

## NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALARATE) (PHBV) CỦA CHỦNG VI KHUẨN MT33 PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI

Trần Hữu Phong<sup>1,\*</sup>, Bùi Thị Thanh Nga<sup>2</sup>, Phan Duệ Thanh<sup>1</sup>, Đoàn Văn Thược<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Công nghệ sinh học – Vi sinh, khoa Sinh học, Đại học Sư phạm Hà Nội

<sup>2</sup>Trường THPT Vân Nội, Đông Anh, Hà Nội

\*Email: [phongth@hnue.edu.vn](mailto:phongth@hnue.edu.vn)

Đến Tòa soạn: 20/9/2014; Chấp nhận đăng: 12/6/2015

### TÓM TẮT

20 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp polyhydroxyalkanoate (PHA) đã được phân lập và tuyển chọn từ nguồn nước thải thu được từ làng sản xuất bún Mạch Tràng, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội. Trong số đó, chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA cao nhất – chủng được kí hiệu MT33 – được lựa chọn cho các nghiên cứu sâu hơn. Chủng vi khuẩn MT33 thuộc nhóm trực khuẩn, Gram dương, và có khả năng sinh tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) với phân đoạn 3HV đạt 3 mol%. Điều kiện tối thích cho sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng vi khuẩn MT33 bao gồm glucose 20 g/L, cao nấm men 3 g/L, pH 5,5 - 7, và nhiệt độ từ 30 - 32 °C. Sinh khối khô (CDW) và hàm lượng PHBV cao nhất đạt được 5,08 g/L và 67 % wt thu được sau 36 giờ nuôi cấy chủng vi khuẩn MT33 trong điều kiện tối ưu.

*Từ khóa:* polyhydroxyalkanoate, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), polymer sinh học, nước thải.

### 1. MỞ ĐẦU

Lượng plastic tiêu thụ trên toàn thế giới hiện nay là khoảng hơn 250 triệu tấn, lượng tiêu thụ này tăng lên khoảng 5 % một năm, các plastic sử dụng có nguồn gốc chủ yếu từ dầu mỏ (<http://www.european-bioplastics.org>). Các loại plastic hay polymer có nguồn gốc từ dầu mỏ ví dụ như polyethylene, polypropylene, và polyvinylchloride đang được sử dụng rất rộng rãi vì có giá thành thấp [1]. Tuy nhiên những vật liệu này không có khả năng phân hủy sinh học, chính bởi vậy nó là nguyên nhân gây hiện tượng ô nhiễm môi trường [2].

Để hạn chế sự ô nhiễm môi trường do sử dụng các plastic không có khả năng phân hủy sinh học người ta đang phát triển và sử dụng các plastic có khả năng phân hủy sinh học (plastic tự phân hủy) ví dụ như poly lacticacid (PLA), polyhydroxyalkanoate (PHA) [3]. Trong số rất nhiều các loại nhựa sinh học thì PHA là loại nhựa có nhiều tiềm năng thay thế nhựa hóa dầu, đặc biệt trong lĩnh vực sản xuất bao bì. PHA là polymer được tích lũy trong tế bào như là nguồn dự trữ các bon và năng lượng bởi rất nhiều vi sinh vật, thường là trong điều kiện dư thừa các bon và thiếu một vài chất dinh dưỡng như oxy, nitơ, phốt phát, lưu huỳnh, hoặc man gan [4, 5].

Điểm hạn chế ảnh hưởng đến tiềm năng ứng dụng của PHA là giá thành của PHA đắt hơn so với các loại plastic có nguồn gốc từ mỏ. Chính bởi vậy các hướng nghiên cứu chủ yếu hiện nay là phân lập tìm kiếm các chủng vi sinh vật có khả năng tích lũy PHA cao trên các nguồn cơ chất rẻ tiền nhằm làm giảm giá thành sản xuất PHA [6].

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn từ mẫu nước thải của làng bún Mạch Tràng, xã Cổ Loa, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội. Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được chúng tôi lựa chọn chủng MT33 có khả năng sinh tổng hợp PHA cao để tiến hành nghiên cứu.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu nước thải của làng bún Mạch Tràng, xã Cổ Loa, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội.

#### 2.1.2. Các loại môi trường sử dụng

Môi trường phân lập vi khuẩn và giữ giống vi khuẩn (kí hiệu là HM) (g/l):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,25;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,09; KCl, 0,5; KBr, 0,06; peptone, 5; cao nấm men, 10; glucose, 1. Môi trường sản xuất PHA (kí hiệu là MA) (g/l):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,25;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,09; KCl, 0,5; KBr, 0,06;  $KH_2PO_4$ , 0,5; cao nấm men, 3; glucose, 20 [7]. Các thành phần của môi trường được hòa tan trong 1000 ml nước cất, pH của môi trường được điều chỉnh đến 7,0 bằng dung dịch 5 M NaOH và 5 M HCl, môi trường đặc được bổ sung 2 % agar.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập và tuyển chọn

Mẫu nước thải được pha loãng ở các nồng độ khác nhau và dàn đều trên môi trường thạch đĩa, sau 24 giờ nuôi cấy ở 30 °C, các khuẩn lạc riêng rẽ được cấy tách và kiểm tra khả năng tổng hợp PHA. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA được tiến hành theo phương pháp nhuộm với Nile blue A và soi dưới tia tử ngoại bước sóng 254 nm [8]. Để khẳng định thêm kết quả tuyển chọn, tiến hành làm tiêu bản cắt lớp và quan sát các hạt PHA tích lũy trong tế bào chủng tuyển chọn dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).

#### 2.2.2. Mô tả hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn

Cấy vi khuẩn theo hình dích đặc trên môi trường HM đặc, ủ ở 30 °C trong 24 giờ để vi khuẩn mọc thành khuẩn lạc. Quan sát, lựa chọn các khuẩn lạc mọc riêng rẽ để mô tả hình dạng, màu sắc khuẩn lạc. Làm tiêu bản giọt ép, tiêu bản nhuộm đơn, tiêu bản nhuộm Gram, quan sát và mô tả đặc điểm hình thái tế bào của chủng vi khuẩn tuyển chọn trên kính hiển vi quang học. Hình dạng và kích thước tế bào của chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định nhờ ảnh chụp từ kính hiển vi điện quét (SEM).

### 2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng và tích lũy PHA của vi khuẩn

Cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường HM đặc ở 35 °C trong 24 giờ, cấy chuyển sang môi trường HM lỏng, nuôi lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở 35 °C trong 13 giờ. Giống vi khuẩn được bổ sung với tỉ lệ 5 % (v/v) vào các môi trường thí nghiệm để thử ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nguồn carbon và nguồn nitrogen. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình, xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Office Excel.

### 2.2.4. Phương pháp xác định khối lượng tế bào khô và hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào vi khuẩn

Khối lượng tế bào khô được xác định theo phương pháp của Van-Thuoc và Quillaguamán (2014) [7]. Hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào vi khuẩn được xác định theo phương pháp sắc kí khí [9].

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn sinh PHA

Từ các mẫu nước thải thu được từ làng bún thôn Mạch Tràng, xã Cổ Loa, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội, chúng tôi đã tiến hành phân lập và thu được 144 chủng vi khuẩn (kí hiệu MT1 đến MT144). Dựa trên phương pháp nhuộm với Nile Blue A và soi dưới tia tử ngoại (Hình 1a), kết hợp với quan sát phát hiện các thể ẩn nhập trong tế bào bằng kính hiển vi quang học ở vật kính 100X chúng tôi đã thu được 20 chủng có khả năng tích lũy PHA. Nuôi cấy các chủng vi khuẩn này trên môi trường sản xuất PHA (môi trường MA) trong thời gian 24 giờ, thu sinh khối tế bào và xác định hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào bằng phương pháp sắc kí khí (Bảng 1).

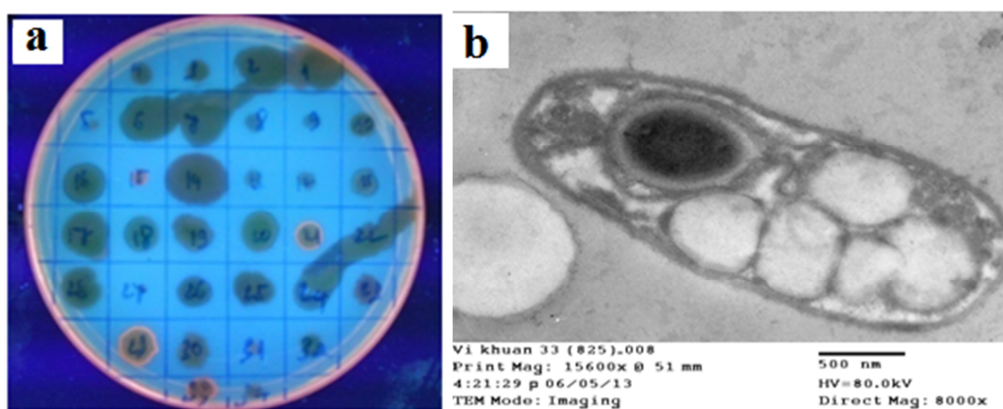
Bảng 1. Đặc điểm hình thái tế bào và khả năng sinh tổng hợp PHA của một số chủng vi khuẩn phân lập được.

STT	Kí hiệu chủng	Đặc điểm tế bào		CDW	PHA <sup>a</sup> (% wt)	Thành phần PHA <sup>a</sup> (mol%)	
		Hình thái tế bào	Nhuộm Gram			3HB	3HV
1	MT15	Trực khuẩn	+	3,81 ± 0,04	53 ± 1,2	97,6	2,4
2	MT21	Trực khuẩn	+	1,31 ± 0,04	12 ± 1,5	100	0
3	MT29	Trực khuẩn	+	1,42 ± 0,10	17 ± 0,6	98,3	1,7
4	MT33	Trực khuẩn	+	4,18 ± 0,05	51 ± 0,2	97,1	2,9
5	MT56	Trực khuẩn	+	0,96 ± 0,06	12 ± 0,7	100	0
6	MT65	Trực khuẩn	+	2,20 ± 0,11	13 ± 2,3	100	0
7	MT70	Trực khuẩn	+	0,88 ± 0,06	11 ± 1,8	100	0
8	MT71	Trực khuẩn	+	1,88 ± 0,11	29 ± 1,1	100	0
9	MT72	Cầu khuẩn	+	1,28 ± 0,06	6 ± 1,5	100	0
10	MT84	Cầu khuẩn	-	0,82 ± 0,06	5 ± 0,2	100	0
11	MT85	Trực khuẩn	-	0,65 ± 0,05	1 ± 0,3	98,5	1,5
12	MT88	Trực khuẩn	+	0,53 ± 0,10	3 ± 1,4	100	0
13	MT90	Trực khuẩn	+	0,67 ± 0,04	10 ± 2,1	100	0

14	MT97	Cầu khuẩn	-	$1,17 \pm 0,04$	$7 \pm 1,4$	100	0
15	MT112	Trực khuẩn	+	$0,90 \pm 0,07$	$12 \pm 2$	100	0
16	MT123	Trực khuẩn	+	$1,33 \pm 0,03$	$17 \pm 0,2$	100	0
17	MT129	Cầu khuẩn	+	$0,83 \pm 0,03$	$12 \pm 1$	100	0
18	MT132	Trực khuẩn	+	$0,63 \pm 0,06$	$21 \pm 1,7$	100	0
19	MT133	Cầu khuẩn	+	$0,65 \pm 0,07$	$12 \pm 3,1$	100	0
20	MT144	Cầu khuẩn	+	$0,57 \pm 0,04$	$13 \pm 2,8$	100	0

Ghi chú: <sup>a</sup> Phân tích nhờ sắc kí khí (GC)

Kết quả cho thấy cả 20 chủng vi khuẩn đều tích lũy PHA trong tế bào với hàm lượng dao động từ 1 % đến 53 %. Các chủng vi khuẩn này chủ yếu tích lũy poly(3-hydroxybutyrate), chỉ có một vài chủng có khả năng tích lũy copolymer - poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). PHB là loại polymer điển hình của nhóm PHA, PHB được tích lũy bởi đa số các vi sinh vật, tuy nhiên loại polymer này có nhược điểm là cứng và giòn nên tiềm năng ứng dụng bị hạn chế. PHBV là loại polymer hỗn hợp bao gồm các tiểu phần PHB và poly(3-hydroxyvalerate) (PHV), độ mềm dẻo và khả năng đàn hồi của PHBV tăng lên tùy thuộc vào hàm lượng PHV có trong hỗn hợp, chính bởi vậy hiện nay các nhà khoa học đang tập trung nghiên cứu và sản xuất PHBV bởi tiềm năng ứng dụng của chúng vượt trội so với PHB [5, 10]. Trong số 20 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA, chúng tôi lựa chọn chủng MT33 để tiếp tục nghiên cứu bởi vì chủng này sinh trưởng khá mạnh ( $CDW = 4,18 \text{ g/l}$ ) và tích lũy hàm lượng PHA lên tới 51 %. Loại PHA mà chủng MT33 tích lũy là PHBV trong đó hàm lượng của 3-hydroxyvalerate chiếm khoảng 3 %. Ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) cho thấy có khoảng 2-7 hạt PHBV trong mỗi tế bào của chủng MT33 và kích thước các hạt này dao động từ 0,3 – 0,7  $\mu\text{m}$  (Hình 1b).

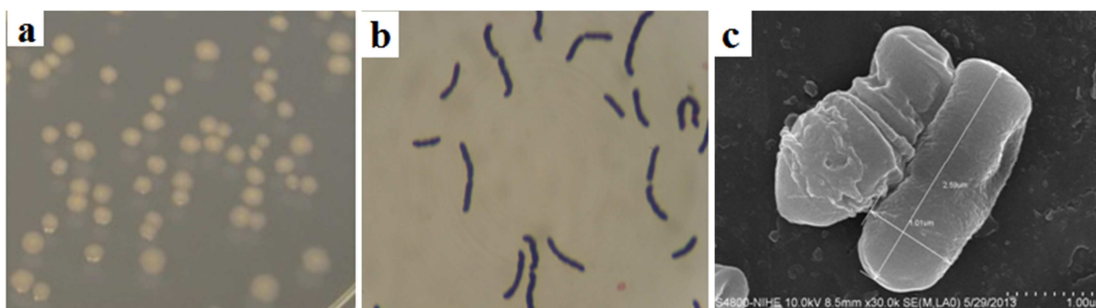


Hình 1. Kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy PHA: (a) Các chủng tích lũy PHA (MT15, MT21, MT29 và MT33) phát sáng khi nhuộm bằng Nile blue A và soi dưới tia tử ngoại bước sóng 254 nm, (b) Các hạt PHA màu sáng tích lũy trong tế bào của chủng MT33 khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).

### 3.2. Hình thái khuẩn lạc, tế bào của chủng vi khuẩn MT33

Khuẩn lạc của chủng MT33 có dạng tròn đều, hơi lõm ở tâm, khuẩn lạc có màu trắng sữa, bề mặt trơn bóng (Hình 2a). Chủng MT33 giữ màu tím khi nhuộm Gram chứng tỏ chúng thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương (Hình 2b). Ảnh kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy chủng MT33 là trực khuẩn, kích thước tế bào dao động 1 - 1,35  $\mu\text{m} \times 2,14 -$

2,95  $\mu\text{m}$  (Hình 2c), thường dính với nhau từng đôi một, có khi tạo thành chuỗi 3 hoặc 4 tế bào (Hình 2b). Các đặc điểm hình thái và sinh hóa của chủng MT33 có nhiều điểm giống với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*.

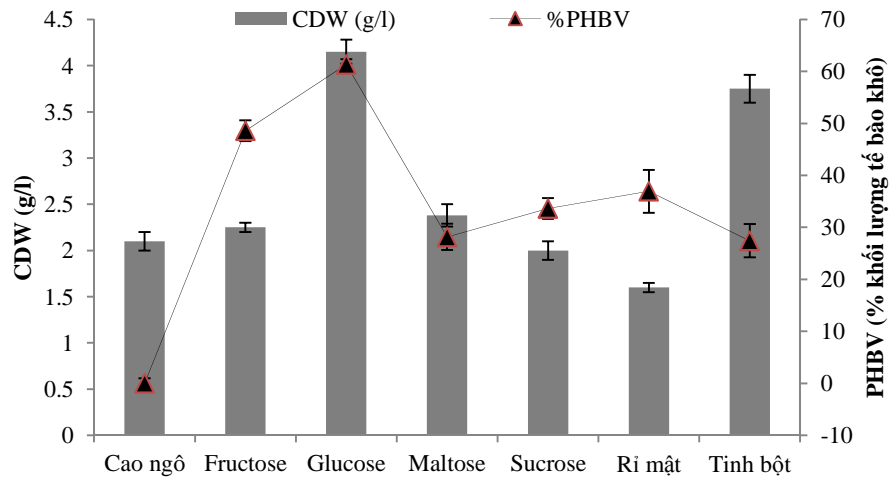


Hình 2. (a) Khuẩn lạc của chủng MT33 trên môi trường đặc, (b) Ảnh nhuộm Gram của chủng MT33, (c) Hình dạng và kích thước tế bào của chủng MT33 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

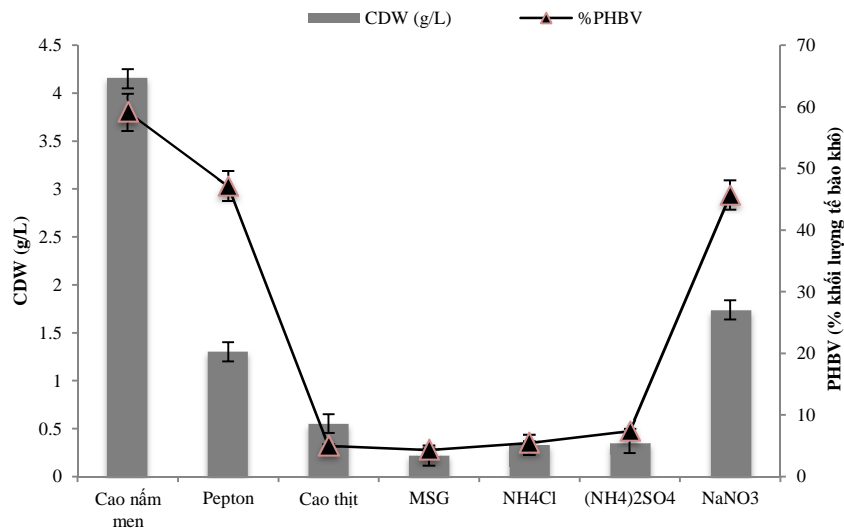
### 3.3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng MT33

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Carbon là nguồn dinh dưỡng thiết yếu đầu tiên đối với tất cả các sinh vật. Bên cạnh đó đa số vi khuẩn chỉ tích lũy PHA khi trong môi trường nuôi cấy dư thừa carbon, điều đó chỉ ra vai trò rất quan trọng của nguồn carbon đối với các chủng tích lũy PHA [2, 5]. Trong nghiên cứu này ảnh hưởng của một số nguồn carbon (hàm lượng 20 g/l) đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng MT33 đã được chúng tôi khảo sát. Kết quả sau 30 h nuôi cấy cho thấy, chủng vi khuẩn MT33 có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV trên tất cả 7 nguồn carbon sử dụng (cao ngô, fructose, glucose, maltose, sucrose, ri đường và tinh bột). Trong đó glucose và tinh bột là 2 nguồn cơ chất thuận lợi nhất cho sự sinh trưởng của chủng MT33 (Hình 3). Tuy sinh trưởng khá tốt trên 2 nguồn carbon là glucose (CDW = 4,15 g/l) và tinh bột (CDW = 3,75 g/l) nhưng khả năng tích lũy PHBV trên 2 nguồn carbon này là khác hẳn nhau. Hàm lượng PHBV tích lũy trong tế bào của chủng MT33 lên đến 61,4 % khi sử dụng glucose, trong khi đó hàm lượng PHBV tích lũy chỉ có khoảng 27,4 % khi sử dụng tinh bột là nguồn carbon. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu trước đó của Van-Thuoc và Quillaguamán (2014) [7], khi nghiên cứu khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng vi khuẩn Gram dương (*Bacillus* sp. ND153) phân lập tại rừng ngập mặn Nam Định trên các nguồn carbon khác nhau, các tác giả này cũng nhận thấy: tinh bột là nguồn carbon tốt cho sinh trưởng nhưng không thuận lợi cho sinh tổng hợp PHBV, ngược lại glucose thì vừa thuận lợi cho sinh trưởng lại cũng thuận lợi cho sinh tổng hợp PHBV. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng vi sinh vật sẽ tích lũy nhiều PHA khi môi trường sống dư thừa carbon [2, 5, 6]. Glucose là đường đơn nên chủng MT33 có thể sử dụng trực tiếp để phát triển và tích lũy PHA do đó sinh khối vi sinh vật và hàm lượng PHBV thu được khá cao. Trong khi đó chủng MT33 không sử dụng được tinh bột trực tiếp mà chúng phải sản sinh amylase để từ từ thủy phân tinh bột thành đường. Lượng đường thủy phân tạo ra sẽ được chủng MT33 sử dụng luôn cho sinh trưởng nên hàm lượng đường trong môi trường thấp – đây không phải là điều kiện thuận lợi cho sinh tổng hợp PHA.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng MT33.



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng MT33.

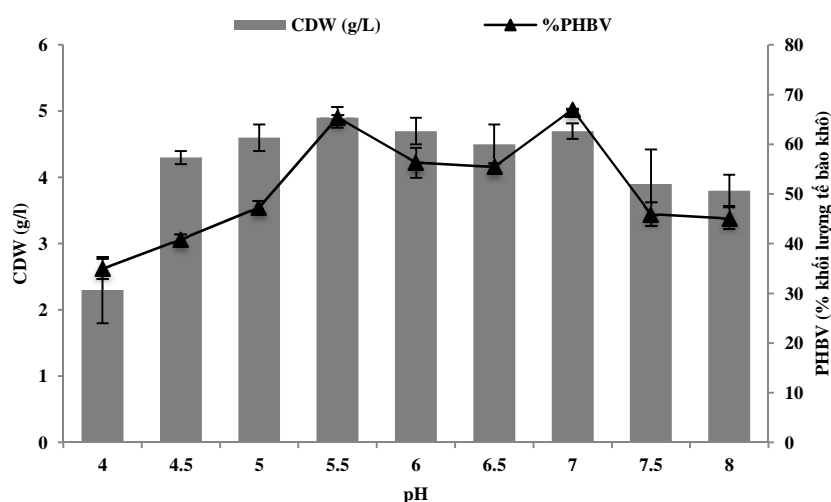
### 3.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nitơ là nguyên tố cần thiết để các sinh vật tổng hợp protein, axit nucleic, ATP...vì thế nguồn nitơ đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng phát triển của vi khuẩn. Chúng tôi khảo sát khả năng sử dụng các nguồn N khác nhau đối với quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng MT33. Kết quả thu được sau 30 giờ nuôi cấy cho thấy, chủng vi khuẩn MT33 phát triển tốt và sinh tổng hợp nhiều PHBV trên môi trường có chứa nguồn N hữu cơ như cao nấm men (CNM), cao thịt, pepton và monosodium glutamate (MSG), ngược lại các nguồn N vô cơ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{NaNO}_3$ ) không thuận lợi cho sinh trưởng và tích lũy PHBV. Khối lượng tế bào khô (4,15 g/L) và hàm lượng PHBV tích lũy trong tế bào (60 %) đạt giá trị cao nhất khi CNM được sử dụng làm nguồn N (Hình 4).

### 3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng MT33

#### 3.4.1. Ảnh hưởng của pH

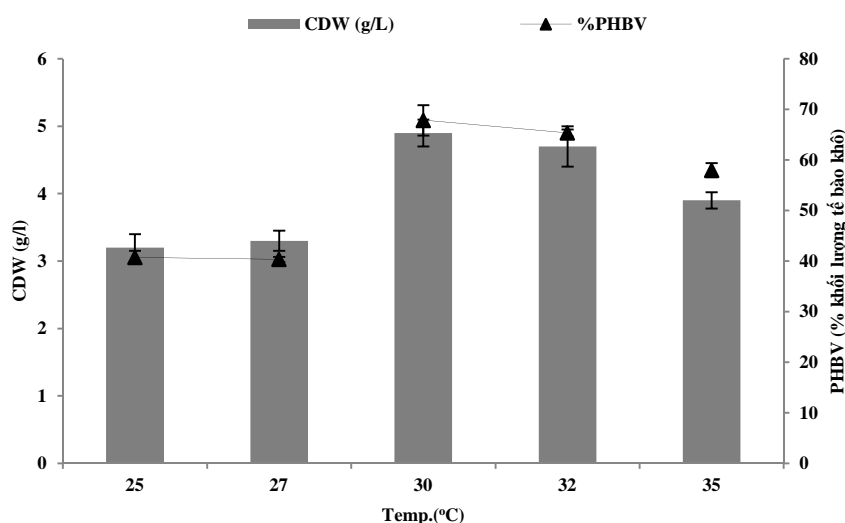
Kết quả ở Hình 5 cho thấy, chủng vi khuẩn MT33 có khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA tốt trong dải pH khá rộng. Sinh khối của chủng MT33 luôn đạt trên 3 g/L trong khoảng pH 4,5 - 8 và đạt cực đại trong khoảng pH từ 5,5 - 7 (sinh khối dao động từ 4,7 - 4,9 g/L). Hàm lượng PHBV tích lũy cao nhất (khoảng 56 - 67 % khối lượng tế bào khô) khi nuôi cấy chủng MT33 trong dải pH từ 5,5 - 7. Như vậy có thể thấy chủng MT33 phát triển tốt nhất ở pH axit yếu, đây là điều kiện pH thường thấy ở nước thải có nhiều tinh bột do sự thủy phân và biến đổi tinh bột thành một số axit hữu cơ.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH ban đầu đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng vi khuẩn MT33.

#### 3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng vi khuẩn MT33 đã được chúng tôi tiến hành nghiên cứu. Kết quả cho thấy chủng MT33 sinh trưởng và tích lũy nhiều PHBV nhất trong khoảng nhiệt 30 - 32 °C. Ở nhiệt độ 30 °C, khối lượng tế bào khô và hàm lượng PHBV tích lũy trong tế bào đạt giá trị cực đại là 4,9 g/L và 67,8 % (Hình 6).

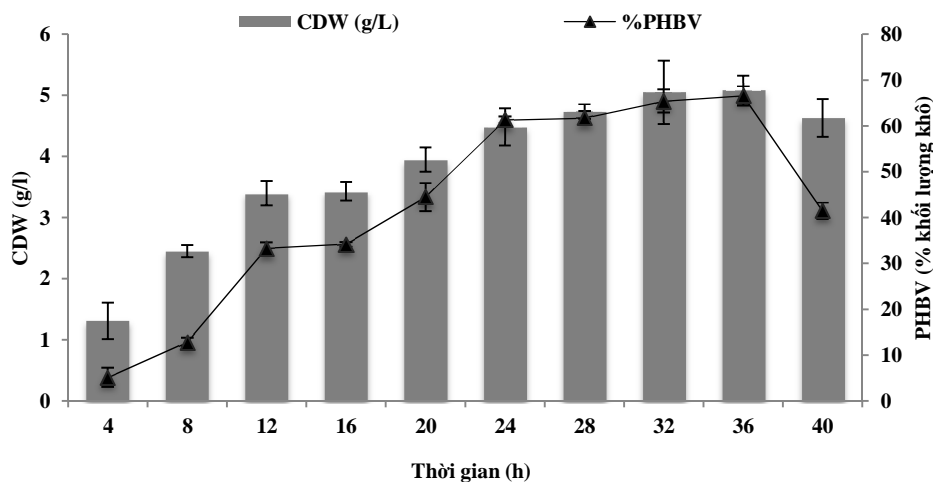


Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng vi khuẩn MT33.

### 3.4.3. Động thái lên men của chủng MT33

Trên bề mặt của các hạt PHA bên cạnh các enzyme tổng hợp (PHA synthase) còn có các enzyme phân hủy PHA (depolymerase) [4]. Trong điều kiện dư thừa carbon thì các PHA synthase hoạt động mạnh nhằm giúp tế bào tích lũy carbon, ngược lại khi nguồn carbon trong môi trường sống giảm thì depolymerase hoạt động mạnh nhằm phân hủy PHA giải phóng nguồn carbon và năng lượng cho tế bào. Như vậy việc nghiên cứu động thái sinh trưởng và sinh polymer của các chủng vi khuẩn để tìm ra thời điểm tích lũy polymer cực đại là việc làm cần thiết. Kết quả nghiên cứu động thái sinh trưởng và khả năng tích lũy PHBV của chủng MT33 được thể hiện trong Hình 7. Kết quả cho thấy, theo thời gian nuôi cấy sinh khối tế bào tăng dần và hàm lượng PHB tích lũy cũng tăng dần. Tại thời điểm 4 giờ, sinh khối tế bào chỉ có 1,31 g/L và hàm lượng PHBV trong tế bào thấp (5 %). Sinh khối tế bào và hàm lượng PHBV tích lũy đạt giá trị cực đại là 5,08 g/L và 67 % sau 36 giờ nuôi cấy (Hình 7). Tiếp tục nuôi cấy và thu sinh khối tế bào, chúng tôi nhận thấy tại 40 giờ sinh khối tế bào bắt đầu giảm và đặc biệt hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào cũng giảm. Vào thời điểm này, có thể do chất ức chế tạo ra nhiều và môi trường bắt đầu cạn kiệt chất dinh dưỡng nên tế bào chủng MT33 và PHBV tích lũy đã bắt đầu bị phân hủy.





Hình 7. Sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng vi khuẩn MT33 tại các thời điểm khác nhau.

#### 4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu nước thải từ làng bún xã Mạch Tràng, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội chúng tôi đã phân lập được 144 chủng vi khuẩn trong đó có 20 chủng có khả năng sinh tổng hợp PHA. Chủng vi khuẩn MT33 với khả năng sinh trưởng nhanh và tích lũy nhiều hạt polymer trong tế bào đã được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu.

Chủng MT33 là trực khuẩn Gram dương, có khả năng sinh tổng hợp các hạt poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Điều kiện môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp PHBV của chủng này là: đường glucose (20 g/L), cao nấm men (3 g/L), nhiệt độ 30 – 32 °C và pH 5,5 - 7,0. Khối lượng tế bào khô và hàm lượng PHBV đạt giá trị cực đại là 5,08 g/L và 67 % sau 36 giờ nuôi cấy ở điều kiện tối ưu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Panda B., Jain P., Sharma L., and Mallick N. - Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Bioresour Technol* **97** (2006) 1296-1301.
2. Reddy C. S. K., Ghai R., Rashmi, and Lalia V. C. - Polyhydroxyalkanoates: an overview, *Bioresour. Technol.* **87** (2003) 137-146.
3. Salehizadeh H., and van Loosdrecht M. C. M. - Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance, *Biotechnol. Adv.* **22** (2004) 261-279.
4. Rehm B. H. A. - Polyester synthases: natural catalysts for plastics, *Biochem. J.* **376** (2003) 15-33.
5. Sudesh K., Abe H., and Doi Y. - Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Prog. Polym. Sci.* **25** (2000) 1503-1555.
6. Choi J. and Lee S. Y. - Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51** (1999) 13-21.

7. Van-Thuoc D. and Quillaguamán J. - Improving culture conditions for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Bacillus* sp. ND153, a bacterium isolated from a mangrove forest in Vietnam, *Ann. Microbiol.* **64** (2014) 991-997.
8. Spiekermann P., Rehm B. H. A., Kalscheuer R., Baumeister D., and Steinbüchel A. - A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, *Arch. Microbiol.* **171** (1999) 73-80.
9. Huijberts G. N. M., van der Wal H., Wilkinson C., and Eggink G. - Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria, *Biotechnol. Tech.* **8** (1994) 187-192.
10. Philip S., Keshavarz T., and Roy I. - Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82** (2007) 233-247.

### ABSTRACT

#### STUDY ON POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) PRODUCTION BY STRAIN MT33, A BACTERIUM ISOLATED FROM WASTE WATER

Tran Huu Phong<sup>1,\*</sup>, Bui Thi Thanh Nga<sup>2</sup>, Phan Due Thanh<sup>1</sup>, Doan Van Thuoc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology, Hanoi National University of Education, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Vannoi Highschool, Donganh, Hanoi, Vietnam*

\*Email: phongth@hnue.edu.vn

Twenty PHA producer bacteria were isolated and screened from waste water collected from Mach Trang village, Dong Anh district, Ha Noi city. Among them, the highest PHA producer bacterium – strain MT33 was chosen for further study. Strain MT33 is a gram-positive and rod-shape bacterium, able to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) with 3 % mol HV unit. The optimum conditions for cell growth and PHBV production by strain MT33 are glucose of 20 g/L, yeast extract of 3 g/L, pH 5,5 - 7, and temperature 30 – 32 °C. Maximum CDW and PHBV content of 5,08 g/L and 67 % were respectively obtained by strain MT33 after 36 h of cultivation at optimal condition.

*Keywords:* polyhydroxyalkanoate, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), biopolymer, waste water.