

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NGUỒN CARBON VÀ NITROGEN KHÁC NHAU Ở MÔ HÌNH *IN VITRO* LÊN KHẢ NĂNG TỔNG HỢP NHỰA SINH HỌC POLY- β - HYDROXYBUTYRATE (PHB) CỦA DÒNG VI KHUẨN *Rhizobium gallicum* M40.1

Nguyễn Thành Luân*, Trần Mỹ Hiếu

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: luannt@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 19/6/2019; Ngày chấp nhận đăng: 05/9/2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát về ảnh hưởng của các nguồn carbon và nitrogen khác nhau ở mô hình *in vitro* lên khả năng tổng hợp PHB của loài vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 trong môi trường Yeast Extract Manitol Medium (YEMM) lỏng. Các nguồn carbon như mannitol, sucrose, mật rỉ và tinh bột là các nguồn carbon dùng để khảo sát. NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glycine, cao nấm men và TPY (tryptone: yeast extract: peptone với tỷ lệ 1:1:1) là các nguồn nitrogen được thử nghiệm. Vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 được sử dụng thử nghiệm trong điều kiện nghiên cứu *in vitro* với hàm lượng nhựa PHB được tổng hợp ở nghiệm thức bổ sung sucrose có kết quả cao hơn so với các nghiệm thức có chứa nguồn carbon khác tương ứng 0,127 g/L PHB. Hiệu suất tích lũy nhựa của vi khuẩn được đánh giá đạt 41,06% trong điều kiện nuôi cấy lỏng trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút, ở nhiệt độ thí nghiệm 30 °C trong 60 giờ tăng sinh. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitrogen khác nhau cho thấy các nghiệm thức bổ sung nguồn NH_4^+ khác nhau ở các nguồn NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glycine và hỗn hợp Trypton: Peptone: Yeast Extract (TPY) với NH_4Cl giúp sản sinh nhựa tốt nhất với $0,029 \pm 0,013$ g/L tương ứng 61,09%. Môi trường YESUM có bổ sung NH_4Cl ở nồng độ 1% đã giúp vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 tổng hợp PHB cao hơn gấp 3 lần so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung nitrogen với cùng nồng độ trong điều kiện lên men gián đoạn.

Từ khóa: Nhựa sinh học, nguồn carbon, nguồn nitrogen hữu cơ, PHB, *Rhizobium gallicum* M40.1.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, lượng rác thải nhựa tại Việt Nam được thải ra ngoài môi trường ngày càng nhiều, các giải pháp chôn lấp và đốt không hiệu quả càng làm ô nhiễm môi trường nghiêm trọng hơn, đồng thời làm gia tăng chi phí xử lý chất thải rắn [1]. Theo thống kê về tình hình xử lý chất thải của Sở Tài nguyên và Môi trường TP. Hồ Chí Minh, mỗi ngày thành phố phải chi tới 80% ngân sách tương đương gần 1,182 tỷ đồng/năm cho việc thu gom vận chuyển, xử lý chất thải rắn sinh hoạt [2]. Do đó, các nghiên cứu nhằm tạo ra các loại vật liệu mới có khả năng phân hủy sinh học, thân thiện với môi trường, thay thế các loại nhựa hóa dầu đang thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học từ nhiều nước trên thế giới. Nhựa sinh học poly- β -hydroxybutyrate (PHB) là một loại nhựa có tính ưu việt cao ngoài khả năng có thể được phân hủy sinh học thành CO_2 và H_2O trong thời gian ngắn, không sinh ra chất độc hại trong đó có chất độc dioxin khi được xử lý bằng phương pháp truyền thống. Thêm

vào đó, nhựa PHB còn có thể tổng hợp từ vi sinh vật do đó không phụ thuộc vào tăng giá do quá trình khan hiếm dầu mỏ [3].

Ngoài ra, nhựa PHB không những có nhiều ưu điểm hơn so với các loại nhựa sinh học thông thường như poly lactic acid (PLA), poly glycolic acid (PGA), dạng đồng trùng hợp poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), đây là những polymer được tổng hợp hóa học từ các đơn phân là vật liệu sinh học như lactic acid, glycolic acid [2], mà còn được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác, đặc biệt là y dược, công nghiệp và nông nghiệp. Tại Việt Nam, việc nghiên cứu và ứng dụng nhựa PHB vẫn còn hạn chế và chưa thu hút được sự quan tâm của nhiều người một phần là do giá thành sản phẩm cao và chưa có quy mô sản xuất công nghiệp. Ba yếu tố chính tác động đến giá thành sản xuất PHB gồm: loài vi sinh vật, cơ chất lên men và quy trình tách chiết [3, 4]. Số lượng loài vi sinh vật có khả năng tổng hợp loại nhựa này vẫn còn rất hạn chế, hiệu suất tạo nhựa của các loài vi sinh được công bố tương đối thấp. Một số kết quả nghiên cứu đã được công bố cho thấy việc thay đổi nồng độ thành phần cơ chất, nuôi cấy trong điều kiện giàu carbon, hạn chế nguồn nitrogen ở một số vi sinh như *Rhizobium etli* và *Pseudomonas stutzeri* cho sản lượng PHB đạt 3,6 g/L và 4,4 g/L, tương đương với 81,8% và 83,2% hiệu suất tổng hợp [5]. Dòng vi khuẩn *Ralstonia eutropha* giúp gia tăng 33% hàm lượng PHB [3]. Ngoài ra, việc kết hợp giữa bổ sung các nguồn carbon và nitrogen với điều chỉnh phương pháp lên men đã giúp cải thiện đáng kể hiệu suất sinh tổng hợp PHB ở loài *Methylobacterium* sp. và đạt 50,55% [6].

Để cải thiện hiệu quả sinh tổng hợp nhựa PHB, nhóm nghiên cứu đã tạo thành công loài đột biến *Rhizobium gallicum* M40.1 bằng tia UV có hiệu suất tổng hợp PHB đạt 56,97% PHB, cao hơn so với loài *Rhizobium gallicum* tự nhiên, không bị đột biến, được phân lập từ đất công nghiệp tại Bình Dương với hiệu suất đạt 39,84% PHB [2, 7]. Tuy nhiên, để tăng hiệu suất tổng hợp PHB của các dòng vi sinh vật, việc thay đổi các thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy là rất cần thiết và cần được nghiên cứu. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu thử nghiệm các nguồn carbon khác nhau với hiệu suất tích lũy tối ưu trong điều kiện nuôi cấy trong môi trường lỏng, lắc trên máy lắc và kết hợp khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitrogen khác nhau bổ sung trong bể nuôi tăng sinh vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 trong điều kiện tương tự nhằm đánh giá khả năng tổng hợp PHB với nồng độ khác nhau trong điều kiện lên men gián đoạn. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng khảo sát một số điều kiện lên men gián đoạn chính thức đẩy sự tích lũy nhựa sinh học PHB từ loài đột biến từ môi trường giàu carbon và kiểm soát nitrogen ở nồng độ khác nhau ở mô hình *in vitro* nhằm cải thiện hiệu suất tổng hợp nhựa sinh học PHB từ loài vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 phục vụ cho các công trình nghiên cứu sau này về ứng dụng và tổng hợp nhựa sinh học PHB tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Loài vi khuẩn đột biến bằng tia UV *Rhizobium gallicum* M40.1 sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ đất nông nghiệp trồng cây cao su gần khu công nghiệp chế biến tại các huyện thuộc tỉnh Bình Dương và có khả năng tổng hợp 56,97% PHB trong môi trường nuôi cấy lỏng YEMM từ kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thành Luân và cộng sự (2018) [7]. Khảo sát được thực hiện trên môi trường Yeast Extract Manitol Medium (YEMM: manitol 10 g/L, KH_2PO_4 0,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, NaCl 0,1 g/L, trypton, peptone và cao nấm men: 2,5 g/L cung cấp bởi SigmaAlrich - EMSURE® Premium) với các nguồn carbon khảo sát hiệu quả của việc gia tăng sinh khối tế bào vi khuẩn gồm manitol, sucrose, mật rỉ, tinh bột và nguồn nitrogen khảo sát sự tích lũy PHB với các nhóm đạm vô cơ và hữu cơ gồm

NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, glycine, cao nấm men, TPY (trypton, yeast extract, pepton pha theo với tỷ lệ 1:1:1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp định lượng

Phương pháp định lượng cơ bản dựa trên đánh giá sinh khối khô của vi khuẩn (g/L) qua quá trình tăng sinh thu nhận sinh khối tế bào vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 trong 1L dịch tăng sinh. Dựa trên quy trình tham khảo của Armager *et al.*, Mercan *et al.* và Bekele *et al.* ở môi trường YEMM lỏng, lắc với tốc độ 150 vòng/phút, nhiệt độ nuôi cấy 30 °C sau 60 giờ nuôi cấy. Sinh khối được thu nhận sau quá trình ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 15 phút thu nhận sinh khối. Sinh khối sau ly tâm được rửa sạch 2 lần với nước cất vô trùng và được sấy khô ở nhiệt độ 70 °C đến khi đạt khối lượng không đổi để xác định trọng lượng khô [8-10].

Sinh khối khô được cân 0,01g và nghiền thành bột mịn sau đó được bổ sung 0,5 mL NaOCl kết hợp vortex mạnh để sinh khối khô tan đều. Hàm lượng PHB (g/L) được chọn lựa sau quá trình biến tính tế bào bằng hỗn hợp NaOCl: Chloroform theo tỷ lệ 1:1 và được ủ ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ kết hợp ly tâm ở 5500 vòng/phút trong thời gian 15 phút, thu cặn nhiều lần nhằm thu nhận lượng sinh khối tối ưu nhất. Lượng PHB thu nhận được qua quá trình thủy phân bằng H₂SO₄ đậm đặc thu nhận dịch hòa tan và được xác định bằng phương pháp mật độ quang với độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm (A_{235nm}) để đánh giá nguồn carbon và nitrogen tác động lên khả năng sinh tổng hợp PHB cao nhất từ vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 [8, 9]. Hiệu suất PHB được đánh giá thông qua lượng PHB thu nhận được và so sánh với sinh khối khô ban đầu để đánh giá hiệu suất thu nhận thực tế, kết hợp đối chiếu với các nghiên cứu khác làm phương pháp chung hiệu chuẩn để đánh giá hiệu suất thu hồi PHB của vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1. Khi dịch thủy phân đo được lớn hơn 1, tiến hành pha loãng với H₂SO₄ đậm đặc theo hệ số 10 để chọn lựa ra nguồn carbon vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 tổng hợp PHB cao nhất dựa trên đường chuẩn $y = 1,1831x - 0,0116$ với $R^2 = 0,9987$.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon hữu cơ khác nhau đến khả năng tổng hợp PHB của dòng vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1

Vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 được khảo sát nuôi cấy với nguồn carbon bổ sung khác nhau dựa trên nghiên cứu của Amarger *et al.* (1997) và nghiên cứu của Bekele *et al.* (2013) cập nhật trong con đường chuyển hóa và tổng hợp PHB với kết quả đường chuẩn thu nhận PHB dựa trên đường chuẩn với $y = 1,1831x - 0,0116$, $R^2 = 0,9987$ [8, 9]. Kết quả được chọn lọc dựa trên nguồn carbon thích hợp cho chủng vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 từ các nguồn carbon như sucrose (YESUM), mật rỉ đường (YEMOM), tinh bột (YESM), glucose (YEGLUM), manitol (YEMM) với nghiệm thức không bổ sung carbon (ĐC).

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitrogen đến việc tổng hợp PHB

Loài vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium* sp. được biết đến như là loài có khả năng cố định nitrogen trong không khí nhờ hệ thống enzyme nitrogenase, giúp chuyển hóa N₂ thành NH₃. Quá trình tổng hợp nhựa thu nhận PHB trong điều kiện hạn chế nguồn nitrogen khi loài vi khuẩn này sử dụng hết nguồn nitơ tổng hợp từ hữu cơ và phải chuyển hóa từ nguồn vô cơ khác nhau. Việc khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen dựa trên các nhóm nitrogen vô cơ gồm NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, và nhóm nitrogen hữu cơ gồm glycine (Sigma Aldrich), TPY (trypton: pepton: yeast extract theo tỷ lệ 1:1:1) và cao nấm men nhằm đánh giá hiệu quả của cơ chất ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy tổng hợp PHB. Vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 được nuôi cấy và tăng sinh trong môi trường chọn lọc ở thí nghiệm khảo sát carbon

kết hợp với nguồn nitrogen nồng độ 1% (w/v): NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glycine, cao nấm men và hỗn hợp trypton: pepton: yeast extract theo tỷ lệ 1:1:1 (TPY) theo tỷ lệ khối lượng so với thể tích. Từ đó chọn ra nguồn nitrogen tốt nhất cho vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 tổng hợp PHB cao nhất trong các nguồn khảo sát dựa trên quy trình và phương pháp của nghiên cứu thu nhận PHB của Mercan *et al.* (2002) [10].

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ NH_4Cl bổ sung đến quá trình tổng hợp PHB

Việc tiến hành so sánh các phương pháp lên men có ảnh hưởng đến đánh giá sự gia tăng khả năng sinh tổng hợp PHB. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy, hàm lượng PHB được ghi nhận sự gia tăng trong điều kiện nuôi cấy giàu carbon và hạn chế nguồn nitrogen. Trong giai đoạn đầu tiên, tế bào sẽ phát triển đến nồng độ mong muốn, môi trường chưa có sự giới hạn về mặt dinh dưỡng nên tế bào sẽ hoàn toàn không tích lũy PHB. Ở giai đoạn tiếp theo, một hay một số chất dinh dưỡng thiết yếu trong môi trường bị giới hạn, tạo điều kiện cho quá trình tổng hợp PHB diễn ra. Trong giai đoạn tích lũy, nếu bổ sung nguồn cơ chất với nồng độ thích hợp sẽ thúc đẩy tích lũy nhiều PHB. Vì vậy, việc chọn phương pháp lên men gián đoạn bổ sung cơ chất có thể tác động đến hàm lượng PHB. Thí nghiệm được khảo sát với nguồn carbon tốt nhất bổ sung nitrogen theo nồng độ khác nhau được chọn lựa ở các thí nghiệm trước đó để kết hợp nuôi cấy nhằm gia tăng sinh khối tế bào vi khuẩn và hàm lượng PHB. Hàm lượng nitrogen được khảo sát theo các nồng độ 0,5; 1; 1,5 và 2% để đánh giá hiệu quả của việc bổ sung cơ chất theo từng giai đoạn có hiệu quả đến việc tích lũy PHB.

2.2.5. Xử lý số liệu, bố trí thí nghiệm và đánh giá kết quả

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI theo thực nghiệm phân hạng Duncan để so sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học ($P\text{-value} < 0,05$). Kết quả dựa trên các chỉ tiêu sinh khối khô của vi khuẩn, hàm lượng PHB và hiệu suất PHB thu hồi được là cơ sở để đánh giá hiệu quả của nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon hữu cơ khác nhau đến khả năng tổng hợp PHB của dòng vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1

Nguồn carbon chiếm tỷ lệ trên 50% vật chất khô của vi sinh vật do đó chúng có vai trò đặc biệt quan trọng trong việc ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của tế bào vi sinh vật. Sau khi nuôi cấy loài *Rhizobium gallicum* M40.1 trong môi trường YEM với các nguồn carbon hữu cơ khác nhau, kết quả cho thấy các nguồn carbon hữu cơ có ảnh hưởng tới sinh khối và hiệu suất tích lũy PHB của loài vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 (Bảng 1). Sinh khối vi khuẩn được tổng hợp cao ở hầu hết các nghiệm thức chứa các nguồn carbon hữu cơ khác nhau, dao động từ 0,043 g/L đến 0,377 g/L, ngoại trừ nghiệm thức bổ sung mật rỉ đường, với hàm lượng sinh khối khô đạt 0,043 g/L và thấp hơn cả nghiệm thức đối chứng không bổ sung carbon hữu cơ. Ở các nghiệm thức chứa nguồn carbon hữu cơ gồm glucose và manitol cho sinh khối vi khuẩn cao nhất, tương ứng với 0,377 g/L và 0,373 g/L. Môi trường sử dụng sucrose và manitol đều cho hàm lượng nhựa cao nhất tương ứng với 0,127 g/L và 0,126 g/L. Tuy nhiên, ở môi trường đường sucrose cho năng suất tích lũy cao nhất (41,06%) so với kết quả nghiên cứu tối ưu hóa tổng hợp PHB của Lakshmi *et al.* (2008) ở *Rhizobium* sp., nguồn carbon tối ưu được chọn là glucose chỉ cho năng suất 8% PHB/trọng lượng khô tế bào, loài *Rhizobium gallicum* M40.1 được nuôi cấy trong môi trường sử dụng nguồn carbon là sucrose có năng suất cao hơn hẳn (41,06%) [11]. Tuy nhiên, so với nghiên cứu

của Belal *et al.* (2013) trên loài *Rhizobium elti* E1, PHB được tích lũy cao nhất trong môi trường sử dụng nguồn carbon là manitol với năng suất 60,4% tương đương với 1,9 g/L PHB [5] và loài *Pseudomonas stutzeri* E114 có nguồn carbon tối ưu là sucrose với năng suất tích lũy đến 61,8% tương ứng với 3,40 g/L PHB thì loài *Rhizobium gallicum* M40.1 có năng suất và lượng nhựa tạo thành còn tương đối thấp [10].

Bảng 1. Ảnh hưởng của các nguồn carbon hữu cơ đến khả năng tổng hợp PHB của vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1

Nguồn carbon	Sinh khối khô của vi khuẩn (g/L)	Hàm lượng PHB (g/L)	Hiệu suất PHB (%)
Sucrose (YESUM)	0,310 ± 0,061 ^b	0,127 ± 0,029 ^a	41,060 ± 3,071 ^a
Glucose (YEGLUM)	0,377 ± 0,018 ^a	0,122 ± 0,012 ^{ab}	32,420 ± 1,289 ^b
Tinh bột (YESM)	0,243 ± 0,021 ^c	0,075 ± 0,006 ^c	31,020 ± 0,387 ^b
Mật ri đường (YEMOM)	0,043 ± 0,021 ^d	0,006 ± 0,002 ^d	12,937 ± 0,448 ^d
Manitol (YEMM)	0,373 ± 0,025 ^a	0,126 ± 0,011 ^a	33,763 ± 0,806 ^b
Không bổ sung carbon (ĐC)	0,269 ± 0,012 ^a	0,097 ± 0,020 ^{bc}	25,45 ± 6,086 ^c

Chú thích: ĐC: môi trường không có nguồn carbon. ^{a,b,c,d}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitrogen đến việc tổng hợp PHB

Loài vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 có khả năng tự tổng hợp nguồn nitrogen nên khả năng sử dụng nguồn nitrogen được đánh giá khác nhau ở khả năng hấp thu và chuyển hóa, tăng sinh tế bào trong môi trường có chứa các nguồn nitrogen khác nhau. Kết quả cho thấy nguồn nitrogen bổ sung khác nhau có thể ảnh hưởng đến việc tổng hợp PHB của loài vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 (Bảng 2). Trong môi trường chứa nguồn nitrogen hữu cơ cao như cao nấm men (YEAST) và hỗn hợp cơ chất TPY giúp vi khuẩn phát triển tốt, hàm lượng sinh khối cao tương ứng là 0,509 ± 0,017 g/L và 0,341 ± 0,002 g/L với lượng hàm nhựa PHB tạo ra nhiều. Đặc biệt, nguồn nitrogen ở cao nấm men (YEAST) cho khối lượng sinh khối khô cao nhất đạt 0,509 ± 0,017 g/L với hàm lượng nhựa PHB tương ứng đạt 0,075 ± 0,008 g/L. Tuy nhiên, hiệu suất tích lũy PHB từ vi khuẩn trên môi trường này tương đối thấp, chỉ chiếm 14,63 ± 1,134% hàm lượng PHB thu nhận được. Ngược lại, trong môi trường không bổ sung nitrogen và môi trường sử dụng nguồn nitrogen vô cơ (NH₄Cl và (NH₄)₂SO₄), hàm lượng sinh khối khô của vi khuẩn ít tương ứng 0,049 ± 0,009 g/L và 0,051 ± 0,002 g/L cũng như hàm lượng nhựa PHB tạo thành thấp tương ứng 0,029 ± 0,013 g/L và 0,023 ± 0,006 g/L. Tuy nhiên, hiệu suất tích lũy PHB của nhóm môi trường giàu NH₄⁺ cho kết quả thu hồi nhựa PHB cao nhất so với các nguồn nitrogen được sử dụng trong khảo sát tương ứng là 61,09 ± 19,401% và 46,36 ± 12,766%. Việc sử dụng NH₄Cl cho năng suất tích lũy PHB cao nhất với hiệu suất thu hồi đạt 61,09% PHB. Do đó, đậm NH₄⁺ với nồng độ 1% giúp ức chế sự phát triển của vi khuẩn và tăng cường sự tích lũy PHB theo thời gian. Cao nấm men được lựa chọn là nguồn nitrogen cho việc khảo sát gia tăng sinh khối vi khuẩn và môi trường giàu NH₄⁺ giúp gia tăng sự tích lũy PHB. Điều này có thể khẳng định, nguồn nitrogen hữu cơ cao kích thích sự tăng sinh tế bào và sự bổ sung nitrogen vô cơ ở giai đoạn sau sẽ giúp gia tăng hàm lượng PHB khi nuôi cấy như các nghiên cứu của Lakshmi *et al.* và Bekele *et al.* [9, 11].

Bảng 2. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến việc tổng hợp PHB của vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1

Nguồn nitrogen	Sinh khối khô của vi khuẩn (g/L)	Hàm lượng PHB (g/L)	Hiệu suất PHB (%)
NH ₄ Cl	0,049 ± 0,009 ^d	0,029 ± 0,013 ^b	61,09 ± 19,401 ^a
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,051 ± 0,002 ^d	0,023 ± 0,006 ^b	46,36 ± 12,766 ^{bc}
Cao nấm men YEAST)	0,509 ± 0,017 ^a	0,075 ± 0,008 ^a	14,63 ± 1,134 ^d
Trypton: pepton: yeast extract (TPY)	0,341 ± 0,002 ^b	0,061 ± 0,002 ^a	17,73 ± 0,685 ^d
Không bổ sung nitrogen (ĐC)	0,148 ± 0,036 ^c	0,029 ± 0,010 ^b	19,64 ± 1,179 ^d

Chú thích: ĐC: môi trường không có nguồn nitrogen. ^{a,b,c,...}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P < 0,05).

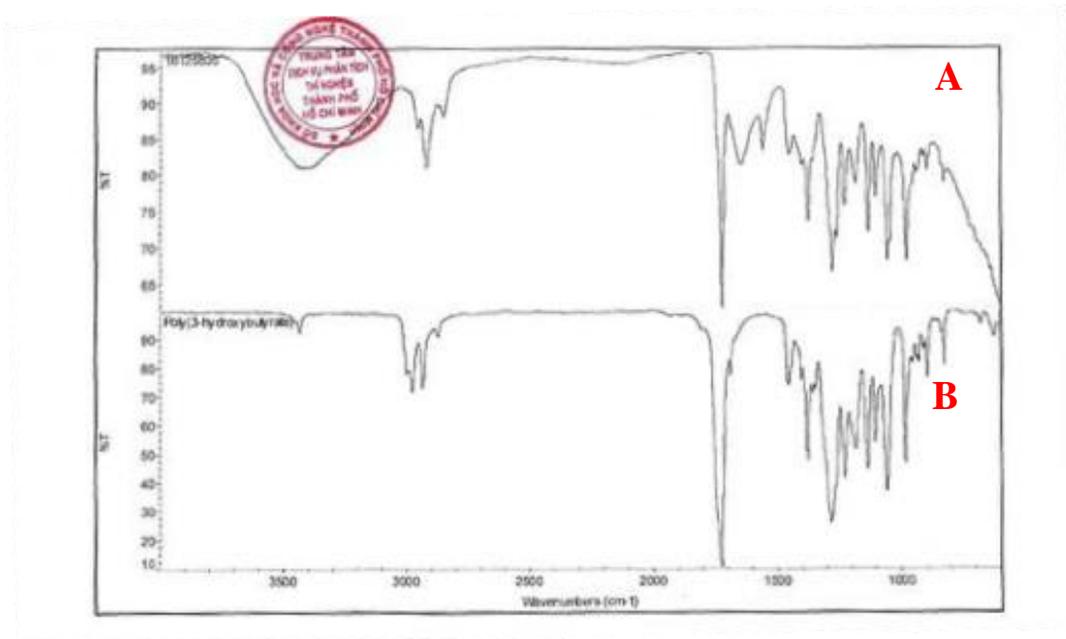
3.3. Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ NH₄Cl bổ sung đến quá trình tổng hợp PHB

Để so sánh ảnh hưởng của 2 phương pháp lên men đến quá trình tổng hợp PHB, nguồn nitrogen là NH₄Cl được sử dụng với năng suất tích lũy nhựa cao nhất là 61,09% sẽ được kết hợp với cao nấm men thông qua phương pháp lên men gián đoạn bổ sung cơ chất với các nồng độ bổ sung khác nhau (Bảng 3). Việc nuôi cấy lên men vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 trong môi trường thử nghiệm YEMM bổ sung sucrose (YESUM) kết hợp với bổ sung NH₄Cl cho hàm lượng nhựa tạo thành và năng suất tích lũy PHB cao hơn nhóm đối chứng không bổ sung. Ở môi trường thử nghiệm YEMM bổ sung sucrose (YESUM) kết hợp NH₄Cl nồng độ 1-2% cho thấy bắt đầu có sự ức chế sinh trưởng ở vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 với sinh khối khô của vi khuẩn giảm từ 2,437 ± 0,287 g/L xuống 1,772 ± 0,010g/L. Việc bổ sung nồng độ nitrogen vô cơ NH₄⁺ làm tăng việc ức chế sự gia tăng sinh khối vi khuẩn. Việc gia tăng này kéo theo sự gia tăng hàm lượng PHB cũng như việc tạo thành PHB thấp khi bổ sung môi trường NH₄Cl ở nồng độ 2% với lượng sinh khối thấp nhất 1,772 ± 0,010 g/L như trong các nghiên cứu của Mercan *et al* và Lakshmi *et al* đã tiến hành và khẳng định. Tuy nhiên, môi trường YEMM kết hợp nồng độ NH₄Cl bổ sung 1% cho hàm lượng nhựa tạo thành cao nhất 1,234 ± 0,017 g/L và hiệu suất tích lũy PHB đạt 52,81 ± 3,188%, giúp cải thiện gấp 3 lần so với môi trường YEMM đơn lẻ ban đầu có hiệu suất tạo nhựa PHB là 15,63 ± 0,404% (Bảng 3). Vì vậy, môi trường thử nghiệm YEMM bổ sung sucrose (YESUM) kết hợp NH₄Cl nồng độ 1% có thể gây ức chế sự phát triển về mật độ và giảm hàm lượng PHB so với môi trường chỉ bổ sung 0,5% NH₄Cl. Như vậy, việc gia tăng hiệu suất tích lũy PHB của vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 được đánh giá đạt hiệu quả khi có sự tham gia của cơ chất carbon có bổ sung nitrogen vô cơ, trong khi nghiên cứu của Mercan *et al.* (2002) đã khẳng định các cơ chất nitrogen vô cơ có hiệu quả kích hoạt khả năng sinh tổng hợp nhựa PHB hơn so với nitrogen hữu cơ [10]. Kết quả cơ bản được khẳng định với sản phẩm thu nhận được đánh giá sau khi tách chiết và thu nhựa từ sinh khối chủng *Rhizobium gallicum* M40.1, sản phẩm được kiểm tra bằng phổ hồng ngoại FITR và khẳng định có nhóm chức này khá tương đồng ở các phổ so sánh với PHB thương mại được sử dụng trong kiểm định ở Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm Tp. Hồ Chí Minh (Hình 1).

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường YEMM bổ sung đường sucrose (YESUM) với nồng độ NH₄Cl khác nhau đến khả năng tổng hợp PHB của vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1

Nồng độ NH ₄ Cl bổ sung (% w/v)	Sinh khối khô của vi khuẩn (g/L)	Hàm lượng PHB (g/L)	Hiệu suất PHB (%)
0,5	2,989 ± 0,151 ^a	1,403 ± 0,020 ^b	34,95 ± 1,389 ^b
1	2,437 ± 0,287 ^{bc}	1,234 ± 0,017 ^a	52,81 ± 3,188 ^a
1.5	2,147 ± 0,074 ^c	0,585 ± 0,034 ^c	27,26 ± 0,168 ^c
2	1,772 ± 0,010 ^d	0,589 ± 0,017 ^c	33,60 ± 1,783 ^b
ĐC	2,607 ± 0,462 ^b	0,407 ± 0,327 ^d	15,63 ± 0,404 ^d

Chú thích: ĐC: môi trường không bổ sung NH₄Cl. ^{a,b,c,...}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P < 0,05).



Hình 1. Kết quả so sánh cấu trúc PHB của *R.gallicum* M40.1 với PHB thương phẩm bằng phương pháp FTIR tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP.Hồ Chí Minh. (A. Cấu trúc nhựa PHB của vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1; B. Cấu trúc nhựa PHB thương phẩm)

4. KẾT LUẬN

Nguồn carbon hữu cơ và nitrogen bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp nhựa PHB của loài vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1. Môi trường nuôi cấy có nguồn carbon với đường sucrose (YESUM) và manitol (YEMM) được đánh giá là nguồn carbon mà loài vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 sử dụng tốt nhất để tổng hợp nhựa và hàm lượng nhựa tạo ra là cao nhất tương ứng là 0,127 g/L và 0,126 g/L. Việc kết hợp môi trường giàu đường sucrose (YESUM) với phương pháp lên men gián đoạn có bổ sung cơ chất là NH₄Cl ở nồng độ 1% cho năng suất tích lũy nhựa cải thiện gấp 3 lần so với môi trường chỉ sử dụng cao nấm men nồng độ 1% với kết quả hiệu suất thu hồi PHB đạt

52,81% so với không bổ sung là 15,63% ở nghiệm thức đối chứng. Do đó, việc bổ sung đường sucrose với cao nấm men được xem là cơ chất tiềm năng mang lại nhiều triển vọng cho các nghiên cứu nâng cao hiệu suất thu nhận PHB và đóng góp vào việc tổng hợp PHB công nghiệp trong tương lai. NH_4Cl ở nồng độ 0,5% tạo được hàm lượng PHB cao nhất với $1,403 \pm 0,020$ g/L. NH_4Cl 1% được xem là nồng độ lý tưởng trong việc cảm ứng, ức chế khả năng tăng sinh tế bào vi khuẩn và gia tăng hiệu suất tạo nhựa PHB qua quá trình đánh giá bổ sung chất hữu cơ. Việc đánh giá khả năng tổng hợp PHB chưa được đánh giá về khả năng tiết các enzyme nội bào và ngoại bào cũng như công nghệ gen và tế bào có thể tác động đến khả năng tổng hợp cao hơn PHB cần được nghiên cứu trong tương lai. Do đó, những nghiên cứu để làm rõ tiềm năng của PHB cần được tiến hành ở các thử nghiệm lớn hơn ở mô hình pilot hoặc *ex vitro* hoặc chuyên sâu hơn ở từng ứng dụng tế bào và công nghệ tái tổ hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Tử An - Hóa phân tích Tập 2, NXB Y học, Hà Nội (2007) 322 tr.
2. Nguyễn Thành Luân, Nguyễn Minh Chánh, Nguyễn Thị Liên Thương, Nguyễn Thị Quỳnh Mai - Phân lập và định danh các loài vi khuẩn có khả năng tổng hợp poly- β -hydroxybutyrate (PHB) từ đất và thực vật tại tỉnh Bình Dương, Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh **14** (1) (2018) 12-19.
3. Bozorg A., Vossoughi M., Kazemi A., Alemzadeh I. - Optimal medium composition to enhance poly- β -hydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* using cane molasses as sole carbon source, Applied Food Biotechnology **2** (3) (2015) 39-47.
4. Madison L.L., Huisman G.W. - Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, Microbiol Mol Biol Rev. **63** (1) (1999) 21-53.
5. Belal E.B. - Production of Poly- β -Hydroxybutyric Acid (PHB) by *Rhizobium elti* and *Pseudomonas stutzeri*. Current Research Journal of Biological Sciences **5** (6) (2013) 273 -284.
6. Seon Won Kim, Pil Kim, Hyun S. Lee, Jung H. Kim - High production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation, Biotechnol Lett **18** (1) (1996) 25-30.
7. Nguyễn Thành Luân, Trần Mỹ Hiếu, Lương Thị Hiếu - Khảo sát tạo đột biến nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp nhựa sinh học poly- β -hydroxybutyrate (PHB) của vi khuẩn *Rhizobium gallicum* bằng tia UV, Đồ án chuyên ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh. Tp. Hồ Chí Minh (2018).
8. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. - *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules, International Journal of Systematic Bacteriology **47** (4) (1997) 996-1006.
9. Bekele H., Dechassa N., Argaw A. - Effects of different carbon and nitrogen sources in Broth culture on the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli and symbiotic effectiveness of haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Eastern Hararghe soils of Ethiopia, African Journal of Microbiology Research **7** (29) (2013) 3754-3761.
10. Mercan N., Aslim B., Yuksekdog Z.N., Beyatli B. - Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by some *Rhizobium* bacteria, Turk J Biol **22** (2002) 215-219.
11. Lakshmi R.S., Hema T.A., Divya T. Raj, Starin Shylaja T. - Production and optimization of polyhydroxybutyrate from *Rhizobium* sp. present in root nodules, IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences **3** (2) (2012) 21-25.

ABSTRACT

SURVEYING THE *IN VITRO* EFFECT OF DIFFERENT CARBON AND NITROGEN SOURCES ON POLY- β -HYDROXYBUTYRATE (PHB) BIOPLASTIC SYNTHESIS CAPACITY OF *Rhizobium gallicum* M40.1

Nguyen Thanh Luan*, Tran My Hieu
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: luannt@hufi.edu.vn

The aim of this study was to survey the *in vitro* effect of different organic carbon and nitrogen sources on the PHB bio-plastic production synthesized by *Rhizobium gallicum* type M40.1 in liquid yeast extract manitol medium (YEMM). Manitol, sucrose, molasses and starch were used as tested organic carbon sources. Additionally, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glycine, yeast extract and TPY (included trypton, yeast extract and peptone with the ratio of 1:1:1) were considered as nitrogen sources. *Rhizobium gallicum* type M40.1 with a function of PHB bio-plastic synthesis was isolated from soil and the experiments were conducted under *in vitro* laboratory conditions. The results showed that the amount of synthesized PHB bio-plastic by *Rhizobium gallicum* type M40.1 in the treatment supplemented with sucrose as an organic carbon source was significantly higher than that in the others, with an amount of 0.127 g/L which obtained 41.06% PHB synthesized under continuous condition after 60 hours of incubation. The different results in nitrogen sources illuminated the NH_4^+ supplementation from NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glycine and the mixture of trypton: peptone: yeast extract (TPY) with NH_4Cl contributed better PHB synthesis capacity with $0,029 \pm 0,013$ g/L equal to 61,09%. The result of the effect of different nitrogen source supplement on PHB bio-plastic synthesizing capacity of *Rhizobium gallicum* type M40.1 in YEMM revealed that the larger amounts of synthesized PHB bio-plastic were found to be 3 times higher in all NH_4Cl containing nitrogen source treatments with concentration of 1% than that of the yeast extract powder treatment with the same concentration under discontinuous fermentation conditions.

Keywords: Bioplastic, nitrogen sources, organic carbon sources, PHB, *Rhizobium gallicum* M40.1.