

Ảnh hưởng của rỉ đường lên sự tăng trưởng và tích lũy PHB của một số chủng vi khuẩn phân lập tại TP Hồ Chí Minh

Huỳnh Văn Hiếu^{1*}, Trần Hoàng Dũng², Lê Tuấn Lộc²
Chung Anh Dũng³, Phạm Công Hoạt⁴

¹Khoa Khoa học nông nghiệp - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Viện Kỹ thuật công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

³Phòng Công nghệ sinh học, Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam

⁴Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 29/3/2016, ngày chuyển phân biện 8/4/2016, ngày nhận phân biện 29/5/2016, ngày chấp nhận đăng 27/6/2016

Trong nghiên cứu này, các tác giả đánh giá khả năng sinh tổng hợp polyhydroxybutyrate (PHB) của vi khuẩn (VK) *Pseudomonas stutzeri* strain H6, *Enterobacter cloacae* strain H62 và *Bacillus sp.* strain H37 (đây là các VK do các tác giả phân lập trước đó) và ảnh hưởng của rỉ đường lên khả năng sinh trưởng và tổng hợp PHB của chúng. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 20 g/l, mật rỉ đường chưa tác động mạnh đến sinh tổng hợp PHB bằng nồng độ 40 g/l. Nồng độ 60 g/l rỉ đường ức chế khả năng tổng hợp PHB của các chủng VK nghiên cứu. Chủng *Bacillus sp.* strain H37 tích lũy PHB ở ngưỡng 86% sinh khối khô với nồng độ rỉ đường 40 g/l sau 48 giờ nuôi. Tương tự, chủng *E. cloacae* strain H62 cũng cho PHB cao nhất ở mức 85,6% sinh khối khô sau 48 giờ nuôi ở nồng độ 40 g/l. Chủng *P. stutzeri* strain H6 có khả năng tích lũy PHB hơn hẳn 2 chủng nêu trên, sau 28 giờ nuôi cấy ở nồng độ mật rỉ 40 g/l, chúng tích lũy PHB lên đến 82%. Bên cạnh đó, chủng *Alcaligenes eutrophus* cũng được xem xét như chủng đối chứng.

Từ khóa: *cacillus, Enterobacter, Polyhydroxybutyrate (PHB), Pseudomonas, rỉ đường.*

Chỉ số phân loại 2.8

Đặt vấn đề

PHB là một polymer hữu cơ đã và đang được ứng dụng thương mại do đặc tính tự phân hủy sinh học cũng như vật liệu y sinh đầy tiềm năng. Trong tế bào vi sinh vật (VSV), PHB là chất dự trữ C và năng lượng, nó được tổng hợp và dự trữ trong tế bào dưới dạng các hạt nhỏ và có thể chiếm đến 90% khối lượng khô tế bào (Refe). Việc tích lũy PHB trong tế bào chất được xem là một chiến lược khôn ngoan của VSV để chống chịu với điều kiện thay đổi của môi trường. Quá trình tích lũy PHB thường diễn trong pha sinh trưởng tĩnh khi các tế bào bị giới hạn bởi một hoặc nhiều nhân tố cần thiết của môi trường như: N, P, S, Mg, K, Fe hoặc O₂ nhưng lại dư thừa nguồn C [1].

Một trong những yếu tố làm hạn chế việc sản xuất thương mại của PHB (cũng như các thành viên họ PHA khác) là do giá thành của nguồn C quá cao. Theo đó, nguồn C thường dùng để sản xuất PHB là đường và cứ 3 tấn glucose mới cho ra 1 tấn PHB. Do vậy, từ những năm 80 của thế kỷ trước, nhiều nghiên cứu đã tìm cách sử dụng nguồn cơ chất rẻ tiền như methanol, ethanol và rỉ đường [2].

Rỉ đường là chất thải phổ biến của ngành công

nghiệp đường, nguồn C trong rỉ đường chính là sucrose, vài loại đường khác và một số yếu tố trung vi lượng. Thành phần hóa học trong rỉ đường biến thiên phụ thuộc vào các điều kiện như thổ nhưỡng, thời tiết, giống mía, giai đoạn thu hoạch cũng như quy trình sản xuất tại mỗi nhà máy. Tuy nhiên, vitamin và biotin có trong rỉ đường đóng vai trò như là yếu tố kích thích sự tăng trưởng của VSV. Hiện nay, 2 loại rỉ đường được sử dụng phổ biến trong sản xuất PHB là mật rỉ mía và mật rỉ củ cải đường [2].

Ở Việt Nam, hướng nghiên cứu sản xuất PHB từ VSV đã được quan tâm từ 10 năm qua. Lê Lý Thùy Trâm và cs (2006) sử dụng chủng *Methylobacterium sp.*, được phân lập từ môi trường nuôi cấy mô cây chanh dây tạp nhiễm VK để lên men tạo PHB chiếm 31,37% tổng lượng sinh khối khô sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng căn bản chứa 1% methanol là nguồn C [3]. Nhóm tác giả Phạm Thanh Hà và cs (2008) đã sử dụng bột sản công nghiệp làm cơ chất cho chủng VK đột biến *Alcaligenes latus* VN1-20 sinh tổng hợp PHB trong điều kiện lên men 2 giai đoạn có điều khiển, cho hàm lượng PHB tại thời điểm kết thúc lên men đạt ~15 g/l, với năng suất tích lũy PHB đạt ~75% khối lượng

*Tác giả liên hệ: Email: hieuhv@hoidoanhnghiep.vn; Tel: 0913758542

Influence of molasses on the growth and polyhydroxybutyrate accumulation of native bacteria isolated in Ho Chi Minh city

Summary

In this research, the authors evaluated the PHB biosynthesis and the effect of molasses on growth and PHB accumulation of the three bacterial strains which had been previously isolated: *Pseudomonas stutzeri* strain H6, *Enterobacter cloacae* strain H61 and *Bacillus* sp. strain H37. The results showed that molasses at concentration of 20 g/l was less effective than at 40 g/l in inducing PHB accumulation. However, raising the concentration to 60 g/l conferred the inhibitory effect on the PHB biosynthesis of the strains in this study. The *Bacillus* sp. strain H37 accumulated 86% (w/w) PHB at 40 g/l molasses after 48 hours of incubation. *Enterobacter cloacae* strain H61 also produced 85.6% (w/w) PHB at the same molasses concentration and incubation time. Meanwhile, *Pseudomonas stutzeri* strain H6 surpassed the above two strains to produce 82% (w/w) PHB at 40 g/l of molasses within 28 hours of incubation. *Alcaligenes* sp. was used in this experiment as the control strain.

Keywords: *Bacillus*, *Enterobacter*, molasses, Polyhydroxybutyrate (PHB), *Pseudomonas*.

Classification number 2.8

khô tế bào [4]. Tuy nhiên, chưa có công trình nghiên cứu nào ở Việt Nam báo cáo việc sử dụng rỉ đường để nuôi cấy lên men VSV có khả năng tổng hợp PHB. Trong nghiên cứu này, chúng tôi muốn đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của *P. stutzeri* strain H6, *E. cloacae* strain H62 và *Bacillus* sp. strain H37 phân lập tại khu vực TP Hồ Chí Minh trên cơ chất là rỉ đường. Chúng *Alcaligenes eutrophus* strain H16 được sử dụng như chủng hoang dại đối chứng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Chủng VK dùng trong thí nghiệm: gồm các chủng *P. stutzeri* strain H6, *E. cloacae* strain H62 và *Bacillus* sp. strain H37 được tuyển chọn từ các VK được phân lập trong nghiên cứu trước đó [5]. Chủng *A. eutrophus*

strain H16 (NBRC 102504, National Institute of Technology and Evaluation) được sử dụng như chủng hoang dại đối chứng.

Phương pháp xử lý rỉ đường: rỉ đường thu tại cơ sở sản xuất đường mía Thiên Hòa, quận 8, TP Hồ Chí Minh. Trước khi bổ sung vào môi trường lên men, rỉ đường mía được xử lý để loại bỏ một số tạp chất. Hòa tan rỉ đường với nước theo tỷ lệ 1:1 rồi chuẩn độ pH dung dịch đến 1,5 bằng H_2SO_4 98%. Sau đó, đun sôi dung dịch trong 30 phút để thủy phân các chất bã hữu cơ. Để nguội dung dịch và dùng $Ca(OH)_2$ để chuẩn độ pH dung dịch đến 7,5. Sau đó, để yên dung dịch trong 12 giờ để lắng tủa. Cuối cùng, lọc bỏ tủa và đưa đi hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút [6].

Phương pháp thiết lập đường cong sinh trưởng: đường cong sinh trưởng của VK được xây dựng dựa trên mối tương quan giữa mật độ tế bào và OD_{600} của dịch huyền phù tế bào. Mật độ tế bào sẽ được suy ra từ độ đục của dịch nuôi cấy dựa vào đồ thị tương quan đã được thiết lập trước đó [3].

Phương pháp phân tích khối lượng khô tế bào: lấy mẫu ở các mốc thời gian khác nhau (20, 24, 28, 44, 48, 52, 68, 72 giờ sau khi nuôi cấy), cho dịch nuôi cấy vào ống eppendorf 1,5 ml và ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi được loại bỏ, phần tủa bên dưới được rửa lại với acetone/ethanol (tỷ lệ 1/1) để loại bỏ hơi nước, sau đó sấy khô ở 80°C trong 16 giờ. Để yên ống eppendorf có sinh khối trong 30 phút cho nguội lại và đem cân được $m_{\text{ống+mẫu}}$ (g). Khối lượng khô của tế bào (CDW) được xác định bằng cách lấy $m_{\text{ống+mẫu}}$ trừ cho $m_{\text{ống}}$ [3].

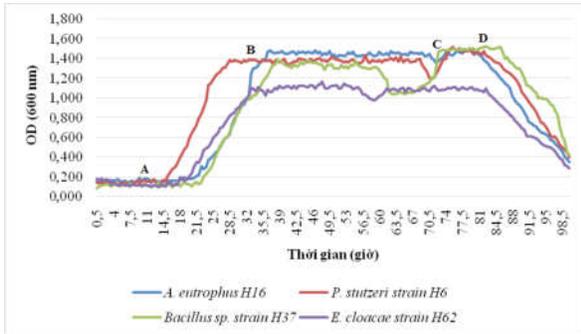
Phương pháp xác định hàm lượng PHB trong sinh khối tế bào: sau khi thu nhận được bột PHB, tiến hành cân và xác định % PHB/CDW [7]. Sinh khối khô tế bào được xử lý với NaClO 30% và chloroform (tỷ lệ 1/1). Hỗn hợp được đem đi vortex và ủ ở 30°C trong 90 phút, sau đó đem đi ly tâm trong 15 phút, 4.000 vòng/phút ở 30°C. Thu nhận pha chloroform và xử lý với dung dịch methanol (7 methanol/3 nước), trong đó tỷ lệ methanol bằng 10% lượng chloroform đã sử dụng. Để khô mẫu trong điều kiện tự nhiên trong 48 giờ để bay hơi hết các sản phẩm thừa. Phần còn lại trong ống có dạng bột trắng chính là PHB [3].

Kết quả và thảo luận

Thiết lập đường cong sinh trưởng

Các chủng VK được cấy vào môi trường dinh dưỡng nuôi lắc 140 vòng/phút ở 37°C. Dịch huyền phù

được thu sau mỗi 30 phút nuôi cấy để đo OD₆₀₀ xác định chỉ số hấp thụ và số lượng tế bào tại thời điểm lấy mẫu. Thực hiện lặp lại công việc trên trong vòng 100 giờ. Đường cong sinh trưởng của các chủng VK được thể hiện trên hình 1.



Hình 1: đường cong sinh trưởng của 4 chủng VK
A: 10 giờ sau nuôi cấy; B: 33 giờ sau nuôi cấy; C: 72 giờ sau nuôi cấy;
D: 82 giờ sau nuôi cấy

Kết quả ở hình 1 cho thấy sự khác biệt của các chủng VK có khả năng tổng hợp PHB so với các chủng VK khác. Đó chính là sự suy vong và tăng sinh lần 2 ở khoảng cuối pha cân bằng. Hiện tượng này thể hiện rõ ràng ở 2 chủng *Bacillus sp. strain H37* (trong khoảng giờ thứ 68 và giờ thứ 74) và *E. cloacae strain H62* (trong khoảng giờ thứ 61 và 73). Ở 2 chủng *A. eutrophus H16* và *P. stutzeri strain H6* cũng có hiện tượng trên, tuy nhiên lại diễn ra nhanh hơn và ít biến động hơn.

Ở giai đoạn cuối pha cân bằng, mật độ tế bào giảm nhanh rồi lại phát triển theo lũy thừa, sau đó lại tiếp tục duy trì ở pha cân bằng một thời gian ngắn rồi đi vào pha suy vong. Hiện tượng này được giải thích dựa vào cơ chế sinh tổng hợp và phân giải PHB của các VK này. Song song với quá trình sinh trưởng của VK là quá trình tổng hợp PHB (khả năng tổng hợp mạnh hay yếu tùy vào chủng loại VK) và dự trữ chúng dưới dạng các hạt nhỏ bên trong tế bào. Khi nguồn dinh dưỡng sẵn có trong môi trường cạn kiệt dần, các hạt PHB này sẽ được phân giải thành acetyl-CoA để VK sử dụng. Với nguồn dinh dưỡng mới vừa được tạo ra, tế bào sẽ tiếp tục tăng sinh. Mật độ tế bào đạt cực đại ở lần tăng sinh này có thể bằng hoặc cao hơn so với lần tăng sinh đầu tiên nhưng hàm lượng PHB thì thấp hơn rất nhiều và khi những hạt PHB dự trữ được sử dụng hết thì VK sẽ đi vào pha suy vong.

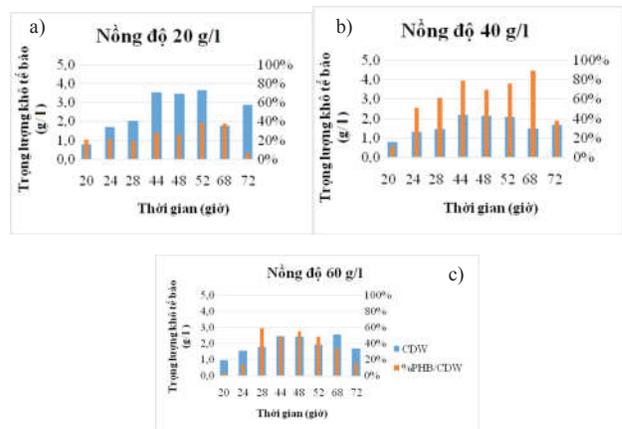
Dựa vào kết quả trên, chúng tôi tiến hành thu dịch huyền phù tại các thời điểm lần lượt như sau: chủng *A. eutrophus H16* vào giờ thứ 37 (1,5 OD₆₀₀ - 1,34 ×

10⁷ CFU/ml), chủng *Bacillus sp. strain H37* vào giờ thứ 29 (1,4 OD₆₀₀ - 1,23 × 10⁷ CFU/ml), và chủng *E. cloacae strain H62* giờ thứ 39 (1,4 OD₆₀₀ - 1,24 × 10⁷ CFU/ml), chủng *P. stutzeri strain H6* vào giờ thứ 33 (1,1 OD₆₀₀ - 0,10 × 10⁷ CFU/ml). Tuy mật độ tế bào ở pha cân bằng thứ 2 đa số đều cao hơn so với lần thứ nhất nhưng tại thời điểm đó, trong môi trường nuôi cấy tồn tại nhiều xác tế bào chết cũng như các sản phẩm của quá trình phân rã của tế bào. Vì thế, việc lấy dịch huyền phù tại thời điểm này sẽ gây ảnh hưởng đến quá trình lên men.

Ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường lên sự sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của 3 chủng VK phân lập

Dịch huyền phù tế bào của từng chủng VK chứa mật độ tế bào cao nhất sẽ được sử dụng để nuôi cấy lên men mẻ hiếu khí không bổ sung cơ chất. Nồng độ rỉ đường sử dụng khảo sát lần lượt là 20, 40 và 60 g/l. Mẫu được lấy tại 8 thời điểm: 20, 24, 28, 44, 48, 52, 68 và 72 giờ sau nuôi cấy. Biểu đồ được phân tích dựa trên 2 dữ liệu là CDW và hàm lượng PHB trong tế bào.

Khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *A. eutrophus H16*:

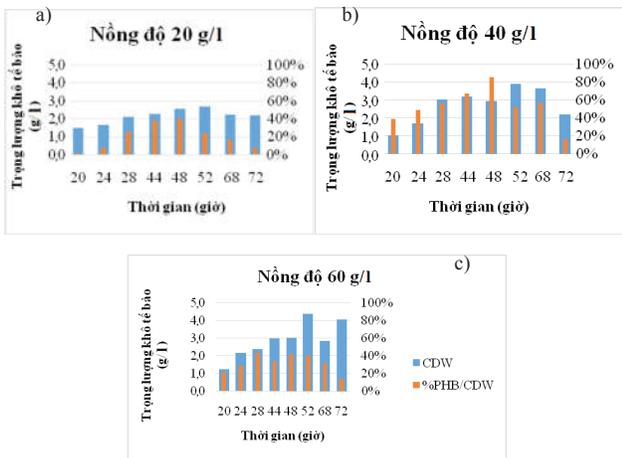


Hình 2: các biểu đồ kết quả CDW và %PHB của chủng VK *A. eutrophus H16*

Hình 2 cho thấy, nồng độ 20 g/l, rỉ đường tác động mạnh mẽ đến khả năng sinh trưởng của VK *A. eutrophus H16*. Giai đoạn đầu, sự tổng hợp các chất dinh dưỡng cho quá trình tăng sinh diễn ra mạnh mẽ khiến CDW tăng lên nhanh chóng, đạt 3,63 g/l sau 52 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, hàm lượng PHB được tổng hợp trong tế bào chỉ nằm vào khoảng 20-30%, cao nhất là 39% vào giờ thứ 52 và duy trì ở mức độ này đến giờ thứ 68. Sau đó, hàm lượng PHB giảm mạnh (chỉ còn 7%) trong khi CDW tăng lên gần 1/3 (giờ thứ 72).

Điều này cho thấy VK đã phân giải PHB để sử dụng vì chất dinh dưỡng sẵn có trong môi trường đã cạn kiệt. Khi nồng độ rỉ đường tăng lên 40 g/l, khả năng sinh tổng hợp PHB của chủng VK *A. eutrophus* H16 tăng lên một cách rõ rệt. Hàm lượng PHB tăng nhanh sau 20 giờ nuôi cấy và đạt giá trị cực đại ở giờ thứ 68 (chiếm 89% CDW). Nồng độ rỉ đường là 60 g/l, khả năng tổng hợp PHB giảm xuống đáng kể so với nghiệm thức 40 g/l rỉ đường. Hàm lượng PHB cao nhất đạt được chỉ vào khoảng 60% (giờ thứ 28). CDW cũng thấp hơn hẳn so với nghiệm thức sử dụng rỉ đường có nồng độ 20 g/l.

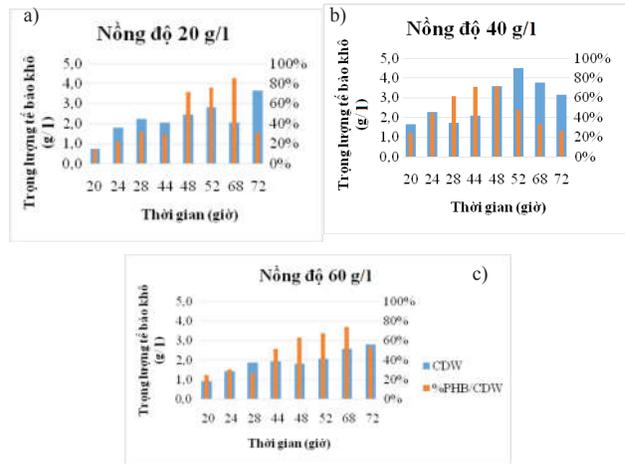
Khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *Bacillus sp. strain H37*:



Hình 3: các biểu đồ kết quả CDW và % PHB của chủng VK *Bacillus sp. strain H37*

Hình 3 cho thấy, tế bào VK *Bacillus sp. strain H37* tăng sinh nhanh hơn khi được nuôi cấy lên men trong môi trường có nồng độ rỉ đường cao. Tuy nhiên, khả năng sinh tổng hợp PHB đạt hiệu quả tối ưu ở nồng độ 40 g/l, vượt quá ngưỡng này, khả năng đó sẽ bị ức chế làm cho hàm lượng PHB có trong tế bào đạt tối đa ở mức 44% (giờ thứ 28). Điều này cho thấy, nồng độ rỉ đường càng cao thì càng kích thích sự sinh trưởng của *Bacillus sp. strain H37*. Vào khoảng 68 giờ sau nuôi cấy, hàm lượng này giảm còn 8% do tế bào VK đã phân hủy PHB làm nguồn dinh dưỡng. Biểu đồ (hình 3C) cũng cho thấy khả năng tích lũy PHB của chủng *Bacillus sp. strain H37* ở nồng độ rỉ đường 40 g/l tốt hơn so với 2 nồng độ còn lại. Hàm lượng PHB luôn đạt giá trị xấp xỉ 50% trong suốt khoảng thời gian từ 28 đến 44 giờ nuôi cấy và đạt giá trị cao nhất tại giờ thứ 48 (85%).

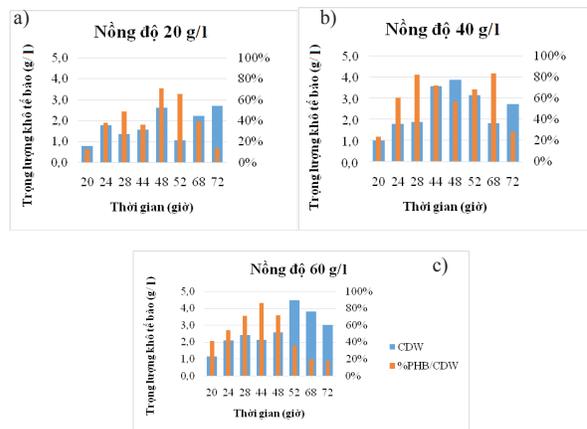
Khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng VK *E. cloacae strain H62*:



Hình 4: các biểu đồ kết quả CDW và % PHB của chủng VK *E. cloacae strain H62*

Hình 4 cho thấy, trong những giờ đầu nuôi cấy, khả năng sinh trưởng của chủng VK *E. cloacae strain H62* không bị ảnh hưởng nhiều bởi nồng độ rỉ đường nhưng hàm lượng PHB trong sinh khối thì bị ảnh hưởng một cách rõ rệt. Nồng độ 40 g/l cho thấy khả năng tích lũy PHB của tế bào VK tăng nhanh, đều trong suốt 44 giờ đầu nuôi cấy, duy trì cho đến giờ thứ 48 và giảm dần đến giờ thứ 72. Trong khi đó, ở nồng độ 20 g/l, đến giờ thứ 48 thì tế bào mới bắt đầu bước vào giai đoạn tích lũy PHB mạnh mẽ.

Khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng VK *P. stutzeri strain H6*:



Hình 5: các biểu đồ kết quả CDW và % PHB của chủng vi khuẩn *P. stutzeri strain H6*

Nhìn chung, chủng VK *P. stutzeri strain H6* sinh trưởng tốt trong môi trường có rỉ đường cao (hình 5). Sinh khối tế bào ở nồng độ 60 g/l đạt 4,47 g/l vào thời điểm 52 giờ sau nuôi cấy, trong khi ở nồng độ 20 g/l

chỉ đạt 2,6 g/l. Dựa vào hàm lượng PHB tích lũy cũng có thể thấy tốc độ tăng sinh của tế bào đạt được là nhờ vào khả năng tích lũy và phân giải PHB mạnh mẽ của chủng VK này khi môi trường có nguồn C dồi dào. Ở 2 nồng độ 40 và 60 g/l, sau 28 giờ nuôi cấy hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào đạt được lần lượt là 82 và 71%. Đặc biệt, ở nồng độ 40 g/l, bên cạnh khả năng tích lũy PHB, khả năng sinh trưởng của chủng *P. stutzeri* strain H6 cũng vượt trội hơn so với 2 nồng độ còn lại. Khoảng giờ thứ 44 đến 52, sinh khối tế bào duy trì ở khoảng 3,52 g/l. Trong khi đó, ở nồng độ 60 g/l, trọng lượng khô tế bào tăng gấp đôi từ giờ thứ 48 đến giờ thứ 52 nhưng hàm lượng PHB lại giảm gần 1/2.

Với kết quả trên, chúng tôi nhận thấy thời điểm thu sinh khối vào khoảng giờ thứ 44 đến 48 sẽ cho năng suất tổng hợp PHB cao nhất đối với tất cả các chủng VK được nghiên cứu; CDW và hàm lượng PHB của mỗi chủng VK ở các nồng độ rỉ đường được so sánh dựa trên số liệu thống kê ở bảng 1.

Bảng 1: so sánh CDW và hàm lượng PHB của các chủng VK các nồng độ rỉ đường

Chủng VK	CDW (g/l)			PHB/CDW (%)		
	A	B	C	A	B	C
<i>A. eutrophus</i> H16	3,63	2,20	2,43	38,53	78,79	54,79
<i>Bacillus</i> sp. strain H37	2,57	2,93	4,36	40,26	85,23	40,46
<i>E. cloacae</i> strain H62	2,57	2,80	3,57	74,03	76,19	71,86
<i>P. stutzeri</i> strain H6	2,60	3,57	2,13	70,51	71,96	86,41

A: rỉ đường nồng độ 20 g/l; B: 40 g/l; C: 60 g/l

Đối với chủng VK *A. eutrophus* H16, nồng độ rỉ đường là 40 g/l cho kết quả thu sinh khối tuy không cao nhưng khối lượng PHB tổng hợp được là cao nhất (chiếm 78,79% CDW). Đối với chủng VK *Bacillus* sp. strain H37, nồng độ rỉ đường 40 g/l cho năng suất cao nhất với hàm lượng 85,23% CDW sau 48 giờ nuôi cấy. Đối với chủng VK *E. cloacae* strain H62, khả năng sinh trưởng cơ chất rỉ đường tỷ lệ thuận với nồng độ rỉ đường. Sinh khối đạt được cao nhất ở nồng độ 60 g/l. Bên cạnh đó, năng suất tổng hợp PHB ở nồng độ này cũng đạt giá trị cao nhất với 71,96%. Đối với chủng VK *P. stutzeri* strain H6, nồng độ rỉ đường cho kết quả tốt nhất tại thời điểm 44 giờ sau nuôi cấy cho hàm lượng PHB chiếm 71,96%.

Ngoài nhóm *Alcaligenes* thì *Bacillus* là nhóm được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất PHB. Wu Q và cs (2001) [8] đã phân lập VK *Bacillus* sp. JMa5 từ đất nhiễm rỉ đường dùng cho sản xuất PHB bằng mật rỉ mía. Chủng này sinh trưởng trong môi trường nhiệt độ tăng dần đến 47°C. Trong điều kiện nuôi cấy mẻ bổ sung, kết quả thu được ~70 g/l sinh khối khô và

tích lũy 25% PHB theo khối lượng. S. Chaijamrus và Udpuay N (2008) khảo sát chủng *Bacillus megaterium* ATCC 6748 cho thấy, nồng độ tích lũy PHB tối đa là 43% sinh khối khô trong môi trường 4% mật rỉ mía làm nguồn C và 4% CSL (Corn Steep Liquor) làm nguồn nitrogen [9]. Tuy nhiên, sinh khối khô chỉ đạt 5 g/l. Nghiên cứu khác về *B. megaterium* BA-019 ghi nhận năng suất đạt 1,27 g/l và tỷ lệ PHB là 42% trong tổng sinh khối khô là 72,6 g.

Nhóm *Pseudomonas* mặc dù được sử dụng nhiều trong sản xuất PHB nhưng rất ít công trình đề cập đến việc sử dụng mật rỉ đường cho *Pseudomonas* lên men tạo PHB. Mặc dù vậy, A.D. Tripathi và cs (2012) cho thấy, khi nuôi cấy mẻ *P. aeruginosa* trên môi trường có bổ sung 0,8 và 4% urea sẽ cho sinh khối tích lũy cao nhất ở mức xấp xỉ 7,32 g/l và PHB thu được khoảng 5,6 g/l [10]. Ngược lại với các nhóm VK trên, nhóm *Enterobacter* ít được chú ý trong sản xuất PHB. A.V. Samrot và cs (2010) lần đầu tiên báo cáo việc đánh giá chủng *E. cloacae* SU-1 sản xuất PHA trên môi trường có glucose là nguồn C [11]. Tuy nhiên, chỉ có báo cáo của N. Naheed và cs (2012) về việc sử dụng rỉ đường làm nguồn cơ chất cho hai chủng *Enterobacter* sp. SEL2 và *Enterobacteriaceae bacterium* PFW1 lên men sinh tổng hợp PHB [12]. Kết quả cho thấy, 2 chủng *Enterobacter* sp. SEL2 và *Enterobacteriaceae bacterium* PFW1 lần lượt có PHB tích lũy ở mức $57,61 \pm 0,57\%$ và $58,07 \pm 0,25\%$ trong điều kiện pH = 7,0, nhiệt độ nuôi 37°C và lắc ở 150 vòng/phút. Thời gian tối ưu cho chủng SEL2 là 24 tới 48 giờ, còn ở chủng PFW1 là 48 tới 72 giờ. Môi trường thích hợp cho 2 chủng này là môi trường khoáng có bổ sung rỉ đường tối ưu là 2 và 0,2% ammonium sulphate.

Các kết quả của chúng tôi trong nghiên cứu này tương thích với các nghiên cứu của thế giới, điều này tạo đà cho việc sử dụng nguồn rỉ đường làm cơ chất chính cho việc nuôi cấy VSV có khả năng sản xuất PHB trong tương lai.

Kết luận

Từ các VSV được phân lập, sàng lọc và định danh trong các mẫu nước thải tại khu vực TP Hồ Chí Minh, chúng tôi tuyển chọn 3 chủng VK là *P. stutzeri* strain H6, *E. cloacae* strain H62 và *Bacillus* sp. H37 để xem xét mức độ tăng trưởng và tích lũy PHB trong môi trường có chứa rỉ đường. *A. eutrophus* H16 được sử dụng như VK hoang dại đối chứng. Chúng tôi nhận thấy, nồng độ rỉ đường được sử dụng làm nguồn C thay thế trong môi trường lên men có ảnh hưởng nhiều đến

khối lượng khô cũng như hàm lượng PHB mà VSV tổng hợp được: nồng độ 20 g/l ri đường có thể kích thích hầu hết các chủng VSV tổng hợp PHB nhưng với hàm lượng thấp và không ổn định; nồng độ 40 g/l ri đường kích thích mạnh mẽ khả năng tổng hợp PHB ở tất cả các chủng VSV và hàm lượng PHB tích lũy ổn định trong một khoảng thời gian dài; nồng độ 60 g/l ri đường ức chế khả năng tổng hợp PHB của các chủng VK, và ức chế cả về khả năng sinh trưởng đối với chủng *A. eutrophus* H16 và *E. cloacae* strain H62.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ cho đề tài độc lập cấp nhà nước “Nghiên cứu tạo màng polymer sinh học từ chủng vi khuẩn *E.coli* tái tổ hợp và bước đầu thử nghiệm làm giá đỡ nuôi cấy mô trong y dược” (mã số ĐTDL.2012.G/35) để thực hiện công trình này.

Tài liệu tham khảo

[1] 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), pp.4886-4893.

[2] E.Z. Gomaa (2014), “Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **57**(1), pp.145-154.

[3] Lê Lý Thùy Trâm, Bùi Văn Lê, Kiều Phương Nam (2006), “Thu nhận Poly- β -hydroxybutyrate, một loại nhựa sinh học dễ phân hủy từ VK *Methylobacterium* sp. phân lập tại Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Đại học Đà Nẵng, **1**(13), tr.47-52.

[4] Phạm Thanh Hà, Trần Đình Mẫn, Yutaka Tokiwa (2008), “Tạo đột biến nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp Poly- β -hydroxybutyrate

của VK *Alcaligenes latus* VNI”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **6**(4), tr.489-496.

[5] Huỳnh Văn Hiếu, Trần Hoàng Dũng, Chung Anh Dũng, Phạm Công Hoat (2016), “Định danh phân tử một số chủng VK có khả năng sinh tổng hợp PHB phân lập tại TP Hồ Chí Minh”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **5**(6), tr.54-58.

[6] Phạm Thị Thùy Trang (2012), *Nghiên cứu quá trình lên men axit gluconic từ ri đường bằng Aspergillus niger*, Luận văn thạc sỹ, Đại học Đà Nẵng.

[7] R.Z. Sayyed, N.S. Gangurde (2010), “Poly-hydroxybutyrate production by *Pseudomonas* sp. RZS 1 under aerobic and semi-aerobic condition”, *Indian Journal of Experimental Biology*, **48**(9), pp.942-947.

[8] 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**(2), pp.111-118.

[9] S. Chaijamrus, N. Udpuay (2008), “Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748”, *CIGR Journal*, **10**, pp.1-12.

[10] A.D. Tripathi, A. Yadav, A. Jha, S.K. Srivastava (2012), “Utilizing of Sugar Refinery Waste (Cane Molasses) for Production of Bio-Plastic Under Submerged Fermentation Process”, *Journal of Polymers and the Environment*, **20**(2), pp.446-453.

[11] A.V. Samrot, R.B. Avinesh, S.D. Sukeetha, P. Senthilkumar (2010), “Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 during growth with two different carbon sources in batch culture”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **163**(1), pp.195-203.

[12] N. Naheed, N. Jamil, S. Hasnain, G. Abbas (2012), “Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae* bacterium sp. PFW1 using sugar cane molasses as media”, *African Journal of Biotechnology*, **11**(16), pp.3321-3332.