sau khi xử lý NaOH*

Kết quả thu được là vô cùng có ý nghĩa đối với quy mô sản xuất lớn bởi việc giảm chi phí về hóa chất, thiết bị cũng như giảm thiểu lượng hóa chất thải ra môi trường. Đặc biệt, mức độ ý nghĩa của các kết quả trên càng được nâng cao bởi các thí nghiệm của chúng tôi đều được tiến hành trực tiếp trên nguồn sinh khối tế bào tươi (sinh khối chưa qua làm khô) chưa qua bất kỳ quá trình tiền xử lý nào.

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

Dựa trên các kết quả nghiên cứu ở trên, quá trình sản xuất vật liệu PHA đã được chúng tôi xây dựng và vận hành thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm theo mô hình tóm tắt ở hình 3.18. Diễn giải chi tiết quá trình như sau:

3.4.1. Nhân giống

- Giống vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 lưu trữ trong các ống đông khô hoặc trong glycerol được sử dụng cho sản xuất.

- Chủng giống được hoạt hóa trên môi trường nhân giống HM trong vòng 24 h. Lựa chọn khuẩn lạc mọc tốt, kiểm tra hình thái bằng nhuộm Gram trước khi cấy chuyển sang môi trường nhân giống cấp 1.

- Giống cấp 1 được nuôi cấy trong thời gian 13 h đến 15 h để đạt được giá trị mật độ quang tương đương 7±0,5 ở bước sóng 600 nm.

3.4.2. Lên men

- Môi trường lên men sản xuất sử dụng môi trường với thành phần như trình bày ở mục (phần Vật liệu – Phương pháp).

- Lượng giống được sử dụng: chiếm 10 % (v/v) so với thể tích lên men.

- Thể tích lên men 3 L. Tốc độ khuấy đảo ban đầu được cài đặt ở mức 100 rpm với mức sục khí là 0,5 L/L môi trường.

- Sử dụng kỹ thuật lên men bán liên tục hai gian đoạn như sau:

+ Giai đoạn tăng sinh khối tế bào: (từ 3 h đến 18 h nuôi cấy) Dung dịch dinh dưỡng đậm đặc giàu nitơ được sử dụng để bổ sung vào môi trường nuôi cấy với tốc độ ban đầu 10 ml/h và tăng dần lên các mức 20 ml/h, 30 ml/h, 40 ml/h, 50 ml/h sau mỗi 3 h nuôi cấy. Hàm lượng fructose được duy trì ở mức 2 g/L đến 3 g/L bằng cách bổ sung dung dịch fructose đậm đặc sau khi xác định được nồng độ fructose

thực tế trong môi trường mỗi 1,5 h nuôi cấy. Tốc độ khuấy đảo được tăng dần cho đến mức tối đa đạt 600 rpm với mức độ sục khí đạt 1 L/L môi trường.

+ Giai đoạn tích lũy PHA: (từ 18 h đến 33 h) Dung dịch dinh dưỡng khoáng không chứa nitơ được duy trì bổ sung với tốc độ 10 ml/phút cho đến cuối quá trình lên men. Hàm lượng fructose trong môi trường được tăng dần từ 3 g/L lên 15 g/L sau mỗi 3 h nuôi cấy. Tốc độ sục khí và khuấy đảo được duy trì ổn định ở mức 3 L/phút và tốc độ khuấy 600 rpm, theo thứ tự. Sau 33 h, hàm lượng đường trong môi trường nuôi cấy được duy trì ở mức 20 g/L cho đến khi kết thúc lên men.

3.4.3. Thu hồi sinh khối – Tách chiết PHA

Quá trình thu hồi và tinh sạch được tiến hành theo các bước sau:

- Thu hồi và làm sạch sinh khối tế bào: Dịch lên men được tiến hành lọc qua hệ thống lọc tiếp tuyến với màng lọc cỡ 0,2 µm (GE Healthcare, Mỹ) và rửa bằng nước nhằm loại bỏ các thành phần dinh dưỡng còn sót lại trong môi trường lên men.

- Sinh khối tế bào sau đó được xử lý với NaOH với nồng độ cuối cùng đạt 0,125 N và được chạy tuần hoàn nhờ hệ thống lọc tiếp tuyến trong thời gian 3 h với tốc độ tuần hoàn 100 L/h.

- Sinh khối sau xử lý NaOH được tiến hành rửa bằng nước trên hệ thống lọc tiếp tuyến nhằm loại bỏ hết các thành phần xác tế bào bị hòa tan và lượng NaOH còn tồn dư. Cô đặc dịch thu được đến thể tích cuối 2 lít và thu hồi.

3.4.4. Thu hồi PHA

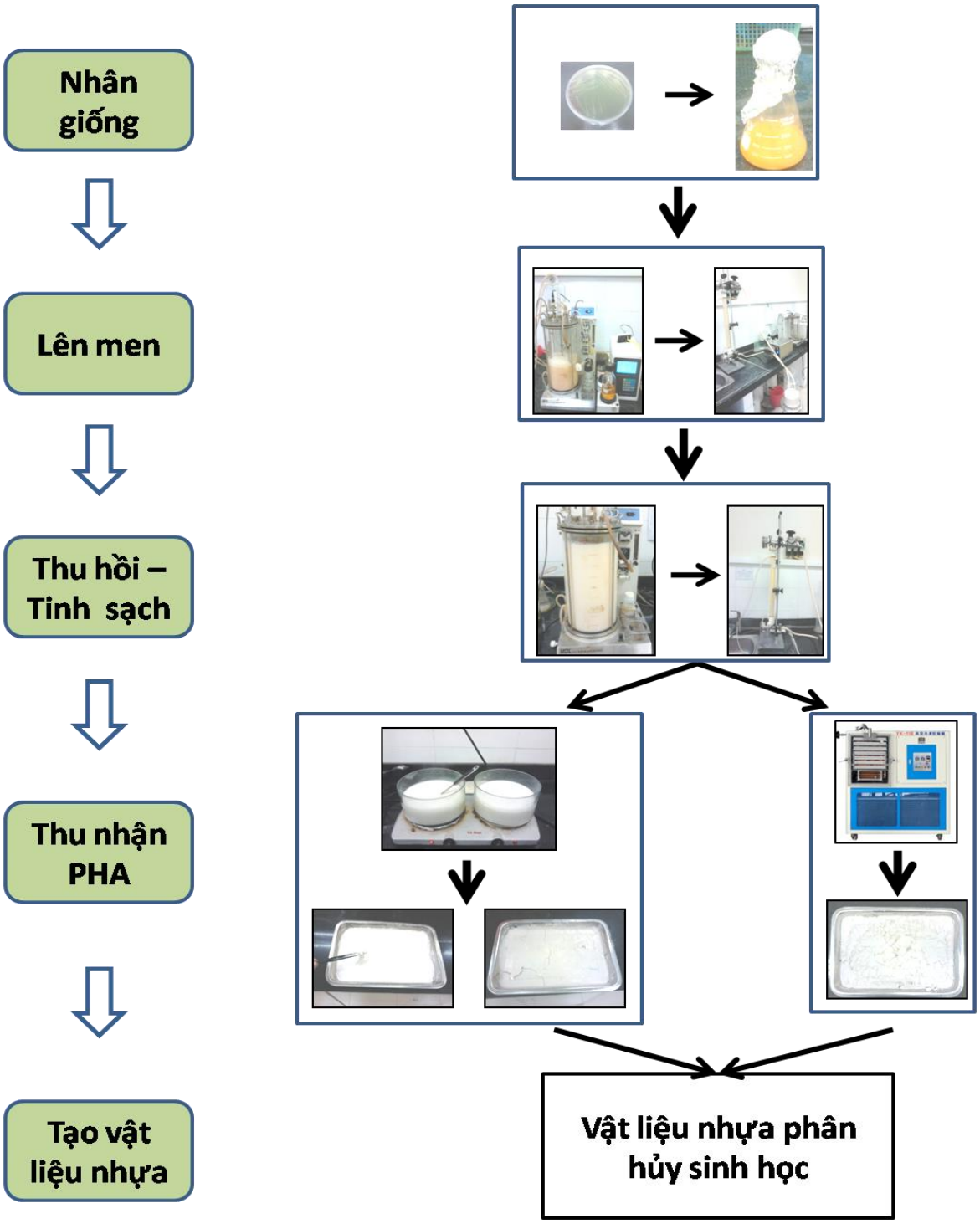
Sản phẩm PHA có trong dịch xử lý cuối được thu hồi nhờ hai phương pháp:

- Làm khô bằng nhiệt nóng: Gia nhiệt ở 80 ^{o}C cho đến khi sản phẩm khô hoàn toàn. Sản phẩm thu được có dạng bánh màu trắng trong. Khi nghiền mịn có màu trắng sáng.

- Đông khô: Tiến hành làm khô trên máy sấy thăng hoa thu được sản phẩm PHA dạng bột có màu trắng sáng (phụ lục 10).

3.4.5. Tạo vật liệu PHA

Mẫu nguyên liệu PHA được đưa qua thiết bị đùn nhiệt với nhiệt độ 180 ^{o}C để tạo hạt vật liệu có bản chất PHA. Sản phẩm thu được có màu trắng trong, cứng (phụ lục 10).

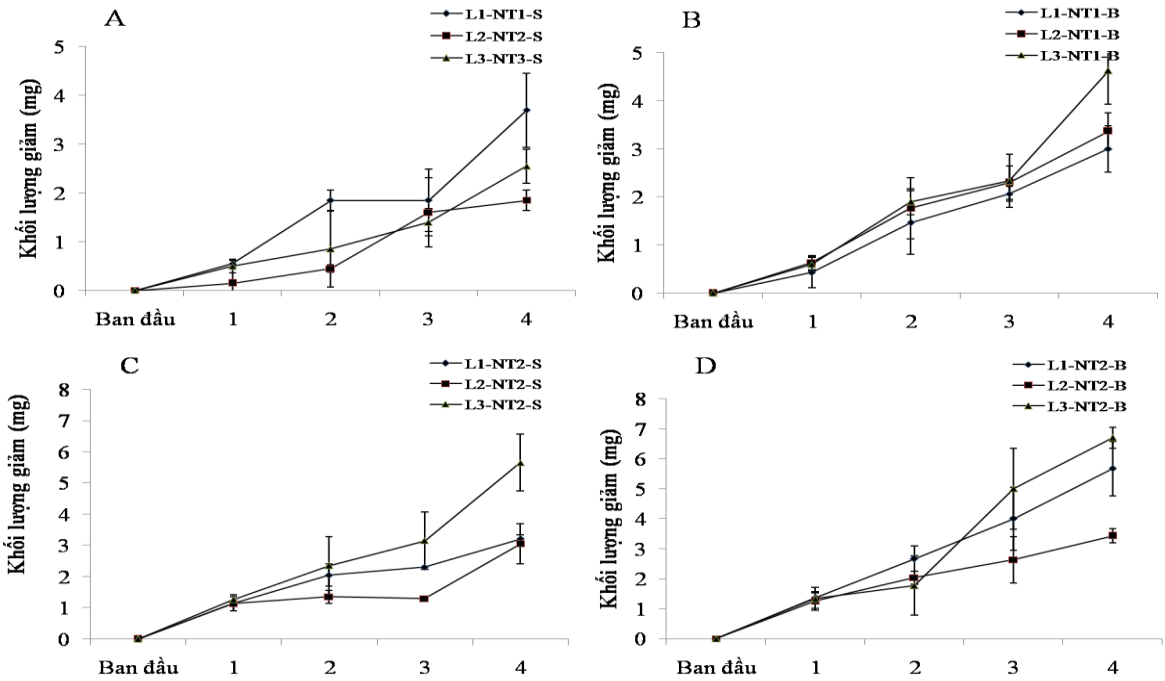


Hình 3.18. Sơ đồ quy trình sản xuất PHA quy mô phòng thí nghiệm

3.5. Đánh giá khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA từ *Yangia* sp. NĐ199 trong điều kiện chôn lấp

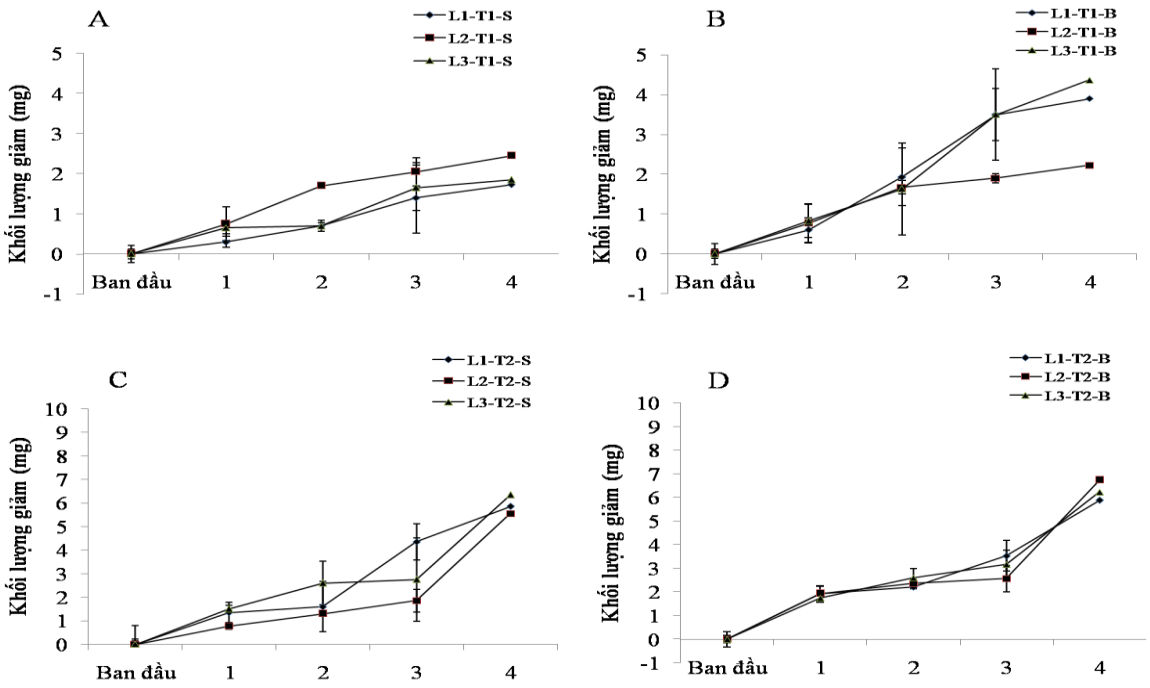
Khả năng phân hủy sinh học của vật liệu PHA thu được từ chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 trong điều kiện tự nhiên đã được chúng tôi khảo sát ở một số địa điểm thuộc đất rừng (Penang, Malaysia) (phụ lục 11) ở điều kiện nhiệt độ trung bình 30 ^{o}C với độ ẩm đất dao động ở mức 80 % trong thời gian thí nghiệm.

Như thể hiện ở hình 3.19 và 3.20, sau 4 tuần chôn ủ tất cả các mẫu màng PHA thí nghiệm đều thể hiện sự giảm khối lượng so với thời điểm ban đầu. Sự giảm khối lượng có xu hướng tăng đều trong thời điểm 3 tuần thu mẫu đầu tiên và đa số các mẫu thể hiện mức độ giảm khối lượng mạnh mẽ ở tuần thứ tư của giai đoạn thí nghiệm. Kết quả thu được cũng cho thấy rằng ở cùng điều kiện sinh thái (cùng vị trí thí nghiệm) các mẫu được chôn ủ (ở cả hai loại mẫu NT và T) đều có mức độ giảm khối lượng tốt hơn so với các mẫu đặt trên mặt đất.



Hình 3.19. Độ giảm khối lượng của các mẫu PHA thu hồi nhờ $CHCl_3$ 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 3.20. 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

Kết quả tương tự cũng được Sridewi và Cs (2006) thông báo khi khảo sát khả năng phân hủy sinh học của các mẫu PHA trong điều kiện rừng ngập mặn nhiệt đới [178]. Khả năng tiếp xúc với vi sinh vật cao hơn khi được chôn lấp so với các mẫu màng đặt trên bề mặt đất là một lí do. Bên cạnh đó, vi sinh vật ở các lớp đất với độ sâu từ 2 cm đến 10 cm thường có mật độ cao và đa dạng hơn so với trên bề mặt (do chịu ảnh hưởng của các tia tử ngoại và sự thay đổi một cách liên tục của khí hậu) cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình phân hủy sinh học.

Chúng tôi thấy rằng không có sự sai khác về tốc độ phân hủy sinh học khi độ dầy của màng PHA thay đổi. Tuy nhiên tốc 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 %.

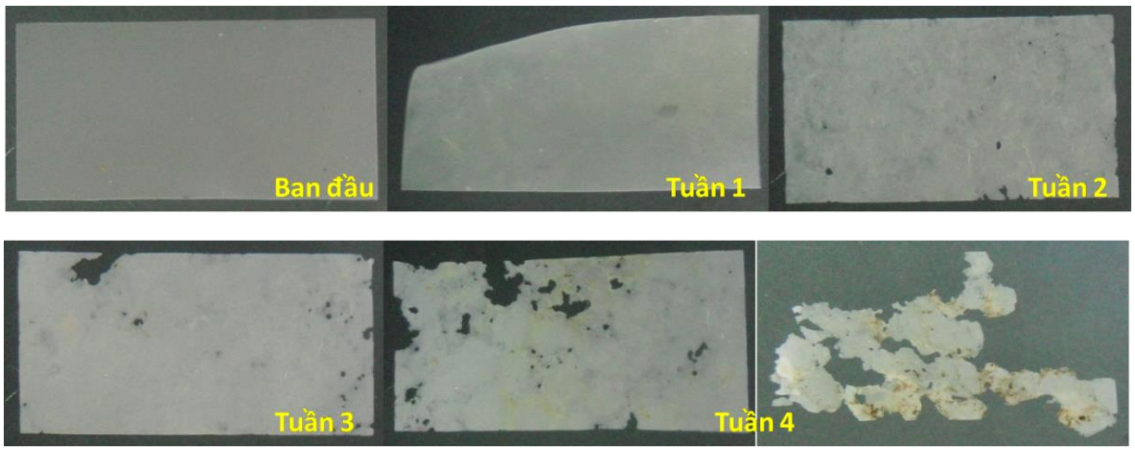
Bảng 3.16. Sự giảm M_w sau 4 tuần thí nghiệm của các mẫu polymer

Kí hiệu mẫu	**M_w** (10^6 Da)	**M_n** (10^5 Da)	**PDI** (M_w/M_n)	**Kí hiệu mẫu**	**M_w** (10^6 Da)	**M_n** (10^5 Da)	**PDI** (M_w/M_n)
Ban đầu	1,36	3,75	3,47	Ban đầu	0,56	2,88	1,96
L1-NT1-S	0,86	3,73	2,29	L1-T1-S	0,49	2,73	1,81
L1-NT1-B	0,81	3,68	2,2	L1-T1-B	0,47	2,71	1,74
L1-NT1-S	0,74	3,54	2,1	L1-T2-S	0,46	2,81	1,65
L1-NT1-B	0,72	3,48	2,08	L1-T2-B	0,41	2,42	1,7
L2-NT1-S	0,83	3,52	2,36	L2-T1-S	0,48	2,87	1,67
L2-NT1-B	0,81	3,45	2,35	L2-T1-B	0,45	2,75	1,64
L2-NT2-S	0,85	3,62	2,35	L2-T2-S	0,46	2,54	1,81
L2-NT2-B	0,76	3,56	2,13	L2-T2-B	0,42	2,48	1,69
L3-NT1-S	0,85	3,5	2,45	L3-T1-S	0,44	2,62	1,68
L3-NT1-B	0,82	3,72	2,2	L3-T1-B	0,46	2,75	1,69
L3-NT2-S	0,71	3,33	2,13	L3-T2-S	0,42	2,58	1,61
L3-NT2-B	0,82	3,62	2,27	L3-T2-B	0,42	2,6	1,62

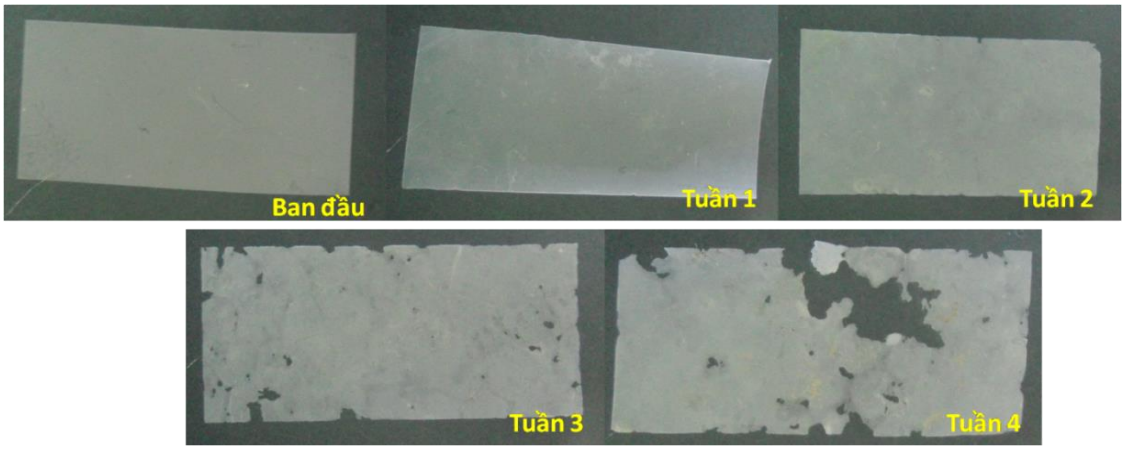
Cấu trúc hóa học của các sợi polymer có trong mẫu có thể là yếu tố cơ bản ảnh hưởng khả năng tác động của vi sinh vật đến PHA. Trong quá trình tách chiết và thu hồi, NaOH có lẽ đã tác động đến các vùng vô định hình của phân tử PHA khiến cho số lượng các vùng này giảm đi đáng kể trong sản phẩm thu được. Chính điều này đã dẫn đến sự suy giảm giá trị M_w như đã trình bày ở trên. Trong khi bản chất sợi polymer gần như được bảo toàn khi sử dụng chloroform để tách chiết và thu hồi. Vùng vô định hình cũng là vùng dễ bị tác động nhất bởi các enzyme của vi sinh vật trong điều kiện tự nhiên.

Kết quả phân tích sắc kí gel thẩm thấu (GPC) cũng củng cố quan điểm này của chúng tôi. Như kết quả được trình bày trong bảng 3.16, 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

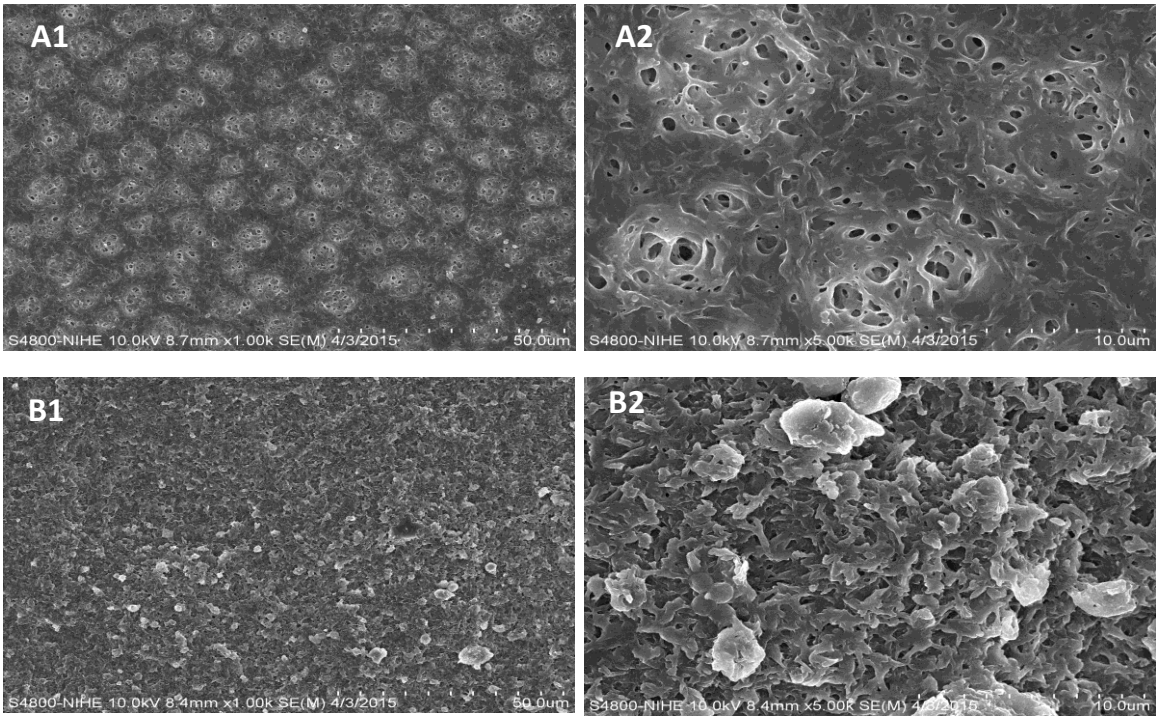
hầu như không có sự sai khác đáng kể. Ngoài ra, khi phân tích mẫu màng phim PHA trên kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy có sự khác biệt lớn về màu sắc cũng như cấu trúc bề mặt giữa các mẫu thí nghiệm so với mẫu đối chứng. Các mẫu thí nghiệm chôn ủ sau một thời gian sẽ chuyển sang màu vàng xám, cùng với đó là sự xuất hiện của các điểm thủng lỗ chỗ trên bề mặt màng (hình 3.21 và 3.22). 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 (mẫu đối chứng) 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 3.23 và 3.24).



Hình 3.21. Diễn biến quá trình phân hủy sinh học của mẫu L3-NT1-B (mẫu PHA thu hồi nhờ chloroform khi chôn lấp ở vị trí thí nghiệm số 3)

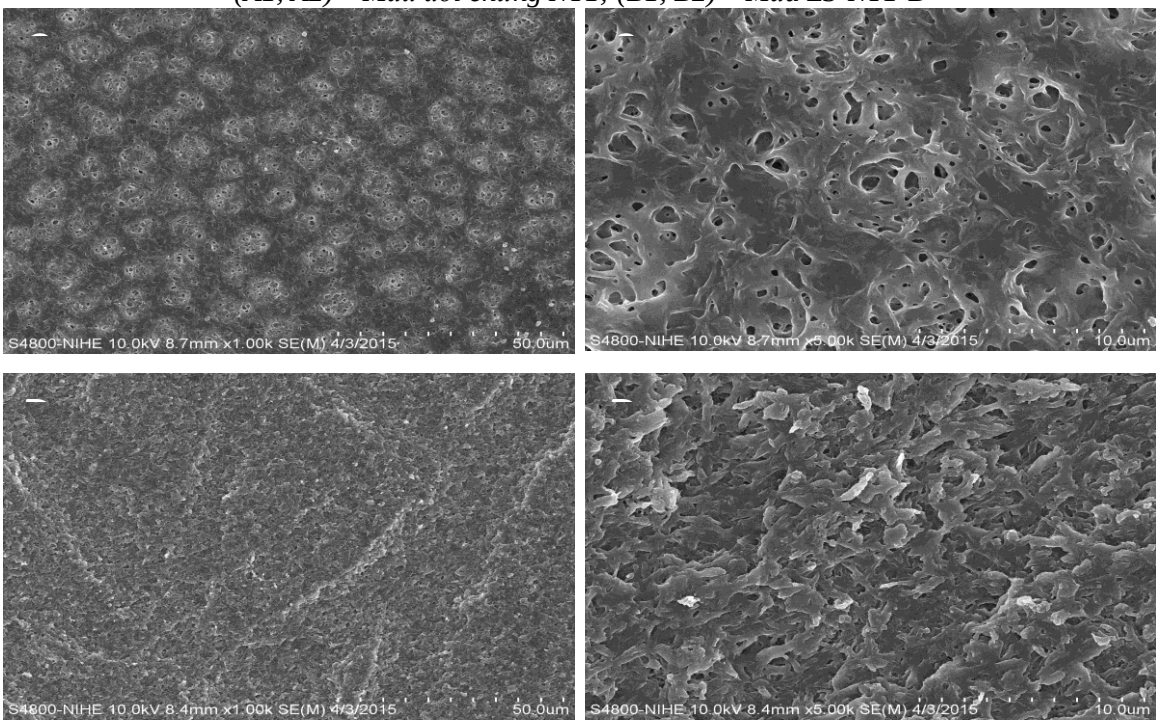


Hình 3.22. Diễn biến quá trình phân hủy sinh học của mẫu L3-T1-B (mẫu PHA thu hồi nhờ NaOH khi chôn lấp ở vị trí thí nghiệm số 3)



Hình 3.23. Cấu trúc bề mặt màng PHA thu hồi nhờ chloroform dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)

(A1, A2) – Mẫu đối chứng NT1; (B1, B2) – Mẫu L3-NT1-B



Hình 3.24. Cấu trúc bề mặt màng PHA thu hồi nhờ NaOH 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.

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 14 % 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 lai thì vẫn còn những vấn đề cần được giải quyết sau đây:

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

2.2. 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.

DANH MỤC 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tài liệu tiếng Việt

1. Phạm Thanh Hà, Bùi Thị Thanh Mai, Trần Đình Mấn (2009), Nghiên cứu chọn nguồn cơ chất rẻ tiền cho sinh tổng hợp poly–β–hydroxybutyrate từ chủng đột biến *Alcaligenes latus* VN1-20, *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2009*, Trang 572-576.
2. Hồ Sơn Lâm, Nguyễn Thị Thu Thảo và các cộng sự (2005), Nghiên cứu tổng hợp poly-(sucinic anhydrit) và poly-(maleic anhydrit) trên xúc tác axetat kim loại, *Tuyển tập các công trình Hội nghị Khoa học và Công nghệ Hoá hữu cơ toàn quốc lần 3, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội*, Trang 491-496.
3. Hồ Sơn Lâm, Nguyễn Thị Thu Thảo và các cộng sự (2005), Nghiên cứu tổng hợp polymer phân hủy sinh học VINAPOL® ứng dụng trong nông nghiệp, *Thông tin Khoa học & Công nghệ (CESTI) – Sở KH&CN TP.HCM*, 1&2, Trang 42-44.
4. Bùi Thị Thanh Mai, Trần Đình Mấn, Nguyễn Quốc Việt, Phạm Thanh Hà (2010), Phân loại chủng vi khuẩn V23-X1.1 có khả năng sinh tổng hợp poly- β-hydroxybutyrate. *Tạp chí công nghệ sinh học*, 8(1), Trang 117-123.
5. Châu Văn Minh và các cộng sự (1997), Nghiên cứu sử dụng Chitosan trong nông nghiệp và bảo quản thực phẩm, *Tạp chí Hóa học*, 35 (3), Trang 75-78.
6. Nguyễn Thị Thu Thảo, Hồ sơn Lâm và các cộng sự (2007), Tổng hợp màng polyme composite trên cơ sở polyvinylalcohol và sợi lignocellulosic, *Tuyển tập các công trình Hội nghị KH&CN Hóa hữu cơ toàn quốc lần thứ 4, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội*, Trang 840-845.
7. Nguyễn Thị Thu Thảo, Hồ Sơn Lâm, Võ Đỗ Minh Hoàng, Huỳnh Thành Công, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Ngọc Hóa (2009), Nghiên cứu tổng hợp và khảo sát tính chất của màng polymer- composite có khả năng phân hủy sinh học từ chất nền là polyvinyl alcohol, *Hội nghị Khoa học và Công nghệ lần 11, Đại học Bách Khoa TP.HCM*, Trang 166-169.

8. Nguyễn Thị Thu Thảo, Hồ Sơn Long, Lê Thị Sao Mai, Huỳnh Thành Công, Hồ Sơn Lâm (2010), Tổng hợp PLA bằng phương pháp đa trùng ngưng liên tục và gián đoan axit lactic với xúc tác SnCl2, *Hội nghị khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, ISBN: 978-604-913-011-3, trang 173-178.
9. Trần Linh Thước (2010), Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, *Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam*, 19-2010/CXB/369-2244/GD, trang 65-67; 71-98.
10. Mai Văn Tiến, Phạm Thế Trinh, Nguyễn Hường Hào (2010), Polyme phân hủy sinh học trên cơ sở polyvinylancol với tinh bột sắn, *Tạp chí Hóa học*, 48 (4A), Trang 152-156.
11. Mai Văn Tiến (2010), *Nghiên cứu tổng hợp polime phân hủy sinh học trên cơ sở polylactic axit*, Luận án TS. Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên (Đại học Quốc Gia Hà Nội), mã lưu kho thư viện Quốc Gia: LA10.0102.3.
12. Phạm Thế Trinh (2006), Màng tổ hợp polyme tự hủy trên cơ sở nhựa LDPE với tinh bột biến tính, *Tạp chí Hóa học và Ứng dụng*, 2(50), Trang 29-31.

II. Tài liệu tiếng Anh

13. H. Akiyama, H. Okuhata, T. Onizuka, S. Kanai, M. Hirano, S. Tanaka, K. Sasaki, H, Miyasaka (2011), Antibiotics-free stable polyhydroxyalkanoates (PHA) production from carbon dioxide by recombinant cyanobacteria, *Bioresource Technology*, 102, pp 11039-11042.
14. A. D. Allen, W. A. Anderson, F. O. Ayorinde, B. E. Eribo (2010), Biosynthesis and characterization of copolymer poly (3HB-co-3HV) from saponified *Jatropha curcas* oil by *Pseudomonas oleovorans*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, pp 849-856.
15. R. Amache, A. Sukan, M. Safari, I. Roy, T. Keshavarz (2013), Advances in PHAs production, *Chemical Engineering Transactions*, 32, 931-936.
16. A. A. Amirul, A. R. M. Yahya, K. Sudesh, M. N. M. Azizan, M. I. A. Majid (2009), Isolation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) producer from Malaysian environment using γ-butyrolactone as carbon source, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, pp 1199-1206.

17. A.A. Amirul, A.R.M. Yahya, K. Sudesh, M.N.M. Azizan, M.I.A. Majid (2008), Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia, *Bioresource Technology*, 99, pp 4903-4909.

18. A. J. Anderson, E. A. Dawes (1990), Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiological reviews*, 54(4), pp 450-472.

19. A. J. Anderson, D. R. Williams, B. Taidi, E. A. Dawes, D. F. Ewing (1992), Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factor influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extoquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 103, pp 93-102.

20. A. J. Anderson, G. W. Haywood, E. A. Dawes (1990), Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*, 12, pp 102-105.

21. S. N. S. Anis, M. I. Nurhezreen, K. Sudesh, A. A. Amirul (2012), Enhanced recovery and purification of P(3HB-*co*-3HHx) from recombinant *Cupriavidus necator* using alkaline digestion method, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, pp 524-535.

22. E. B. Arikan, H. D. Ozsoy (2015), A review: Investigation of bioplastics, *Journal of Civil Engineering and Architechture*, 9, pp 188-192.

23. A. Arun, R. Arthi, V. Shanmugabalaji, M. Eyini (2009), Microbial production of poly-β-hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments, *Bioresource Technology*, 100, pp 2320-2323.

24. A. Atlić, M. Koller, D. Scherzer, C. Kutschera, E. Grillo-Fernandes, P. Horvat, E. Chiellini, G. Braunegg (2011), Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, pp 295–304.

25. T. M. F. Azira, A. A. Nursolehah, Y. Norhayati, M. I. A. Majid, A. A. Amirul (2011), Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through two-step cultivation process, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, pp 2287-2295.

26. M. Aznury, A. Trianto, A. Pancoro, T. Setiadi (2012), Effect of feeding time of volatile fatty acids from palm oil mill effluent on production of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha* JMP 134 in batch fermentation, *The 5th AUN/SEED Net Regional Conference on Global Environment*, pp 701-720.

27. D. K. A. Barnes, F. Galgani, R. C. Thompson, M. Barlaz (2009), Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments, *Philosophical transactions of the royal society B*, 364, pp 1985-1998.

28. M. M. Berekaa, A. M. Al Thawadi (2012), Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer by *Bacillus megaterium* SW1-2: Application of Box-Behnken design for optimization of process parameters, *African Journal of Microbiology Research*, 6(4), pp 838-845.

29. M. Bernard (2014), Industrial potential of polyhydroxyalkanoate bioplastics: A brief review, *University of Saskatchewan Undergraduate Research Journal*, 1(1), pp 1-14.

30. K. Bhubalan, W. H. Lee, C. Y. Loo, T. Yamamoto, T. Tsuge, Y. Doi, K. Sudesh (2008), Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors, *Polymer Degradation and Stability*, 93, pp 17-23.

31. A. K. Bhuwal, G. Singh, N. K. Aggarwal, V. Goyal, A. Vadav (2013), Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes, *International Journal of Biomaterials*, 23, 10 pages, http://dx.doi.org/10.1155/2013/752821.

32. G. Braunegg, B. Sonnleitner, R. M. Lafferty (1978), A rapid gas chromatographic method for determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(1), pp 29-37.

33. D. Briassoulis C. Dejean (2010), Critical review of norms and standards for biodegradable agricultural plastics part I. Biodegradation in soil, *Journal of Polymer and the Environment*, 18, pp 384-400.

34. D.Z. Bucci, L.B.B. Tavares, I. Sell (2005), PHB packaging for storage of food products, *Polymer Testing*, 24, pp 564-571.

35. D. Byrom (1987), Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics, *Trend in Biotechnology*, 5(9), pp 246-250.

36. J.M. Cervantes-Uc, J. Catzin, I. Vargas, W. Herrera-Kao, F. Moguel, E. Ramirez, S. Rinc on-Arriaga, G. Lizama-Uc (2014), Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds, *Journal of Applied Microbiology*, 117(4), pp 1056-1065.

37. H. L. Chai, R. Ahmad, A. R. M. Yahya, M. I. A. Majid, A. A. Amirul (2009), Microbial synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through a two step cultivation process, *African Journal of Biotechnology*, 8(17), pp 4189-4196.

38. S. Chanprateep (2010), Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), pp 621-632.

39. G. Q. Chen, K. H. König, R. M. Lafferty (1991), Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*, *FEMS Microbiology Letters*, 84, 173-176.

40. C. W. Chen, T. M. Don, H. F. Yen (2006), Enzymatic extruded starch as a carbon source for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*, *Process Biochemistry*, 41, pp 2289-2296.

41. G. Q. Chen (2010). Plastics completely synthesized by bacteria: Polyhydroxyalkanoates. In plastics from bacteria: Natural functions and applications; Chen, G.-Q., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 14, 17-37.

42. Q. Chen, Q. Wang, G. Wei, Q. Liang, Q. Qi (2011). Production in *Escherichia coli* of poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4886-4893.

43. J. I. Choi, S. Y. Lee, K. Han (1998), Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), pp 4897-4903.

44. J. I. Choi, S. Y. Lee (1999), Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals, *Biotechnology and Bioengineering*, 62(5), pp 546-553.

45. J. I. Choi, S. Y. Lee (1999), High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4363-4368.

46. A. L. Chung, H. L. Jin, L. J. Huang, H. M. Ye, J. C. Chen, Q. Wu, G. Q. Chen (2011), Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxydodecanoate) by β-Oxidation inhibited mutant of *Pseudomonas entomophila* L48, *Biomacromolecules*, 12, pp 3559-3566.

47. S. Ciesielski, A. Cydzik-Kwiatkowska, T. Pokoj, E. Klimiuk (2006), Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge, *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), pp 190-199.

48. S. Ciesielski, T. Pokoj, J. Mozejko, E. Klimiuk (2013), Molecular identification of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from enriched microbial community, *Polish journal of Miceobiology*, 62(1), pp 45-50.

49. S. Ciesielski, D. Górniak, J. Możejko, A. Świątecki, J. Grzesiak, M. Zdanowski (2014), The diversity of bacteria isolated from Antarctic freshwater reservoirs possessing the ability to produce polyhydroxyalkanoates. *Current Microbiology*, 69(5), pp 594-603.

50. X. Dai, B. J. Wang, Q. X. Yang, N. Z. Jiao, S. J. Liu (2006), *Yangia pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Roseobacter* clade from coastal sediment of the East China Sea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, pp 529–533.

51. O. Danis, A. Ogan, P. Tatlican, A. Attar, E. Cakmakci, B. Mertoglu, M. Birbir (2015), Preparation of poly(3‐hydroxybutyrate ‐co‐hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery, *Extremophiles*, 19(2), pp 515-524.

52. D. Dennis, M. McCoy, A. Stangl, H.E. Valentin, Z.Wu (1998), Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*, *Journal of Biotechnology*, 64, pp 177-186.

53. S. E. Desouky, H. H. El-Shiekh, M. A. Elabd, A. M. Shehab (2014), Screening, Optimization and Extraction of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Bacillus thuringienesis*, *Journal of Advances in Biology and Biotechnology*, 1(1), 40-54.

54. J. H. Dhangdhariya, S. Dubey, H. B. Trivedi, I. Pancha, J. K. Bhatt, B. P. Dave, S. Mishra (2015), Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's dry sea mix as a novel growth medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, pp 254-261.

55. M. S. Divyashree, T. R. Shamala (2010), Extractability of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Bacillus flexus* cultivated in organic and inorganic nutrient media, *Indian Journal of Microbiology*, 50(1), pp 63-69.

56. Y. Doi, A. Segawa, M. Kunioka (1990), Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 12, pp 106-111.

57. Y. Doi (1995), Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates, *Macromolecular Symposia*, 98(1), 585-599.

58. T. M. Don, C. W. Chen, T. H. Chan (2006), Preparation and characterization of poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(12), pp 1425-1438.

59. G. Du, J. Chen, J. Yu, S. Lun (2001), Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system, *Journal of Biotechnology*, 88, pp 59–65.

60. P. E. Duckett, V. Repaci (2015), Marine plastic pollution : using community science to address a global problem, *Marine and Freshwater Research*, 66, 665-673.

61. R. Durner, M. Zinn, B. Withol, T. Egli (2001), Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources, *Biotechnology and Bioengineering*, 72(3), pp 278-288.

62. E. C. Emeruwa, R. Z. Hawirko (1973), Poly-β-hydroxybutyrate metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum*, *Journal of Bacteriology*, 116(2), pp 989-993.

63. M. Flieger, M. Kantorova, A. Prell, T. Řexanka, J. Votruba (2003), *Folia Microbiologica*, 48(1), pp 27-44.

64. T. Fukui and Y. Doi (1997), Cloning and analysis of P(3HB-co-3HHx) biosynthesis gens of *Aeromonas caviae*, *Journal of bacteriology*, 179(15), pp 4821-4830.

65. T. Fukui, H. Abe, Y. Doi (2002), Engineering of *Ralstonia eutropha* for Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from Fructose and Solid-State Properties of the Copolymer, *Biomacromolecules*, 3, pp 618-624.

66. T. Fukui, M. Suzuki, T. Tsuge, S. Nakamura (2009), Microbial synthesis of poly((R)-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from unrelated carbon sources by engineered *Cupriavidus necator*, *Biomacromolecules*, 10, pp 700-706.

67. I. Gasser, H. Müller, G. Berg (2009), Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms on and in plants, *FEMS Microbiology Ecology*, 70, pp 142-150.

68. K. F. Genser, G. Renner, H. Schwab (1998), Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis genes from *Alcaligenes latus* DSM1124, *Journal of Biotechnology*, 64, pp 123-135.

69. T. U. Gerngross, D. P. Martin (1995), Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: Formation of macroscopic granules *invitro*, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 92, pp 6279-6283.

70. Y. S. Goh, I. K. P. Tan (2012), Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island, *Microbiological Research*, 167, pp 211-219.

71. Y. González-García, J. Nungaray, J. Córdova, O. González-Reynoso, M. Koller, A. Atlic, G. Braunegg (2008), Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, pp 629-633.

72. E. Grothe, M. M. Young, Y. Chisti (1999), Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, pp 132-141.

73. E. Grothe, Y. Chisti (2000), Poly(β-hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: Behavior of fed-batch cultures, *Bioprocess Engineering*, 22, pp 441-449.

74. R. U. Halden (2010), Plastics and Health Ricks, *Annual Review of Public Health*, 31, pp 179-194.

75. J. Han, J. Hou, H. L. Liu, S. F. Cai, B. Feng, J. Zhou, H. Xiang (2010), Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), pp 7811-7819.

76. X. Hang, G. Zhang, G. Wang, X. Zhao, G. Q. Chen (2002), PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Burkholderia caryophylli* and their functional expression in recombinant *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Letters*, 210(1), pp 49–54.

77. S. T. L. Harrison (1991), Bacterial cells disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products, *Biotechnology Advances*. 9, pp 217-240.

78. G. W. Haywood, A. J. Anderson, D. W. Williams, E. A. Dawes (1991), Accumulation of a poly (hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126, *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, pp 83-88.

79. T. Y. Huang, K. J. Duan, S. Y. Huang, C. W. Chen (2006), Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, pp 701-706.

80. Y. T. Huang, P. L. Chen, G. U. Semblante, S. J. You (2012), Detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria from domestic wastewater treatment plant using highly sensitive PCR primers, *Journal of Microbiology anf Biotechnology*, 22(8), pp 1141-1147.

81. K. H. Huong, S. Kannusamy, S. Y. H. Lim, A. A. Amirul (2015), Biosynthetic enhancement of single-stage poly(3-hydroxybutyrate -co-4-hydroxybutyrate) production by manipulating the substrate mixtures, *Journal of Indistrial Microbiology and Biotechnology*, 42(9), 1291-1297.

82. M. H. A. Ibrahim, A. Steinbüchel (2010), High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of a poly(3-hydroxybutyrate)-cccumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), pp 7890-7895.

83. M. Ilhama, S. Nakanomori, T. Kihara, A. Hokamura, H. Matsusaki, T. Tsuge, K. Mizuno (2014), Characterization of polyhydroxyalkanoate synthases from *Halomonas* sp. O-1 and *Halomonas elongata* DSM2581: Site-directed mutagenesis and recombinant expression, *Polymer Degradation and Stability*, 109, pp 416-423.

84. N. Israni, S. Shivakumar (2015), Evaluation of upstream process parameters influencing the growth associated PHA accumulation in *Bacillus* sp. Ti3, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 74, pp 290-295.

85. N. Jabeen, I. Majid, G. A. Nayik (2015), Bioplastics and food packaging: A review, *Cogent Food and Agriculture (Food science and technology: Review article)*, 1, pp 1117749.

86. N. Jacquel, C. W. Lo, Y. H. Wei, H. S. Wu, S. S. Wang (2008), Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates), *Biochemical Engineering Journal*, 39, pp 15–27.

87. M. H. Jau, S. P. Yew, P. S.Y. Toh, A. S.C. Chong, W. L. Chu, S. M. Phang, N. Najimudin, K. Sudesh (2005), Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 36, pp 144–151.

88. X. Jiang, J. A. Ramsay, B. A. Ramsay (2006), Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440, *Journal of Microbiological Methods*, 67, pp 212-219.

89. G. Jiang, D. J. Hill, M. Kowalczuk, B. Johnston, G. Adamus, V. Irorere, I. Radecka (2016), Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery, *International Journal of Molecular Sciences*, 17, pp 1157, doi:10.3390/ijms17071157.

90. P. Kahar, T. Tsugea, K. Taguchi, Y. Doi (2004), High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain, *Polymer Degradation and Stability*, 83, pp 79-86.

91. D. Kalaiyezhini, K. B. Ramachandran (2015), Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from glycerol by *Paracoccus denitrificans* in a batch bioreactor: Effect of process variables, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(1), pp 69-83.

92. Y. Kawata, S. Aiba (2010), Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, pp 175-177.

93. S. Khanna, A. K. Srivastava (2005), Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochemistry*, 40, pp 607-619.

94. S. Khanna, A. K. Srivastava (2007), Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding, *Journal of Indistrial Microbiology and Biotechnology*, 34, pp 457-461.

95. B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, S. I. Woo (1994), Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 892-898.

96. B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, S. I. Woo (1994), Production of poly(3-hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer, *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), pp 556-561.

97. G. J. Kim, I. Y. Lee, S. C. Yoon, Y. C. Shin, and Y. H. Park (1997), Enhanced yield and a high production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in a two-step fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* by combined use of glucose and octanoate, *Enzyme and Microbial Technology*, 20, pp 500-505.

98. J. S. Kim, B. H. Lee, B. S. Kim (2005), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*, *Biochemical Engineering Journal*, 23, pp 169-174.

99. S. Klinke, G. de Roo, B. Withholt, B. Kessler (2000), Role of phaD in accumulation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), pp 3705–3710.

100. M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, G. Braunegg (2013), Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers and plastics from renewable resources, *Materials and Technology*, 46(1), pp 23-30.

101. M. Koller, A. Salerno, G. Braunegg (2014), Polyhydroxyalkanoates: Basics, production and applications of microbial biopolyesters, *Bio-Based Plastics: Materials and Applications*, First Edition. Edited by Stephan Kabasci. © 2014 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2014 by John Wiley & Sons, Ltd.

102. L. A. Kominek, H. O. Halvorson (1965), Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 90(5), 1251-1259.

103. N. Korotkova, M. E. Lidstrom (2001), Connection between poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis and growth on C1 and C2 compounds in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, *Journal of Bacteriology*, 183(3), pp 1038-1046.

104. S.O. Kulkarni, P.P. Kanekar, S.S. Nilegaonkar, S.S. Sarnaik, J.P. Jog (2010), Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India, *Bioresource Technology*, 101, 9765-9771.

105. S.O. Kulkarni, P.P. Kanekar, J.P. Jog, S.S. Sarnaik, S.S. Nilegaonkar (2015), Production of copolymer, poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, pp 784–789.

106. P. K. A. Kumar, T. R. Shamala, L. Kshama, M. H. Prakash, G. J. Joshi, A. Chandrashekar, K. S. L. Kumari, M. S. Divyashree (2007), Bacterial synthesis of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using carbohydrate-rich mahua (Madhuca sp.) flowers, *Journal of Applied Microbiology*, 103, pp 204-209.

107. S. S. Kung, Y. C. Chuang, C. H. Chen, C. C. Chen (2007), Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach, *Letters in Applied Microbiology*, 44, pp 364-371.

108. R. G. Lageveen, G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, B. Witholt (1988), Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates, *Applied and Environmental Microbiolog*, 54(12), 2924-2932.

109. S. Langenbach, B. H. A. Rehm, A. Steinbüchel (1997), Functional expression of the PHA synthase gene *pha*C1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis, *FEMS Microbiology Letters*, 150, pp 303-309.

110. N. S. Lau, J. Y. Chee, T. Tsuge, K. Sudesh (2010), Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM JCM15050), *Bioresource Technology*, 101, pp 7916-7923.

111. N. S. Lau, K. Sudesh (2012), Revelation of the ability of *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer, *AMB Express*, 2: 41, doi: 10.1186/2191-0855-2-41.

112. S. Y. Lee (1996), Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49:1-14.

113. S. Y. Lee (1996), Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, *Trend in Biotechnology*, 14(11), pp 431-438.

114. S. Y. Lee, J. I. Choi, K. Han, J. Y. Song (1999), Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), pp 2762-2764.

115. W. H. Lee, C. Y. Loo, C. T. Nomura, K. Sudesh (2008), Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors, *Bioresource Technology*, 99, pp 6844-6851.

116. S. Le Meur, M. ZinnT. Egli, L. Thöny-Meyer, Q. Ren (2012), Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440

117. M. Lemoigne (1926), Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide *b-oxybutyrique*, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 8, pp 770-782.

118. W. C. Li, H. F. Ste, L. Fok (2016), Plastic waste in the marine environment : A review of resources, occurrence and effects, *Science of the Total Environment*, 566-567, pp 333-349.

119. Z. J. Li, Z. Y. Shi, J. Jian, Y. Y. Guo, Q. Wu, G. Q. Chen (2010), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*, *Metabolic Engineering*, 12, pp 352-359.

120. F. Liu, W. Li, D. Ridgway, T. Gu (1998), Production of poly-β-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters*, 20(4), pp 345-348.

121. Q. Liu, G. Luo, X. R. Zhou, G. Q. Chen (2011), Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by b-oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*, *Metabolic Engineering*, 13, pp 11-17.

122. C. Y. Loo, W. H. Lee, T. Tsuge, Y. Doi, K. Sudesh (2005), Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant, *Biotechnology Letters*, 27, pp 1405-1410.

123. C. Y. Loo, K. Sudesh (2007). Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties, *Malaysian Polymer Journal (MPJ)*, 2(2), p 31-57.

124. N. I. López, M. E. Floccari, A. Steinbüchel, A. F. García, B. S. Méndez (1995), Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters, *FEMS Microbiology Ecology*, 16, pp 95-102.

125. N. I. López, J. A. Ruiz and B. S. Méndez (1998), Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, pp 681-684.

126. A. López-Cortés, A. Lanz-Landázuri, J. Q. García-Maldonado (2008), Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat, *Microbial Ecology*, 56, pp 112-120.

127. A. López-Cortés, O. Rodríguez-Fernández, H. Latisnere-Barragán, H. Mejía-Ruíz, G. González-Gutiérrez, C. Lomelí- Orte (2010), Characterization of polyhydroxyalkanoate and the phaC gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 109-118.

128. J. Lu, R. C. Tappel, C. T. Nomura (2009), Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates), *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 49(3), pp 226–248.

129. L. L. Madison, G. W. Huisman (1999), Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), pp 21-53.

130. D. P. Martin, S. F. Williams (2003), Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial, *Biochemical Engineering Journal*, 16, pp 97-105.

131. D. C. Meng, Y. Wang, L. P. Wu, R. Shen, J. C. Chen, Q. Wu, G. Q. Chen (2015), Production of poly(3-hydroxypropionate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from glucose by engineering *Escherichia coli*, *Metabolic Engineering*, 29, pp 189-195.

132. G. L. Miller (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3), pp 426-428.

133. H. Mitomo, W. C. Hsieh, K. Nishiwaki, K. Kasuya, Y. Doi (2001), Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Comamonas acidovorans*, *Polymer*, 42, pp 3455-3461.

134. M. Mohammadi, M. A. Hassan, Y. Shirai, H. C. Man, H. Ariffin, L. N. Yee, T. Mumtaz, M. L. Chong, L. Y. Phang (2012), Separation and purification of polyhydroxyalkanoates from newly isolated *Comamonas* sp. EB172 by simple digestion with sodium hydroxide, *Separation Science and Technology*. 47, pp 534-541.

135. D. Moorkoth, K. M. Nampoothiri (2016), Production and characterization of polyhydroxy butyrate-co-valerate (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate, *Bioresource Technology*, 201, pp 253-260.

136. H. Motamedi, M. R. Ardakani, N. Mayeli (2015), Isolation and screening of native polyhydroxyalkanoate producing bacteria from oil contaminated soils of Abadan refinery, *Biological Journal of Microorganism*, 3(12), pp 93-104.

137. K. S. Ng, Y. M. Wong, T. Tsuge, K. Sudesh (2011), Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymers using jatropha oil as the main carbon source, *Process Biochemistry*, 46, pp 1572–1578.

138. E. J. North, R. U. Halden (2013), Plastics and environmental health: the road ahead, *Reviews on Environmental Health*, 28(1), pp 1-8.

139. K. Numata, Y. Doi (2012), Biosynthesis of polyhydroxyalkanaotes by a novel facultatively anaerobic *Vibrio* sp. under marine conditions, *Marine Biotechnology*, 14, pp 323-331.

140. I. Orita, K. Nishikawa, S. Nakamura, T. Fukui (2014), Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), pp 3715-3725.

141. W. J. Page, O. Knosp (1989), Hyperproduction of poly-3-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6), pp 1334-1339.

142. E. N. Pederson, C. W. J. McChalicher, F. Srienc (2006), Bacterial synthesis of PHA block copolymers, *Biomacromolecules*, 7, pp 1904-1911.

143. N. Peelman, P. Ragaert, B. De Meulenaer, D. Adons, R. Peeters, L. Cardon, F. Van Impe, F. Devlieghere (2013), Review: Application of bioplastics for food packaging, *Trend in Foods Science and Technology*, 32(2), pp 128-141.

144. S. Pilla (2011), Engineering applications of bioplastics and biocomposites – An overview, *Hanbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications, Scrivener Publishing LLC*, ISBN 978 0-470-62607-8, pp 1-14.

145. C. Pozo, M.V. Martínez-Toledo, B. Rodelas, J. González-López (2002), Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source, *Journal of Biotechnology*, 97, pp 125-131.

146. M. A. Prieto, B. Buhler, K. Jung, B. Witholt, B. Kessler (1999), PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated-protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes, *Journal of Bacteriology*,181, pp 858–68.

147. Q. S. Qi and B. H. A. Rehm (2001), Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase, *Microbiology*, 147, pp 3353-3358.

148. Q. Qi, A. Steinbüchel, B. H. A. Rehm (2000), In vitro synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(1), pp 37-43.

149. J. Quillaguamán, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, M. T. Alvarez, O. Delgado (2004), *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile bacterium isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, pp 721–725.

150. J. Quillaguamán, Thuoc Doan-Van, H. Guzmán, D. Guzmán, J. Martín, A. Everest, R. Hatti-Kaul (2008), Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, pp 227-232.

151. J. A. Ramsay, E. Berger, R. Voyer, C. Chavarie, B. A. Ramsay (1994), Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents, *Biotechnology techniques*, 8(8), pp 589-594.

152. D. N. Rathi, H.G. Amir, R.M.M. Abed, A. Kosugi, T. Arai, O. Sulaiman, R. Hashim, K. Sudesh (2013), Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simplified polymer recovery by a novel moderately halophilic bacterium isolated from hypersaline microbial mats, *Journal of Applied Microbiology*, 114, pp 384-395.

153. S. V. Reddy, M. Thirumala, S. K. Mahmood (2009), A novel *Bacillus* sp. accumulating poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, pp 837-843.

154. B. H. A. Rehm, A. Steinbüchel (1999), Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 25, pp 3-19.

155. B. H. A. Rehm, A. Steinbüchel (2001), PHA synthases: key enzymes of PHA biosynthesis, in 'Biopolymers' (Steinbüchel, A. and Doi, Y. eds), Polyesters I, 3a, pp. 173–215, Wiley-VCH, Weinheim.

156. B. H. A. Rehm (2010), Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications, *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp 578-592.

157. S. L. Riedel, C. J. Brigham, C. F. Budde, J. Bader, C. K. Rha, U. Stahl, A. J. Sinskey (2013), Recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), pp 461-470.

158. N. Saitou, M. Nei (1987), The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4, pp 406–425.

159. B.B. Salgaonkar, K. Mani, J.M. Braganca (2013), Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16, *Journal of Applied Microbiology*, 114, pp 1347-1356.

160. S. Samantaray, N. Mallick (2014), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by the diazotrophic cyanobacterium *Aulosira fertilissima* CCC 444, *Journal of Applied Phycology*, 26(1), pp 237-245.

161. K. Sangkharak, P. Prasertsan (2012), Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(3), pp 173-182.

162. S. Shahid, R. Mosrati, J. Ledauphin, C. Amiel, P. Fontaine, J. L. Gaillard, D. Corroler (2013), Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(3), pp 302-308.

163. T. R. Shamala, A. Chandrashekar, S. V. N. Vijayendra, L. Kshama (2003), Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR), *Journal of Applied Microbiology*, 94, pp 369-374.

164. L. Shang, M. Jiang, H. N. Chang (2003), Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations, *Biotechnology Letters*, 25, 1415–1419.

165. R. Shimizu, K. Chou, I. Orita, Y. Suzuki, S. Nakamura, T. Fukui (2013), Detection of phase-dependent transcriptomic changes and Rubisco-mediated CO_2 fixation into poly (3-hydroxybutyrate) under heterotrophic condition in *Ralstonia eutropha* H16 based on RNA-seq and gene deletion analyses, *BMC Microbiology*, 13, 169. doi: 10.1186/1471-2180-13-169.

166. M. Singh, S. K. S. Patel, V. C. Kalia (2009), *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates, *Microbial Cell Factories*, 8: 38, doi: 10.1186/1475-2859-8-38.

167. A. Shrivastav, S. K. Mishra, B. Shethia, I. Pancha, D. Jain, S. Mishra (2010), Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(2), pp 283-287.

168. L. F. Silva, J. G. C. Gomez, M. S. Oliveira, B. B. Torres (2000), Propionic acid metabolism and oly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp., *Journal of Biotechnology*, 76, pp 165–174.

169. D. A. D. Silva, R. V. Antonio, J. M. Rossi, R. S. Pena (2014), Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate by *Pseudomonas oleovorans* grown in sugary cassava extract supplemented with andiroba oil, *Food Science and Technology*, 34(4), pp 738-745.

170. A. Sivan (2011), New perspective in plastic biodegradation, *Current Opinion in Biotechnology*, 22, pp 422-426.

171. S. Slater, T. Gallaher, D. Dennis (1992), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coili* strain, *Applied and Envirronmental Microbiology*, 58(4), pp 1089-1094.

172. S. Slater, K. L. Houmiel, M. T. Tran, T. A. Mitsky, N. B. Taylor, S. R. Padgette, K. J. Gruys (1998), Multiple β-ketothiolases mediate poly(β-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*, *Journal of Bacteriology*, 180(8), pp 1979–1987.

173. H. J. Son, K. K. Kim, H. S. Kim, Y. K. Kim, S. J. Lee (2000), Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch cultures of *Pseudomonas* sp EL-2, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24, pp 36–40.

174. J. Y. Song, B. S. Kim (2005), Characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 and ATC 17699, *Biotechnology and Bioprocess Technology*, 10, pp 603-606.

175. J. H. Song, R. J. Murphy, R. Narayan, G. B. G. Davies (2009), Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, pp 2127-2139.

176. P. Spiekermann, B. H. A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister, A. Steinbüchel (1999), A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, *Archives of Microbiology*, 171, pp 73-80.

177. M. S. Sreekanth, S. V. N. Vijayendra, G. J. Joshi, T. R. Shamala (2013), Effect of carbon and nitrogen sources on simultaneous production of α-amylase and green food packaging polymer by *Bacillus* sp. CFR 67, *Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 404-408.

178. N. Sridewi, K. Bhubalan, K. Sudesh (2006), Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem, *Polymer Degradation and Stability*, 91, pp 2931-2940

179. A. Steinbüchel and H.G. Schlegel (1991), Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, *Molecular Microbiology*, 5(3), pp 535-542.

180. A. Steinbüchel, H. E. Valentin, A. Schönebaum (1994), Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids: Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) homopolyester, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 2(2), pp 67-74.

181. A. Steinbüchel, G. Schmack (1995), Large-scale production of poly(3-hydroxyvaleric acid) by fermentation of *Chromobacterium violaceum*, processing, and characterization of the homopolyester, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 3(4), pp 243-258.

182. A. Steinbüchel, B. Füchtenbusch (1998), Bacterial and other biological systems for polyester production, *Trends in Biotechnology,* 16(10), pp 419-427.

183. H. Storz, K. D. Vorlop (2013), Bio-based plastics: status, challenges and trends, *Applied Agriculture of Forestry and Resources,* 63, pp 321-332.

184. K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi (2000), Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyester, *Progress in Polymer Science*, 25, pp 1503-1555.

185. P. Suriyamongkol, R. Weselake, S. Narine, M. Moloney, S. Shah (2007), Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review, *Biotechnology Advances*, 25, pp 148–175.

186. K. Tajima, T. Igari, D. Nishimura, M. Nakamura, Y. Satoh, M. Munekata (2003), Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil, *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 95(1), pp 77-81.

187. K. Tajima, X. Han, Y, Satoh, A. Ishii, Y. Araki, M. Munekata, S. Taguchi (2012), In vitro synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) incorporating lactate (LA) with a block sequence by using a newly engineered thermostable PHA synthase from *Pseudomonas* sp. SG4502 with acquired LA-polymerizing activity, *Applied Microbiology and Biotechnology,* 94, pp 365-376.

188. K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar (2011), MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Molecular Biology and Evolution*, 28, pp 2731–2739.

189. D. Tan, Y. S. Xue, G. Aibaidula, G. Q. Chen (2011), Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01, *Bioresource Technology*, 102, 8130-8136.

190. G. Y. A. Tan, C. L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I. M. N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J. Y. Wang (2014), Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review, *Polymers*, 6, pp 706-754.

191. R. C. Thompson, C. J. Moore, F. S. voom Saal, S. H. Swan (2009), Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends, *Philosophical transactions of the royal society B*, 364, pp 2153-2166.

192. L. Tripathi, L. Wu, M. Dechuan, J. Chen, Q. Wu, G. Q. Chen (2013), *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions, *Bioresource Technology*, 142, pp 225-231.

193. S. P. Valappil, A. R. Boccaccini, C. Bucke, I. Roy (2007), Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, pp 1-17.

194. H. E. Valentin, D. Dennis (1997), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose, *Journal of Biotechnology*, 58, pp 33-38.

195. S. Vigneswari, A. N. Lee, M. I. A. Majid, A. A. Amirul (2010), Improved production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer using a combination of 1,4-butanediol and ɤ-butyrolactone, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, pp 743-746.

196. L. Villanueva, J. Del Campo, R. Guerrero (2010), Diversity and physiology of polyhydroxyalkanoate - producing and – degrading strains in microbial mats, *FEMS Microbiology Ecology*, 74(1), pp 42-54.

197. F. Wang, S. Y. Lee (1997), Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), pp 3703-3706.

198. Y. Wang, M. Ichikawa, A. Cao, Y. Inoue (1999), Comonomer composition distribution of P(3HB-co-3HP)s produced by *Alcaligenes latus* at several pH conditions, *Macromolecular Chenistry and Physics*, 200(5), pp 1047-1053.

199. H. H. Wang, X. T. Li, G. Q. Chen (2009), Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a fadBA knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442, *Process Biochemistry*, 44, pp 106-111.

200. Q. Wang, H. Zhang, Q. Chen, X. Chen, Y. Zhang, Q. Qi (2010), A marine bacterium accumulates polyhydroxyalkanoate consisting of mainly 3-hydroxydodecanoate and 3-hydroxydecanoate, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, pp 1449-1453.

201. Q. Wang, C. T. Nomura (2010), Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), pp 653-659.

202. H. H. Wang, X. R. Zhou, Q. Liu, G. Q. Chen (2011), Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), pp 1497-1507.

203. Q. Wang, P. Yang, M. Xian, Y. Yang, C. S. Liu, Y. C. Xue, G. Zhao (2013), Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) with fully controllable structures from glycerol, *Bioresource Technology*, 142, pp 741-744.

204. Y. Wang, R. Chen, J. Cai, Z. Liu, Y. Zheng, H. Wang, Q. Li, N. He (2013), Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from Levulinic acid by *Ralstonia eutropha*, *Plos One*, 8(4), pp 1-8, doi.orrg/10.1371/ journal.pone.0060318.

205. H. K Webb, J. Arnott, R. J. Crawford, E. P. Ivanova (2013), Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate), *Polymers*, 5, pp 1-18.

206. K. D. Wendlandt, W. Geyer, G. Mirschel, F. Al-Haj Hemidi (2005), Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods, *Journal of Biotechnology*, 117, pp 119–129.

207. J. Williams, G. Espinosa, H. Sansom, B. Markova, B. Zhang (2012), Public policy approaches for the reduction of plastic bag marine debris, *The Ocean Conservancy*,

208. M. S. Wong, T. B. Causey, N Mantzaris, G. N. Bennett, K. Y. San (2008), Engineering Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer composition in *E. coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, 99(4), 919-928.

209. Y. M. Wong, C. J. Brigham, C. K. Rha, A. J. Sinskey, K. Sudesh (2012), Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 121, pp 320-327.

210. Q. Wu, S. Sun, P. H. F. Yu, A. X. Z. Chan, G. Q. Chen (2000), Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates, *Acta Polymerica Sinica*, 6, pp 751-756.

211. Q. Wu, H. Huang, G. Hu, J. Chen, K. P. Ho, G. Q. Chen (2001), Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, pp 111–118.

212. L. Wu, S. Chen, Z. Li, K. Xu, G. Q. Chen (2008), Synthesis, characterization and biocompatibility of novel biodegradable poly[((R)-3-hydroxybutyrate)-block-(D,L-lactide)-block-(ε-caprolactone)] triblock copolymers, *Polymer International*, 57, pp 939-949.

213. W. P. Xie, G. Q. Chen (2007), Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *pha*PCJ, *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), pp 384-389.

214. T. Yamane, X. F. Chen, S. Ueda (1996), Polyhydroxyalkanoate synthesis from alcohols during the growth of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiology Letters*, 135, 207-211.

215. Y. H. Yang, C. Brigham, L. Willis, C. K. Rha, A. Sinskey (2011), Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs), *Biotechnology Letters*. 33(5), pp 937-942.

216. K. S. Yim, S. Y. Lee, H. N Chang (1996), Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, pp 495-503.

217. J. Yu, L. X. L. Chen (2008), The greenhouse gas emissions and fossil energy requirement of bioplastics from cradle to gate of a biomass refinery, *Environmental Science and Technology*, 42(18), pp 6961-6966.

218. H. Yue, C. Ling, T. Yang, X. Chen, Y. Chen, H. Deng, Q. Wu, J. Chen, G. Q. Chen (2014), A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates, *Biotechnology for Biofuels*, 7, 108. doi.10.1186/1754-6834-7-108.

219. Y. X. Zhao, Z. M. Rao, Y. F. Xue, P. Gong, Y. Z. Ji, Y. H. Ma (2015), Poly(3-hydroxybutyrate- -3-hydroxyvalerate) production by Haloarchaeon *Halogranum amyloticum*, *Applied Microbial and Cell Physiology*, 99(18), pp 7639-7649.

PHỤ LỤC