

Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp Poly (3-Hydroxybutyrate) của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199

Đoàn Văn Thước*, Lưu Thị Hồi

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 9 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 08 tháng 6 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 22 tháng 6 năm 2015

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này sự ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng như KH_2PO_4 , MgSO_4 và cao nấm men đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 đã được lần lượt nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ 0.85 g/l MgSO_4 , 0.55 g/l KH_2PO_4 , và 1.5 g/l cao nấm men là điều kiện dinh dưỡng phù hợp cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp PHB của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. Ở điều kiện này khối lượng tế bào khô khoảng 5 g/l với hàm lượng PHB khoảng 77.5% đã đạt được sau 48 h nuôi cấy trên môi trường MT2. Ảnh chụp tế bào sau 48 h nuôi cấy bằng kính hiển vi điện tử truyền qua cho thấy các hạt PHB to đồng nhất, khoảng 1-2 hạt trong mỗi tế bào và chiếm gần hết khoang tế bào. Với khả năng sinh trưởng mạnh và sinh tổng hợp nhiều PHB chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có nhiều tiềm năng để phát triển sản xuất trên quy mô công nghiệp.

Từ khóa: polyhydroxyalkanoate, poly(hydroxybutyrate), polymer, vi khuẩn ưa mặn, *Yangia* sp. NĐ199

1. Mở đầu

Polyhydroxyalkanoates (PHA) là polyester của các đơn phân hydroxyalkanoate. PHA được tích lũy trong tế bào của nhiều vi sinh vật như là nguồn dự trữ carbon và năng lượng, thường là khi trong môi trường sống dư thừa nguồn carbon và thiếu một vài nguyên tố dinh dưỡng như oxygen, nitrogen, phosphorus, sulfur, magnesium [1, 2]. PHA là polymer của khoảng 10^3 đến 10^4 monomer, chúng tồn tại dưới dạng các hạt riêng biệt trong tế bào, có

khoảng từ 5 đến 13 hạt trong một tế bào, mỗi hạt có kích thước khoảng từ 0.2 đến 0.5 μm [3-5]. Sau khi được tách chiết ra khỏi tế bào, các PHA thể hiện các tính chất chung đặc trưng như không độc hại, không tan trong nước, tương thích sinh học cao, có khả năng tự phân hủy, là những nhựa ưa nhiệt có thể tái sử dụng [2].

Trong nhóm PHA thì poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) là loại polymer được nghiên cứu nhiều nhất. PHB có các tính chất vật lý tương tự như một số plastic có nguồn gốc từ dầu mỏ chính vì vậy chúng được sử dụng để sản xuất rất nhiều các sản phẩm khác nhau như:

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-948071329.
Email: thuocdv@hnue.edu.vn

bao bì, các túi đựng dùng trong siêu thị, khay đựng trái cây, rau quả, trứng và thịt, chai lọ đựng mỹ phẩm, chai lọ đựng đồ uống. PHB cũng được dùng để sản xuất các dụng cụ dùng một lần như hộp đựng đồ ăn nhanh, dụng cụ dùng trong gia đình như cốc, thìa, đĩa, đĩa. Ngoài ra PHB cũng được dùng để chế tạo các sản phẩm có độ bền cao như linh kiện điện tử ví dụ vỏ điện thoại, vỏ máy tính, hoặc được sử dụng để chế tạo vật dụng nội thất xe hơi [6]. Sau khi sử dụng, các sản phẩm này có thể được phân hủy thành H_2O và CO_2 trong điều kiện hiếu khí hoặc CO_2 và CH_4 trong điều kiện kỵ khí nhờ các vi sinh vật có mặt trong tự nhiên [4, 7].

Tuy nhiên do giá thành sản xuất PHA nói chung và PHB nói riêng còn khá cao so với các loại nhựa thông thường có nguồn gốc từ dầu mỏ nên khả năng ứng dụng PHA vào trong cuộc sống thường ngày còn nhiều hạn chế. Rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến giá cả của PHA, ví dụ như: hiệu suất sản xuất PHA, hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào, hiệu suất chuyển hóa nguồn các bon thành PHA, giá của các nguyên liệu dùng trong lên men (chủ yếu là nguồn các bon), và giá của qui trình tách chiết, tinh sạch PHA [8].

Hiện nay các nhà khoa học đang nỗ lực nghiên cứu nhằm giảm giá thành của PHA, trong đó các hướng nghiên cứu chủ yếu là: tìm ra các chủng vi sinh vật mới có khả năng tạo ra hàm lượng PHA lớn từ các nguồn nguyên liệu rẻ tiền, tối ưu hóa các qui trình sản xuất và tinh sạch để đạt được hiệu suất cao hay tạo ra các dòng sinh vật chuyển gen có khả năng tạo ra nhiều PHA [8].

Gần đây chúng tôi có phân lập được chủng vi khuẩn ưa mặn *Yangia* sp. NĐ19 từ rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định. Chủng

vi khuẩn này sinh trưởng tối ưu ở nhiệt độ 32 °C và nồng độ 4.5% NaCl. Trên môi trường có nguồn carbon là glucose chủng vi khuẩn này tích lũy PHA với thành phần chủ yếu là PHB (98-99%) cùng với 1-2% poly(3-hydroxyvalerate) (PHV) [9]. Khi sử dụng nguồn carbon là fructose chủng này sinh trưởng phát triển mạnh và tích lũy PHB là chủ yếu. Trong nghiên cứu này thành phần môi trường dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng phát triển và tích lũy PHB của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 như $MgSO_4$, KH_2PO_4 và cao nấm men sẽ được nghiên cứu tối ưu.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Đối tượng

Chủng vi khuẩn ưa mặn *Yangia* sp. NĐ199 phân lập từ đất rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định.

Các loại môi trường sử dụng

Môi trường giữ giống và hoạt hóa vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 là môi trường chuyên dụng dùng cho các vi khuẩn ưa mặn trung bình [9] (ký hiệu là MT1) có thành phần g/l: NaCl, 45; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 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 PHB (ký hiệu là MT2) có thành phần g/l: NaCl, 45; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.09; KCl, 0.5; KBr, 0.06; KH_2PO_4 , 0.25; cao nấm men, 1; fructose, 25. Các thành phần của môi trường được hòa tan trong 1000ml nước cất, pH của môi trường được điều chỉnh đến 7.0 bằng dung dịch 5M NaOH, môi trường đặc được bổ sung 2% agar (20 g/l).

2.2. Phương pháp

Hoạt hoá chủng nghiên cứu

Cây chủng *Yangia* sp. NĐ199 trên môi trường MT1 đặc ở nhiệt độ 32 °C trong 24 h, cây chuyển sang môi trường MT1 lỏng, nuôi trong máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở nhiệt độ 32 °C trong 14 h, lúc này chủng vi khuẩn đã được hoạt hóa xong (giống vi khuẩn) sàng sàng sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng Yangia sp. NĐ199

Bổ sung 5% giống vi khuẩn đã hoạt hóa 14 h vào bình nón 250 ml chứa 50 ml môi trường MT2 lỏng, thành phần các chất dinh dưỡng trong môi trường lần lượt được thay đổi theo từng công thức thí nghiệm: (1) thay đổi nồng độ MgSO₄ (nồng độ g/l: 0.1, 0.25, 0.4, 0.55, 0.7, 0.85, 1), (2) thay đổi nồng độ KH₂PO₄ (nồng độ g/l: 0.1, 0.25, 0.4, 0.55, 0.7, 0.85), và (3) thay đổi nồng độ cao nấm men (nồng độ g/l: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2). Chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 được giữ trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 32 °C với tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau 30 h dịch nuôi cấy được thu lại để xác định khối lượng tế bào khô (CDW) và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào. Dựa vào CDW và hàm lượng PHB tích lũy để đánh giá ảnh hưởng của các chất đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199.

Ảnh hưởng của các thời gian nuôi cấy đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng vi khuẩn Yangia sp. NĐ199

Bổ sung 4% giống vi khuẩn đã hoạt hóa 14 h vào trong bình nón 250 ml chứa 50 ml môi trường MT2 lỏng có thành phần 0.85 g/l MgSO₄, 0.55 g/l KH₂PO₄, 1.5 g/l cao nấm men. Đặt các bình nón trong tủ lắc 180 vòng/phút ở

nhiệt độ 32 °C. Lấy mẫu ở các thời điểm: 0 h, 16 h, 24 h, 32 h, 40 h, 48 h, 52 h. Xác định khối lượng tế bào khô (CDW) và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào. Mẫu tế bào có chứa nhiều PHB sẽ được giữ lại để chụp ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Phương pháp xác định khối lượng tế bào khô (CDW) trong dịch nuôi cấy và xác định hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào của chủng Yangia sp. NĐ199

CDW được xác định theo các bước: chuẩn bị eppendorf 2 ml đánh số thứ tự, sấy khô đến khối lượng không đổi sau đó cân để xác định khối lượng ban đầu (M₀) của từng eppendorf, hút lần lượt 2 lần mỗi lần 2 ml dịch nuôi cấy cho vào eppendorf trên, li tâm 10000 vòng trong 5 phút, giữ lại sinh khối tế bào, rửa sinh khối bằng nước cất. Sấy khô eppendorf chứa sinh khối đến khối lượng không đổi sau đó cân eppendorf để xác định khối lượng eppendorf và tế bào (M). Tính khối lượng tế bào khô (CDW) theo công thức: $CDW (g/l) = (M - M_0) \times 250$.

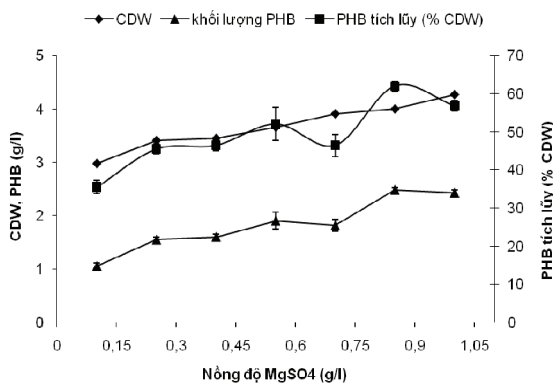
Hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào được xác định theo phương pháp của Law và Slepecky (1961) [10], đây là phương pháp đặc hiệu được sử dụng để xác định hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào của vi sinh vật. Theo phương pháp này, khoảng 10 mg sinh khối tế bào khô có tích lũy PHB sẽ được thủy phân bằng 10 ml dung dịch 98% H₂SO₄ trong 1.5 h ở nhiệt độ 100°C để thu được axit crotonic, hỗn hợp sau đó được để nguội ở nhiệt độ phòng. Pha loãng dịch thủy phân bằng dung dịch 98% H₂SO₄ rồi đo OD ở bước sóng 235 nm. PHB tinh khiết được sử dụng để xây dựng đồ thị chuẩn, dựa vào đồ thị chuẩn để xác định hàm lượng PHB trong mẫu thí nghiệm.

3. Kết quả và thảo luận

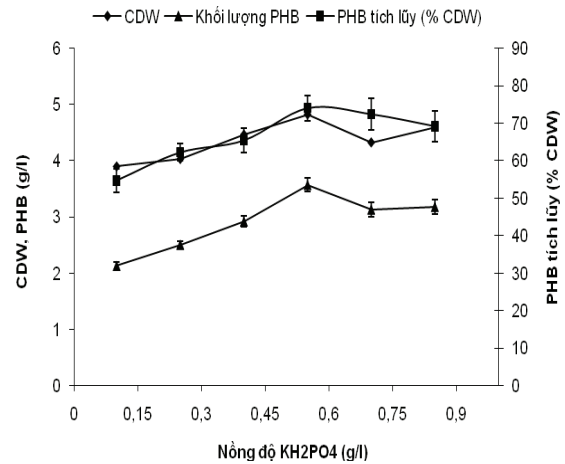
3.1. Ảnh hưởng của nồng độ $MgSO_4$ đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199

Thông thường PHB được tích lũy trong tế bào vi khuẩn khi môi trường sống dư thừa nguồn carbon và thiếu một nguyên tố dinh dưỡng nào đó ví dụ như N, P, Mg, O, S... [1, 2]. Trong nghiên cứu này ảnh hưởng của nồng độ $MgSO_4$ tới sự sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199 đã được chúng tôi nghiên cứu. Kết quả được thể hiện trong hình 1.

Các nồng độ $MgSO_4$ khác nhau có ảnh hưởng nhưng không quá lớn tới sự sinh trưởng phát triển và tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199. Khi nồng độ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ tăng từ 0.1 g/l đến 1 g/l thì sinh khối tế bào cũng tăng và đạt giá trị cực đại (4.2 g/l) tại nồng độ 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Đồng thời với sự sinh trưởng phát triển, hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào cũng tăng khi tăng nồng độ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và đạt giá trị cực đại (62%) tại nồng độ 0.85 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, sau đó hàm lượng PHB giảm chỉ còn 56% ở nồng độ 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Như vậy, có thể nhận thấy rằng khối lượng PHB thu được cao nhất (2.48 g/l) tại nồng độ 0.85 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ $MgSO_4$ đến sinh khối và sự tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199.

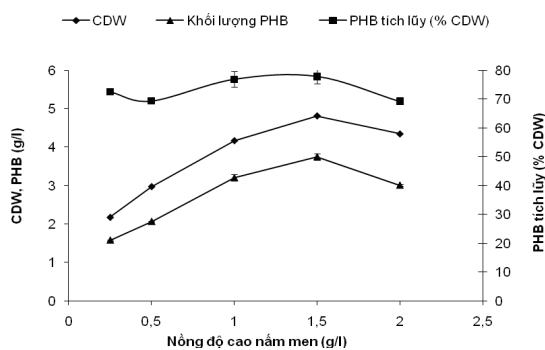


Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199

Theo các nghiên cứu trước đây nồng độ photphorus cũng ảnh hưởng tương đối lớn tới khả năng tích lũy PHB của các chủng vi khuẩn [3], vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4 tới sự sinh trưởng phát triển và tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199. Kết quả thí nghiệm cho thấy, các nồng độ KH_2PO_4 khác nhau có ảnh hưởng lớn tới sự sinh trưởng phát triển và tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199. Khi nồng độ KH_2PO_4 tăng thì sinh khối tế bào cũng tăng và đạt giá trị cao nhất (4.8 g/l) tại nồng độ 0.55 g/l KH_2PO_4 . Đồng thời với sự sinh trưởng phát triển, hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào cũng tăng khi tăng nồng độ KH_2PO_4 và đạt giá trị cực đại (74%) tại nồng độ 0.55 g/l KH_2PO_4 . Sau đó sự sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của chủng *Yangia sp.* NĐ199 giảm dần khi tăng nồng độ KH_2PO_4 , sinh khối tế bào và hàm lượng PHB tích lũy chỉ còn lần lượt là 4.5 g/l và 69% ở nồng độ 0.85 g/l KH_2PO_4 (Hình 2). Hàm lượng PHB (3.6 g/l) và

sinh khối tế bào khô đạt giá trị cực đại tại nồng độ 0.55 g/l KH_2PO_4 (Hình 2).



Hình 3. Ảnh hưởng của hàm lượng cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *Yangia* sp. NĐ199.

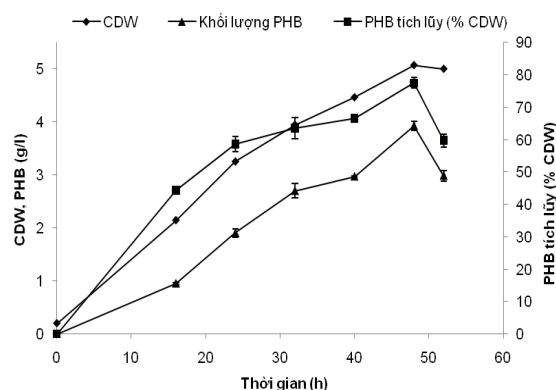
3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *Yangia* sp. NĐ199

Hàm lượng cao nấm men có ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của các vi khuẩn nói chung và của chủng *Yangia* sp. NĐ199 nói riêng. Thông thường, cao nấm men là nguồn nitơ rất tốt cho sự sinh trưởng của vi khuẩn. Tuy nhiên, đối với chủng *Yangia* sp. NĐ199 hàm lượng cao nấm men còn ảnh hưởng tới khả năng tích lũy PHB trong tế bào. Chính vì thế chúng tôi tiến hành thí nghiệm này nhằm tìm ra nồng độ cao nấm men thích hợp để cho sinh khối cao đồng thời các tế bào tích lũy hàm lượng PHB cao nhất. Hình 3 cho thấy vi khuẩn sinh trưởng kém ở nồng độ cao nấm men bằng và thấp hơn 1 g/l, vì sinh trưởng kém nên khối lượng PHB thu được rất nhỏ. Khi hàm lượng cao nấm men của môi trường tăng thì sinh khối tế bào tăng (Hình 3). Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng cao nấm men lên 2 g/l thì hàm lượng PHB tích lũy giảm do vậy sinh khối tế bào khô cũng giảm. Do PHB chỉ tích lũy trong điều kiện dư thừa nguồn carbon và thiếu tới mức giới hạn một nguyên tố dinh dưỡng nào đó [1]. Mà tăng hàm lượng cao nấm men nghĩa là tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng do vậy sự tích lũy PHB đã bị ức chế. Khi

hàm lượng cao nấm men là 1.5 g/l chúng tôi nhận thấy dung dịch lên men đục và có màu trắng bạc. Phân tích hàm lượng PHB nhận thấy chủng tích lũy PHB cao nhất, đạt 77,8% và đồng thời sinh khối tế bào thu được tương đối cao (4.8 g/l). Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như nghiên cứu của Quillaguamán và đồng tác giả trên chủng vi khuẩn ưa mặn trung bình *Halomonas boliviensis* LC1 [11]. Khi tăng nồng độ cao nấm men hoặc các chất dinh dưỡng khác thì sinh khối tế bào và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào cũng tăng, tuy nhiên nếu tăng quá cao thì lượng PHB tích lũy sẽ giảm do áp suất thẩm thấu tăng hoặc điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng (điều kiện thuận lợi để vi sinh vật tích lũy PHA) không còn.

3.4. Nghiên cứu lựa chọn thời gian nuôi cấy phù hợp

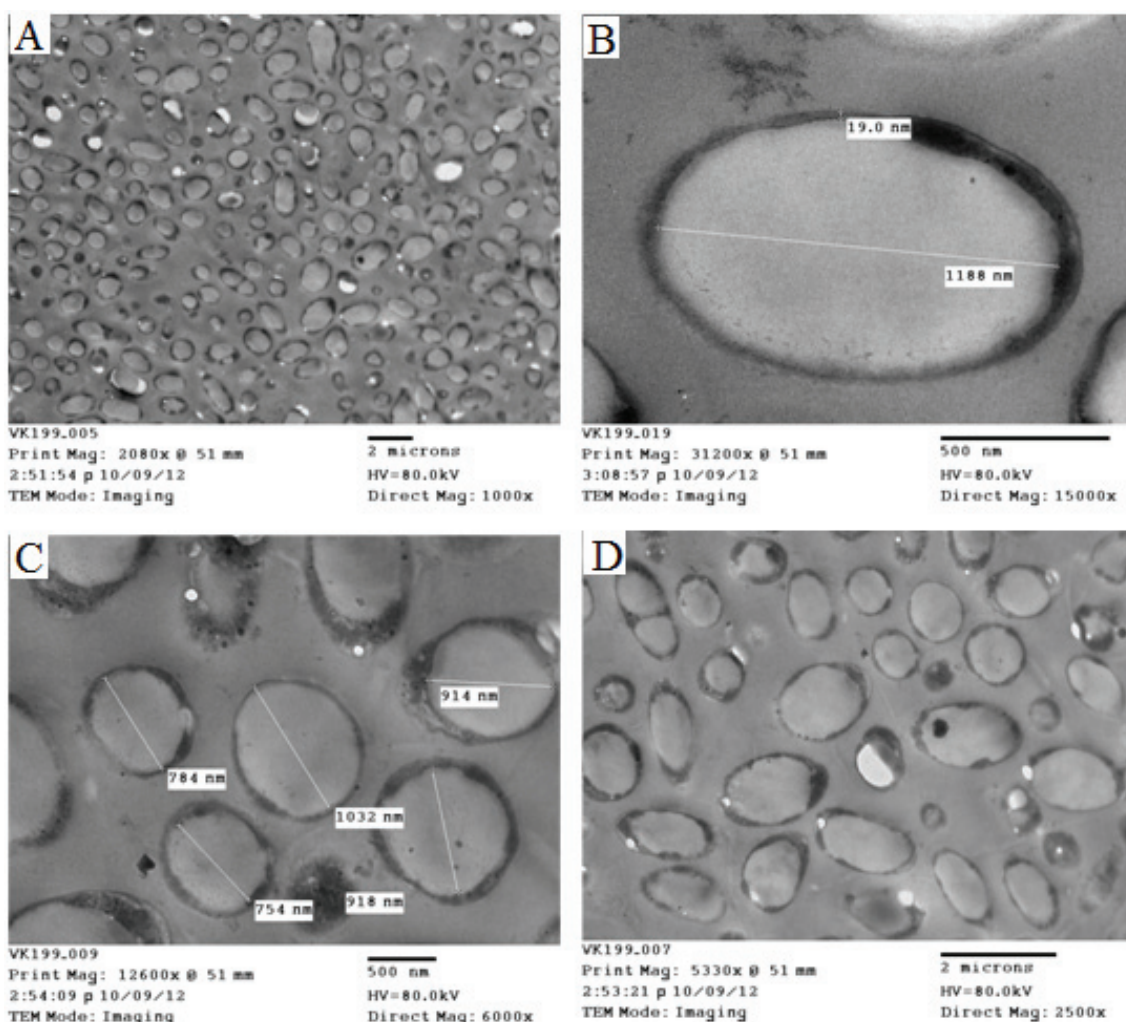
Trong quá trình làm thí nghiệm chúng tôi nhận thấy ở các thời điểm khác nhau tốc độ sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của chủng *Yangia* sp. NĐ199 là khác nhau. Việc tìm ra thời điểm nào chủng có khả năng sinh trưởng tốt nhất và tích lũy PHB cao nhất có ý nghĩa rất lớn trong quá trình làm thí nghiệm và trong thực tế. Do đó chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu động thái sinh trưởng và tích lũy PHB trong tế bào chủng *Yangia* sp. NĐ199. Kết quả được thể hiện trong hình 4.



Hình 4. Sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 theo thời gian nuôi cấy.

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 0 h, sinh khối tế bào đạt 0.025 g/l nhưng tế bào chưa tích lũy PHB. Tại thời điểm 16 h, mặc dù sinh khối tế bào chưa cao nhưng chúng đã bắt đầu tích lũy PHB, hàm lượng PHB đạt gần 44% tại thời điểm này. Trong khoảng thời gian từ 32 h đến 48 h sinh khối tế bào tăng đều tuy nhiên sự tích lũy PHB cũng như sự tích lũy PHB cũng tăng nhưng chậm (Hình 4). Hàm lượng PHB đạt cực đại sau 48 h nuôi cấy (77.5%), tại thời điểm này

sinh khối tế bào cũng đạt giá trị cao nhất (5 g/l). Tiếp tục nuôi cấy và thu sinh khối tế bào, chúng tôi nhận thấy tại 52 h sinh khối tế bào bắt đầu giảm và đặc biệt hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào giảm mạnh. Có thể do lúc này chất dinh dưỡng trong môi trường đã cạn kiệt nên PHB – nguồn carbon tích lũy trong tế bào đã bị phân hủy để cung cấp dinh dưỡng duy trì sự sinh trưởng của vi khuẩn. Như vậy kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng thời điểm thuận lợi để dừng thí nghiệm thu sinh khối tế bào và PHB là 40-48 h sau khi nuôi cấy.



Hình 5. Ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của tế bào chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có chứa các hạt PHB màu trắng.

So sánh hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 với chủng vi khuẩn *Alcaligenes eutrophus* (nay được gọi là *Cupriavidus necator*) - hiện nay đang được dùng để sản xuất PHB trên quy mô công nghiệp chúng tôi nhận thấy: hàm lượng PHB mà chủng *Yangia* sp. NĐ199 tích lũy (khoảng 77.5% khối lượng tế bào khô) tương đương với chủng *C.necator* trong nghiên cứu của Linko và đồng tác giả (1993) [12] (khoảng 69% khối lượng tế bào khô) khi cùng sử dụng nguồn carbon là fructose sau 48 h nuôi cấy.

Sinh khối tế bào của chủng *Yangia* sp. NĐ199 ở thời điểm 48 h nuôi cấy đã được chúng tôi giữ lại để tiến hành chụp ảnh hiển vi điện tử tại viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Hình 5 cho thấy các hạt PHB màu trắng chiếm toàn bộ khoang tế bào chất, mỗi tế bào chỉ chứa khoảng 1-2 hạt PHB do vậy kích thước của các hạt tương đối lớn và dao động từ 0.3 đến 1.3 μ m (Hình 5C). Hạt PHB tích lũy trong tế bào của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 ít và lớn hơn nhiều so với kích thước của các hạt PHB được mô tả trước đó (khoảng 3-15 hạt/tế bào và kích thước hạt khoảng 0.2 đến 0.5 μ m) [5]. Kết quả ở hình 5B cũng cho thấy lớp thành và màng bao quanh tế bào của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 khá mỏng (chỉ khoảng 19nm) khi tế bào tích lũy nhiều PHB. Khả năng tích lũy lượng PHB lớn, hạt PHB to đồng thời thành tế bào mỏng là những lợi thế lớn của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 đặc biệt trong quá trình tách chiết và tinh sạch sau này. Việc tinh sạch sẽ dễ dàng hơn vì thành tế bào khá mỏng nên dễ dàng bị phá vỡ, còn hiệu suất thu hồi PHB sẽ cao hơn vì hạt PHB to nên dễ thu hồi khi lọc hoặc dễ lắng trong khi ly tâm.

4. Kết luận

Chúng tôi đã nghiên cứu tìm được môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng phát triển và sinh tổng hợp PHB của chủng vi khuẩn

Yangia sp. NĐ199. Lượng sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy đạt 5 g/l và 77.5% sau 48 h nuôi cấy trên môi trường MT2 có sử dụng: 0.85g/l MgSO₄, 0.55g/l KH₂PO₄, và 1.5 g/l cao nấm men. Với khả năng tích lũy hàm lượng PHB cao, các hạt PHB to và đồng nhất đồng thời thành và màng tế bào khá mỏng nên chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199 có nhiều tiềm năng để phát triển sản xuất trên quy mô công nghiệp. Các nghiên cứu tiếp theo ở trong nồi lên men đang được chúng tôi tiến hành.

Tài liệu tham khảo

- [1] A.J. Anderson, E.D. Dawes, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Review* 54 (1990) 450-472.
- [2] S.P. Valappil, A.R. Boccaccini, C Bucke, I Roy, Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 91 (2007) 1-17.
- [3] S.Y. Lee, Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* 49 (1996a) 1-14.
- [4] S.Y. Lee, Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnology* 14 (1996b) 431-438.
- [5] K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25 (2000) 1503-1555
- [6] S. Philip, T. Keshavarz, I Roy, Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82 (2007) 233-247
- [7] G. Du, J. Chen, J. Yu, S. Lun, Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology* 88 (2001) 59-65
- [8] J. Choi, S.Y. Lee, Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (1999)13-21.

- [9] D. Van-Thuoc, T. Huu-Phong, N. Thi-Binh, N. Thi-Tho, D. Minh-Lam, J. Quillaguamán, Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam. *MicrobiologyOpen* 1 (2012) 395-406
- [10] J.H. Law, R.A. Slepecky, Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology* 82 (1961) 33-36.
- [11] J. Quillaguamán, M. Munoz, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, Optimizing conditions for poly(β-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (2007) 981-986
- [12] S. Linko, V. Hanna, J. Seppälä, Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 (1993) 11-15.

Effect of Medium Composition on Cell Growth and poly(3-hydroxybutyrate) Production by *Yangia* sp. ND199

Đoàn Văn Thuộc, Lưu Thị Hôi

Faculty of Biology, Hanoi National University of Education, 136 Xuan Thuy, Hanoi, Vietnam

Abstract: In this study the effect of different nutrient concentrations in the culture medium such as KH_2PO_4 , MgSO_4 and yeast extract on cell growth and PHB synthesis was studied. Our results demonstrated that high CDW of 5 g/l and PHB content of 77.5% were obtained after 48 h of cultivation when 0.85 g/l MgSO_4 , 0.55 g/l KH_2PO_4 , and 1.5 g/l yeast extract were supplied in the culture medium. Transmission electron microscopy pictures of bacterial cells after 48 h cultivation shown that there were about 1-2 PHB granules per cell with diameter of 0.3 to 1.3 μm . The PHB granules fulfilled the cytoplasm of all bacterial cells. *Yangia* sp. ND199 with the capacity of fast growth and synthesis of high PHB content is an attractive option for further study.

Keywords: halophilic bacteria, polyhydroxyalkanoate, poly(hydroxybutyrate), polymer, *Yangia* sp. ND199