

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Trọng Linh

**SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GENE LÀM TĂNG KHẢ
NĂNG TỔNG HỢP NHỰA SINH HỌC Ở CHỦNG VI KHUẨN
*Bacillus megaterium***

LUẬN VĂN THẠC SĨ: SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội - 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Trọng Linh

**SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GENE LÀM
TĂNG KHẢ NĂNG TỔNG HỢP NHỰA SINH HỌC Ở
CHŨNG VI KHUẨN *Bacillus megaterium***

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Lã Thị Huyền
2. TS. Nguyễn Thị Đà

Hà Nội – 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài: **“Sử dụng phương pháp chuyển gene làm tăng khả năng tổng hợp nhựa sinh học ở chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium*”** là do tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Lã Thị Huyền và TS. Nguyễn Thị Đà. Số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn hoàn toàn trung thực, chính xác. Mọi thông tin nội dung tham khảo trong luận văn đều được trích dẫn rõ ràng tên công trình, tên tác giả, địa điểm, thời gian và nguồn gốc.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về lời cam đoan này!

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Học viên

Nguyễn Trọng Linh

LỜI CẢM ƠN

Sau quá trình học tập và nghiên cứu, để hoàn thành luận văn này, trước hết tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tới **TS. Lã Thị Huyền** – trưởng phòng Công nghệ Tế bào Động vật và **TS. Nguyễn Thị Đà** – cán bộ phòng Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, là những người thầy đã hướng dẫn, tận tình chỉ bảo và truyền đạt những kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn này.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến các cán bộ Phòng Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hướng dẫn, nhiệt thành giúp đỡ tôi trong các thí nghiệm và cũng cho tôi những kinh nghiệm quý báu trong công tác nghiên cứu Sinh học.

Luận văn được thực hiện bằng kinh phí của Đề tài “*Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học tái tổ hợp sinh tổng hợp bioplastic từ phụ phẩm chế biến thủy sản*” do TS. Nguyễn Thị Đà làm chủ nhiệm thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến của Bộ Công thương, năm 2018-2020.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban giám đốc, các thầy, cô giáo thuộc Khoa Công nghệ sinh học và Phòng Đào tạo, Quản lý Khoa học và Hợp tác quốc tế của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện, hướng dẫn cho tôi rất nhiều kiến thức trong quá trình học tập tại Học viện.

Xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã cổ vũ khích lệ tôi trong học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Học viên

Nguyễn Trọng Linh

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxyribonucleic
g/l	Gam/lít	
Mcl	Medium chain length	Chuỗi có độ dài trung bình
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng kéo dài chuỗi
PHA	Polyhydroxyalkanoate	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Polyhydroxybutylrate	Polyhydroxybutylrat
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
Scl	Short chain length	Chuỗi có độ dài ngắn
TAE	Tris- acetate-EDTA	
Lcl	long-chain-length	chiều dài chuỗi dài
c-PHB	complex PHB	
[P(3HB-co-3HHx)	poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)	
[P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)	
MCL	medium chain length	chiều dài trung bình
TCA	axit tricarboxylic	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Nhóm chức R và một số loại PHA	7
Bảng 1. 2. Các dưới đơn vị synthase tham gia tổng hợp PHA ở các loài khác nhau	10
Bảng 2.1: Các chủng nghiên cứu	19
Bảng 2. 2: Các chất bổ sung sử dụng cho môi trường chọn lọc	21
Bảng 2. 3: Các primer sử dụng	23
Bảng 2.4. Các phản ứng cắt và gắn bằng enzyme giới hạn.....	23
Bảng 3. 1. Bảng ký hiệu và đặc điểm của các chủng tái tổ hợp tạo thành .	36
Bảng 3. 2. Ảnh hưởng của việc tăng cường biểu hiện phaC lên khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng <i>B. megaterium</i> DV01	36
Bảng 3. 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của chủng tái tổ hợp.....	38
Bảng 3. 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp PHA của chủng tái tổ hợp.....	38
Bảng 3. 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp PHA của các chủng tái tổ hợp.....	40
Bảng 3. 6. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng khác nhau lên hàm lượng PHA xác định theo Crotonic của chủng <i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC1	43

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Ảnh hiển vi điện tử của tế bào vi khuẩn <i>Bacillus megaterium</i> DV01 chứa các hạt PHA.....	4
Hình 1.2. Sự đa dạng PHA.....	6
Hình 1.3. Cấu trúc hóa học phân tử PHA	7
Hình 1.4. Cấu trúc của một số loại PHA.....	8
Hình 1.5. Cấu trúc hạt PHA	8
Hình 1. 6. Cấu trúc PHA synthases.....	10
Hình 1.7. Con đường sinh tổng hợp P (3HB)	12
Hình 3. 1. Cụm gen sinh tổng hợp PHB của <i>B. megaterium</i>	27
Hình 3. 2. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>phaC</i> của chủng tuyển chọn	28
Hình 3. 3. Hình ảnh khuẩn lạc tách dòng mang gen <i>phaC</i> (A) và hình ảnh tách plasmid của chủng DH5 α tái tổ hợp (B)	29
Hình 3. 4. Hình ảnh điện di đồ khuếch đại gen <i>phaC</i> từ các khuẩn lạc DH5 α tách dòng	30
Hình 3. 5. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>phaC</i> bằng cặp môi For2/PhaC –SpeI// Rev2/PhaC–SphI.....	31
Hình 3.6. Điện di đồ sản phẩm cắt mở vòng vector pSP6.....	31
Hình 3.7. Khuẩn lạc <i>E. Coli</i> DH5 α tách dòng mang plasmid pPSP6- <i>phaC</i>	32
Hình 3.8. Điện di đồ sản phẩm tách plasmid pPSP6/ <i>phaC</i> tách từ các khuẩn lạc <i>E. coli</i> DH5 α khác nhau	32
Hình 3.9. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>phaC</i> từ plasmid pPSP6/ <i>phaC</i> bằng cặp môi For2/PhaC –SpeI// Rev2/PhaC–SphI.....	33
Hình 3.10. Hình ảnh sàng lọc các dòng tế bào chủng <i>B. megaterium</i> DV01 mang vector pPSP6 và pPSP6 – PhaC trên môi trường LB có bổ sung tetracycline	34
Hình 3.11. Điện di đồ sản phẩm tách DNA plasmid của các chủng <i>B. megaterium</i> DV01 mang vector pPSP6/ <i>phaC</i> tái tổ hợp	34
Hình 3.12. Điện di đồ sản phẩm phản ứng cắt kiểm tra plasmid pPSP6/ <i>phaC</i> bằng enzyme giới hạn <i>SphI</i> và <i>SpeI</i>	35
Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng của các chủng tái tổ hợp nghiên cứu.....	36
Hình 3.14. Hàm lượng PHA của các chủng tái tổ hợp nghiên cứu	37

Hình 3.15. Sơ đồ thời gian thí nghiệm và thời điểm lấy mẫu.....	41
Hình 3.16. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng gốc <i>B. megaterium</i> DV01	41
Hình 3.17. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự biểu hiện protein PhaC của chủng tái tổ hợp	42
Hình 3.18. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng lên khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng <i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC 1	43
Hình 3.19. Điện di đồ ảnh hưởng của nồng độ xylose khác nhau của chủng <i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC 1 lên khả năng biểu hiện PhaC.....	44
Hình 3.20: Phổ hồng ngoại của PHA thu hồi từ chủng tái tổ hợp.....	46
Hình 3.21. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹ H của PHA thu hồi từ chủng tái tổ hợp và PHA chuẩn.....	48
Hình 3.22. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³ C của PHA thu hồi từ chủng tái tổ hợp và PHB chuẩn sigma.....	49
Hình 3.23. Cấu trúc phân tử PHA của chủng tái tổ hợp.....	50
Hình 3.24. Hình ảnh PHA tách chiết bằng dung môi của chủng tái tổ hợp...	50

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	iii
DANH MỤC BẢNG.....	iv
DANH MỤC HÌNH	v
MỤC LỤC.....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ NHỰA SINH HỌC.....	3
1.1.1. Giới thiệu về nhựa sinh học	3
1.1.2. Phân loại PHA.....	4
1.1.3. Cấu trúc PHA	6
1.2. CÁC NHÂN TỐ THAM GIA SINH TỔNG HỢP NHỰA SINH HỌC.....	8
1.2.1. PHA synthase	8
1.2.2. Protein phasin.....	10
1.2.3. Protein hoạt hóa.....	11
1.2. CON ĐƯỜNG SINH TỔNG HỢP PHA	11
1.3. TÍNH CHẤT CỦA PHA	12
1.4. VI KHUẨN <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	13
1.5. ỨNG DỤNG CỦA PHA.....	14
1.5.1. Ứng dụng trong đời sống sản xuất	15
1.5.2. Ứng dụng trong y sinh	15
1.6. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRÊN THẾ GIỚI	15
1.7. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC.....	17
Chương 2.VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	19

2.1. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	19
2.2. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	19
2.2.1. Chủng giống	19
2.2.2. Plasmid	19
2.2.3. Hóa chất	19
2.2.4. Thiết bị	20
2.2.5. Môi trường	20
2.2.6. Chất bổ sung	21
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.3.1. Chuẩn bị chủng giống	21
2.3.2. Tách chiết DNA tổng số	21
2.3.3. Tách chiết DNA plasmid <i>E. coli</i>	22
2.3.4. Tách chiết DNA plasmid <i>Bacillus</i>	22
2.3.5. Phương pháp PCR	23
2.3.6. Cắt DNA bằng enzyme giới hạn và gắn DNA	23
2.3.7. Biến nạp DNA plasmid vào chủng chủ <i>E. coli</i>	24
2.3.8. Biến nạp DNA plasmid vào chủng chủ <i>Bacillus</i>	24
2.3.9. Phương pháp tách PHA	25
2.3.10. Phương pháp Crotonic xác định hàm lượng nhựa sinh học	25
2.3.11. Phương pháp nuôi sinh khối vi sinh vật tạo nhựa sinh học	25
2.3.12. Phương pháp phân tích cấu trúc nhựa sinh học thu được từ vi khuẩn	26
2.3.13. Phân tích thống kê	26
2.3.14. Phương pháp tinh sạch DNA từ gel agarose	26
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	27
3.1. KẾT QUẢ LỰA CHỌN GEN ĐÍCH ĐỂ CAN THIỆP GEN VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN ĐÍCH	27

3.2. TẠO CHŨNG TÁI TỔ HỢP TĂNG CƯỜNG BIỂU HIỆN GEN <i>phaC</i>	30
3.2.1. Thiết kế vector tái tổ hợp pPSP6	30
3.2.2. Tạo chủng tái tổ hợp <i>B. megaterium</i> DV01 mang vector pPSP6/ <i>phaC</i>	33
3.3. SÀNG LỌC CHŨNG CHỨA VECTOR TÁI TỔ HỢP pPSP6/ <i>phaC</i> CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP PHA CAO	35
3.4. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ SINH TỔNG HỢP PHA CỦA CHŨNG TÁI TỔ HỢP TẠO THÀNH	38
3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA	38
3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng tuyển chọn	39
3.4.3. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng tái tổ hợp	43
3.5. PHÂN TÍCH, XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC NHỰA SINH HỌC CỦA CHŨNG TÁI TỔ HỢP	44
3.5.1. Phân tích phổ hồng ngoại của PHA từ chủng tái tổ hợp	44
3.5.2. Phân tích phổ cộng hưởng từ - NMR của PHA từ chủng tái tổ hợp	46
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	51
KẾT LUẬN	51
KIẾN NGHỊ	51
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO	53
PHỤ LỤC	61

MỞ ĐẦU

Nhựa có thể được coi là vật liệu nhân tạo được sử dụng rộng rãi nhất ngày nay. Chúng cần thiết trong hầu hết các lĩnh vực của đời sống con người bởi các tính chất đặc trưng được biết đến như: khả năng uốn dẻo, độ bền, khả năng chịu nước, độ dẫn điện và dẫn nhiệt thấp,... Tuy nhiên, các monome cho phần lớn các chất dẻo như polyester, polyethylen, polypropylen và polystyren có nguồn gốc từ hydrocarbon hóa thạch và không bị phân hủy trong tự nhiên vì thế chúng gây ô nhiễm nghiêm trọng ảnh hưởng đến môi trường tự nhiên cũng như đời sống con người. Chính vì vậy, việc tìm và phát hiện ra các loại nhựa sinh học đã mở ra cánh cửa mới thu hút được sự quan tâm của các nhà nghiên cứu trên khắp thế giới. Nhựa sinh học có nhiều ưu điểm so với nhựa thông thường có nguồn gốc hóa dầu (nhựa hóa dầu) do khả năng phân hủy sinh học vốn có, tính bền vững và tính chất thân thiện với môi trường giúp bảo tồn nguồn nhiên liệu hóa thạch hạn chế và cũng góp phần trong việc giảm phát thải khí nhà kính từ đó trở thành nhân tố quan trọng cho sự phát triển bền vững.

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

Các tính chất như khả năng tương thích sinh học, khả năng bền nhiệt, khả năng phân hủy sinh học của PHA đã làm cho chúng trở thành đối tượng thu hút rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu đặc biệt trong lĩnh vực ứng dụng y sinh. Với các đặc tính như tính tương thích sinh học cao, khả năng phân hủy sinh học đã đưa PHA trở thành nguồn nguyên liệu vô cùng giá trị, thân thiện môi trường đối với các ngành công nghiệp bao gói, dược, nông nghiệp, và công nghiệp thực phẩm.

Đối với các sản phẩm từ vi sinh vật quy mô công nghiệp, sản lượng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chi phí sản xuất chung của một quá trình. Do đó, các chủng vi khuẩn được chọn lựa cần có tốc độ tăng trưởng cao, khả năng tổng hợp PHA mạnh là rất cần thiết để sản xuất PHA. Mặc dù lợi ích rõ ràng

của việc sử dụng PHA thay thế cho nhựa có nguồn gốc hóa dầu, việc sử dụng và phân phối PHA hiện bị giới hạn bởi chi phí sản xuất tương đối cao so với các polyme gốc dầu mỡ như polypropylen. Chính vì vậy, việc tìm kiếm chủng và sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại nhằm tạo được chủng tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp và tích lũy PHA cao là vô cùng cần thiết

Do đó, tôi tiến hành thực hiện luận văn với tiêu đề: “Sử dụng phương pháp chuyển gene làm tăng khả năng tổng hợp nhựa sinh học ở chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium*”.

Luận văn được thực hiện với mục tiêu và nội dung nghiên cứu như sau:

➤ **Mục tiêu:**

Tạo được chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* có khả năng tổng hợp PHA cao bằng phương pháp chuyển gen.

➤ **Nội dung nghiên cứu của đề tài:**

- Lựa chọn gen đích, thiết kế primer, đọc trình tự và tách dòng gen.
- Thiết kế vector mang gen PHA synthase.
- Tạo và đánh giá chủng biểu hiện, phân tích cấu trúc nhựa sinh học thu được

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

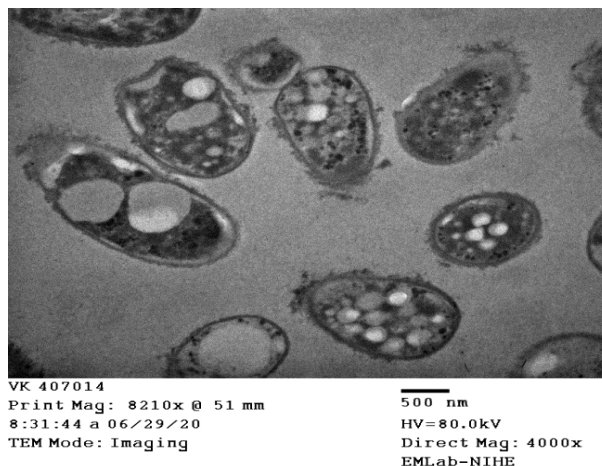
1.1. TỔNG QUAN VỀ NHỰA SINH HỌC

1.1.1. Giới thiệu về nhựa sinh học

Từ những năm 1950, thuật ngữ nhựa sinh học (bioplastic) xuất hiện nhằm để chỉ các loại polyme có khả năng bị phân hủy trong tự nhiên do các tác động của các loại vi sinh vật như các vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn và các enzyme. Từ “nhựa sinh học” thường được sử dụng để phân biệt với các polyme hóa dầu, điều này gây hiểu nhầm một phần, vì không phải tất cả các loại nhựa sinh học đều có nguồn gốc sinh học và có thể phân hủy sinh học [1, 2] vì có một số chất dẻo sinh học có thể phân hủy sinh học nhưng có nguồn gốc từ hóa thạch. Cấu trúc hóa học của chúng có thể bị phân hủy trong một quá trình lâu dài được xúc tác bởi các enzyme của một số vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái khác nhau. Tuy nhiên, chúng không bị phân hủy sinh học trong cơ thể động vật và đôi khi chúng vẫn tồn tại trong nước biển, đất... [1, 2, 3]. Vì thế, chỉ duy nhất nhựa sinh học có nguồn gốc sinh học có khả năng phân hủy sinh học mới thân thiện hơn về mặt sinh thái và là chất thay thế tốt nhất cho nhựa thông thường. Hiện nay có rất nhiều loại nhựa sinh học được biết đến như: nhựa nhiệt dẻo từ tinh bột, PLA (acid polylactic), PHA (polyhydroxyalkanoate), polyamide 11 (PA 11),... Trong số đó, một trong những loại nhựa sinh học được quan tâm nhất là polyeste polyhydroxyalkanoate (PPHA) được sản xuất thông qua quá trình lên men công nghiệp từ đường hoặc lipid của nhiều vi khuẩn gram âm và gram dương.

PHA (polyhydroxyalkanoate) là một họ của các biopolyester được tích lũy nội bào trong các vi sinh vật khác nhau với cấu trúc đa dạng [4, 5, 6], có tính chất cơ học tương tự như nhựa hóa dầu nhưng đặc biệt là có khả năng phân hủy sinh học. Các polyester tái tạo này có thể được sản xuất bởi các vi sinh vật khác nhau để đáp ứng với các điều kiện nuôi cấy khác nhau như: dư thừa carbon, hoặc hạn chế nitơ, lưu huỳnh, phosphate hoặc oxy... [7, 8] nhằm cung cấp năng lượng dự trữ bảo vệ tế bào khỏi tình trạng đói dinh dưỡng và điều kiện khắc nghiệt [9]. Poly- (R) -3-hydroxybutyrate (PHB) là PHA đầu tiên được phát hiện và đã được nghiên cứu vào năm 1926 bởi Lemoigne và cộng sự khi quan sát thấy sự tồn tại của các hạt poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) bên trong vi khuẩn Gram dương *Bacillus megaterium* [10].

PHA không tan trong nước và được lưu trữ trong tế bào chất dưới dạng các hạt. Thành phần đơn phân của PHA phụ thuộc chủ yếu vào vi khuẩn và nguồn carbon nuôi cấy. Ngoài vai trò chức năng là nguồn năng lượng dự trữ, sự hiện diện của PHA trong tế bào chất đóng vai trò tăng đề kháng của vi sinh vật dưới các điều kiện bất lợi như thay đổi áp suất thẩm thấu, pH, nhiệt độ và khi vi sinh vật tiếp xúc với hóa chất độc hại. PHA dự kiến sẽ thay thế một số loại nhựa hóa học ngày nay, do tính tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học, có đặc tính của nhựa nhiệt dẻo, không tan trong nước và các tính chất cơ học của chúng (ví dụ: tính đàn hồi, tính linh hoạt, v.v.) [11, 12] đồng thời có thể sử dụng nguồn năng lượng tái tạo trong tự nhiên để lên men sản xuất PHA như dầu thực vật [13], đường và CO₂ [14]. Chính vì vậy, PHA đã thu hút rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu đặc biệt trong lĩnh vực ứng dụng y sinh [8], trong các ngành công nghiệp bao gói, dược, nông nghiệp, và công nghiệp thực phẩm [15].



Hình 1.1. Ảnh hiển vi điện tử của tế bào vi khuẩn *Bacillus megaterium* DV01 chứa các hạt PHA

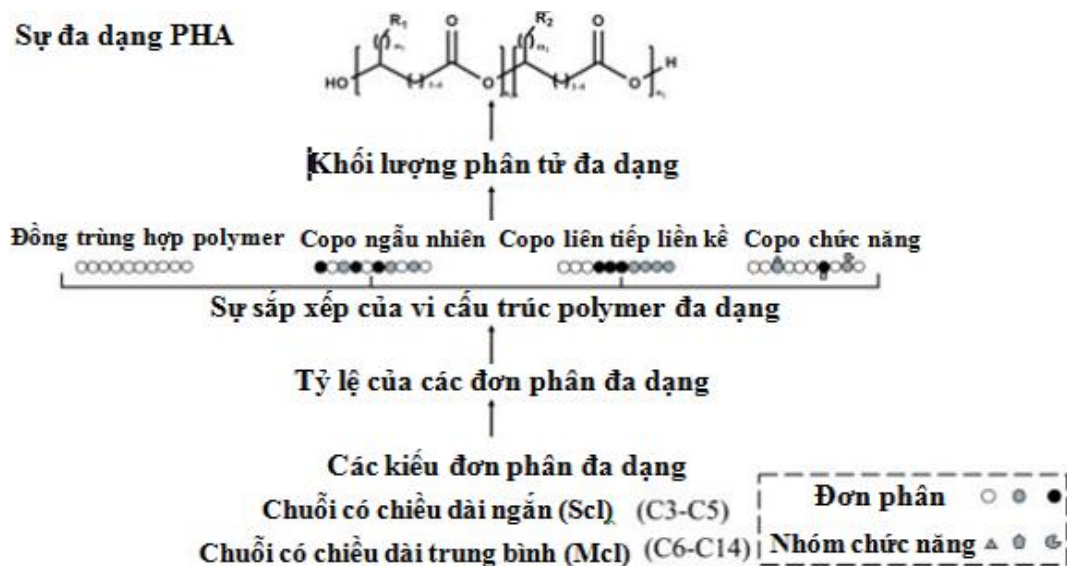
1.1.2. Phân loại PHA

PHA là một nhóm các polyester có cấu trúc hóa học đa dạng được hình thành từ các đơn phân hydroxyalkanoic axit (HA) được gắn với nhau nhờ liên kết ester và hiện nay khoảng 155 dạng đơn phân được xác định là thành phần cấu trúc nên các PHA được tìm thấy [12]. Trong đó, các axit 3-hydroxyalkanoic (3HA) đã bão hòa là các đơn phân thường gặp nhất trong cấu trúc của PHA. Bên cạnh đó chúng ta có thể gặp các dạng axit 3-hydroxyalkanoic chưa bão hòa, có chứa nhánh hoặc các nhóm thế. Số nguyên tử C trong các đơn phân thường dao động từ 4-14 [16].

Dựa vào cấu trúc hóa học của các monomer có thể chia thành ba nhóm PHA đó là các PHA có chiều dài chuỗi ngắn (short chain length PHA – scl PHA), với các monomer bao gồm từ 3 - 5 nguyên tử cacbon, PHA có chiều dài trung bình (medium chain length – mcl PHA) gồm các monomer bao gồm 6-15 nguyên tử carbon, và dạng thứ 3 là các PHA có chiều dài chuỗi dài (long chain length PHA - lcl PHA) với các monomer có cấu trúc dài với trên 15 nguyên tử cacbon [8, 17]. Dựa trên các thành phần của đơn phân và trật tự sắp xếp của chúng, PHA có thể được phân thành: polymer đồng hình (homopolymer) được hình thành từ một monomer lặp đi lặp lại (PHB, PHV, ...); copolymer ngẫu nhiên được hình thành từ ít nhất hai homopolymer khác nhau liên kết cộng hóa trị như copolyme scl, copolyme mcl và scl-mcl-PHA copolyme hoặc block copolymer (poly (3- hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate/P3HB4HB, poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate/PHBV, poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate/PHBHHx,...). Đặc tính đa dạng cấu trúc của các thành viên trong nhóm PHA được tạo thành phụ thuộc vào một số yếu tố bao gồm: các loại monomer, tỷ lệ monomer trong copolymer, sắp xếp cấu trúc polymer bao gồm homopolymer, copolymer ngẫu nhiên, các nhóm chức trong chuỗi bên polymer [18]. Bên cạnh đó, việc cấu tạo thành phần như loại PHA cũng như tỷ lệ của các monomer cũng gây ảnh hưởng đến tính chất của PHA khi polyme đồng nhất của scl-PHA như P3HB (polyhydroxybutyrate) là vật liệu giòn và cứng, trong khi copolymer của mcl-PHA đã được cải thiện tính đàn hồi. Hiện nay, các chất đồng trùng hợp khác nhau như poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] [19], poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] [20], poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)], poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] [22] và PHA có chiều dài chuỗi trung bình (mcl-PHA) [23, 24] đã được quan tâm. Một số loại PHA đơn được nghiên cứu ngày nay như: polyhydroxyvalerate (PHV) thu được từ *P. oleovorans*, polyhydroxyhexanoate (PHHx) từ *P. putida* KTHH03, polyhydroxyheptanoate (PHHp) từ *P. putida*, Polyhydroxyoctanoate (PHO) từ *Streptomyces lividans*... Trong đó polyhydroxybutyrate (PHB) là loại bioplastic được nghiên cứu nhiều nhất.

Ngoài các PHA trọng lượng phân tử cao được lưu giữ dưới dạng hạt dự trữ nội bào, một dạng PHA khác có trọng lượng phân tử thấp hơn và phức tạp

hơn so với các đại phân tử khác (được gọi là c-PHB: complex PHB) đã được phát hiện trong các tế bào prokaryote và eukaryote [25]. c-PHB chỉ được tìm thấy ở nồng độ thấp trong tế bào hoặc nằm trong màng tế bào. c-PHB tạo phức với canxi polyphosphate và được gắn trong màng vi khuẩn có thể tạo thành các kênh ion và cũng có thể liên quan đến khả năng của các tế bào vi khuẩn ví dụ như khả năng tiếp nhận DNA của chúng. Tuy nhiên thông tin về sinh tổng hợp c-PHB còn nhiều hạn chế. Trong một nghiên cứu gần đây, protein YdcS đã được xác định trong *Escherichia coli* thể hiện hoạt tính của PHB synthase. Phân tích cấu trúc cơ bản của YdcS gợi ý rằng nó thuộc về họ α - β -hydrolase bao gồm *PHB synthase* (được biết đến với tổng hợp PHB dự trữ), *lipase* và *esterases* và YdcS đã được đề xuất là *c-PHB synthase*.



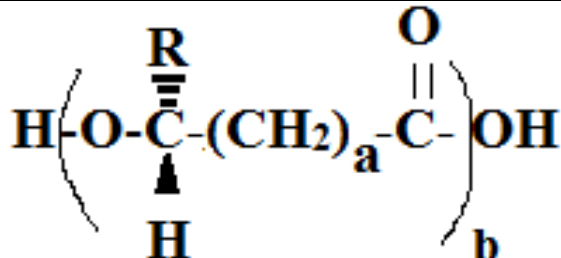
Hình 1.2. Sự đa dạng PHA.

1.1.3. Cấu trúc PHA

PHA là chuỗi polyester bao gồm các monome được liên kết bởi một liên kết este được thiết lập khi nhóm carboxyl của monomer được kết nối với nhóm hydroxyl của monomer lân cận [27]. PHA có cấu trúc tinh thể, kỵ nước với các monome không đối xứng. Chúng được lưu trữ dưới dạng hạt trong tế bào vi khuẩn và những hạt này chứa protein (1,87%), lipid (0,46%), polyeste (97,7%) [28]. Cấu trúc hóa học của PHA chung được thể hiện trong Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của một số loại PHA khác nhau được thể hiện trong Hình 1.4. Các loại nhựa sinh học phổ biến được liệt kê trong Bảng 1.1.

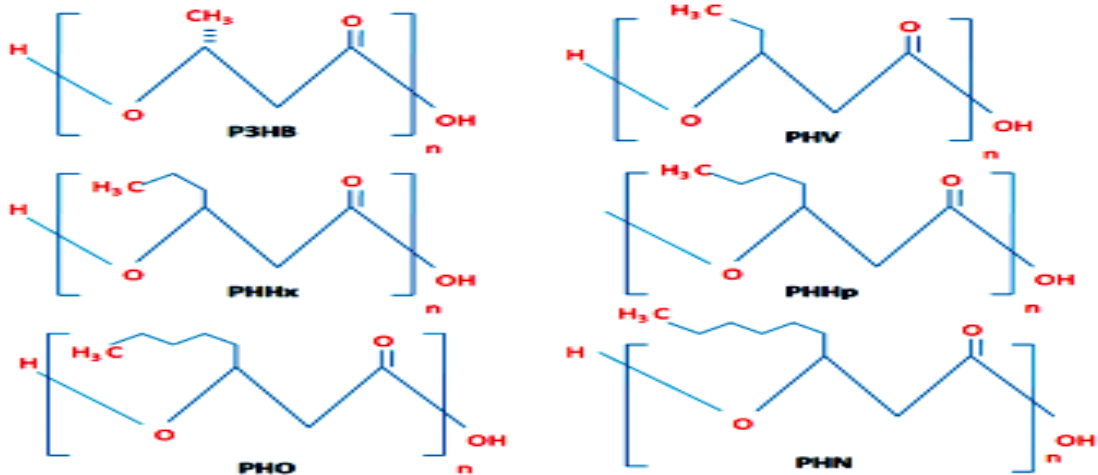
Bảng 1.1. Nhóm chức R và một số loại PHA

STT	R	a	Loại monomer
1	H	1	3-hydroxypropionate (3HP)
2	H	2	4-hydroxybutyrate (4HB)
3	H	3	5-hydroxyvalerate (5HV)
4	CH ₃	1	3-hydroxybutyrate (3HB)
5	C ₂ H ₅	1	3-hydroxyvalerate (3HV)
6	C ₃ H ₇	1	3-hydroxyhexanoate (3HHx)
7	C ₅ H ₁₁	1	3-hydroxyoctanoate (3HO)
8	C ₇ H ₁₅	1	3-hydroxydecanoate (3HD)
9	C ₉ H ₁₈	1	3-hydroxydodecenoate (3HDDe)
10	C ₉ H ₁₉	1	3-hydroxydodecanoate (3HDD)
11	C ₁₁ H ₂₃	1	3-hydroxytetradecanoate (3HTD)

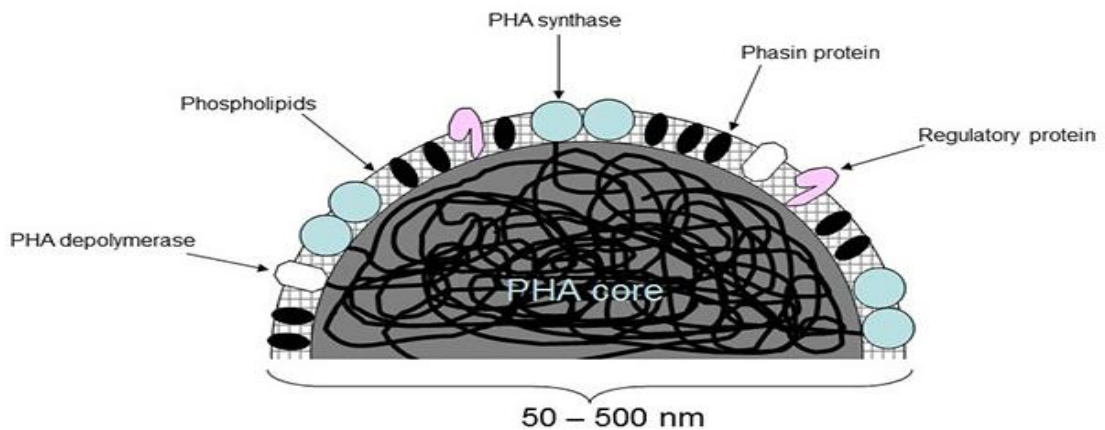
**Hình 1.3. Cấu trúc hóa học phân tử PHA**

Để tạo thành cấu trúc hạt PHA, các phân tử PHA kỵ nước được tổng hợp dưới dạng không có cấu trúc tinh thể (phân tử này sẽ có cấu trúc vô định hình với đường kính 200-500nm) nhằm tránh sự nhận biết của PHA depolymerase trong tế bào. Cấu trúc màng của PHA bao gồm: lớp phospholipid và 4 thành phần protein liên kết hạt của PhaC, PhaZi (intracellular PHA depolymerase), phasin (phaP) và protein điều hòa biểu hiện phasin PhaR [29]. Trên hạt PHA, nhiều protein có liên quan đến sinh tổng hợp, phân hủy, và sự ổn định của cấu trúc PHA được gắn kèm. Những protein này bao gồm PHA synthase (PhaC), PHA depolymerase (PhaZ), và PHA oligomer hydrolase (PhaY) [30], phasin protein như: PhaP, PhaI, PhaF, ApdA, GA14, and Mms16 [31], protein điều hòa PhaR, PhaQ [30] và protein kích hoạt PHA synthase, PhaM [32]. PhaY

được phát hiện là một enzym phân hủy PHA có mặt trong *C. necator* và *Ralstonia pickettii* và chủ yếu đặc hiệu phân hủy 3HB hơn là poly(3HB) [33] và theo một số báo cáo PhaY ở *C. necator* ở dạng hòa tan nhiều hơn dạng hạt gắn trên hạt PHA.



Hình 1.4. Cấu trúc của một số loại PHA



Hình 1.5. Cấu trúc hạt PHA

1.2. CÁC NHÂN TỐ THAM GIA SINH TỔNG HỢP NHỰA SINH HỌC

1.2.1. PHA synthase

Trong số các protein liên quan đến tổng hợp PHA, PHA synthase là enzyme chủ chốt chịu trách nhiệm về quá trình polymer hóa, ảnh hưởng đến thành phần monome, trọng lượng phân tử, và năng suất của PHA. Vì vậy, rất nhiều nghiên cứu đã tập trung tìm hiểu cơ chế trùng hợp và phát triển PHA synthase. Như được đề cập ở trên, một trong những đặc điểm quan trọng của PHA synthase là cho phép sử dụng một phổ rộng các cơ chất làm nguồn C thích hợp cho việc tổng hợp PHA. PHA synthases sử dụng (R)-3-hydroxyacyl-CoA làm cơ chất. Tùy thuộc vào tiêu đơn vị, trình tự axit amin và tính đặc hiệu cơ chất, synthase này có thể được phân thành bốn nhóm (lớp I - IV) khác nhau dựa

theo cấu hình tiểu đơn vị enzyme và chiều dài bề mặt carbon [17].

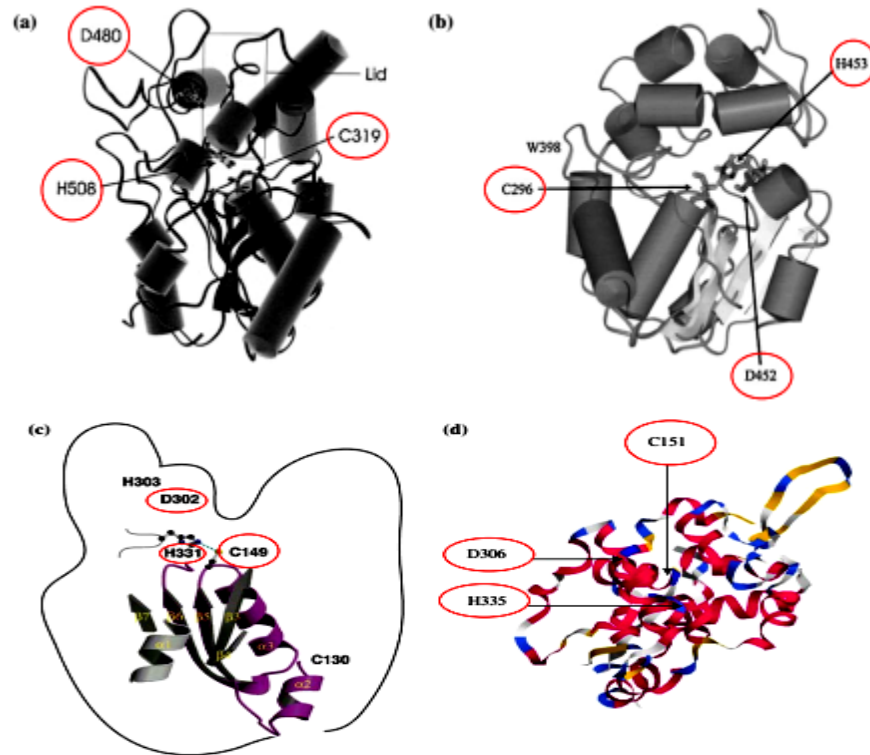
Nhóm I PHA synthase bao gồm 1 tiểu đơn vị (PhaC) có khối lượng phân tử 60 – 65 kDa và xúc tác hình thành các polymer đồng hình và nhóm này có mặt trong *C. necator* and *Aeromonas* spp., (như: *A. caviae*, *A. hydrophila*, và *A. punctata*). Nhóm I chủ yếu xúc tác hình thành các scl – monomer (C3-C5) và số ít mcl – monomer (C6 – C16) [34].

PHA synthase nhóm II chỉ bao gồm duy nhất protein PhaC có kích thước khoảng 60 kDa được mã hóa bởi gen *phaC1* và *phaC2* và xúc tác hình thành homopolymer [35]. PhaC nhóm II có mặt trong các loài thuộc *Pseudomonas* như *P. putida* và *P. aeruginosa* [35, 36].

PHA synthase nhóm III bao gồm hai dưới đơn vị khác nhau là PhaC (\approx 40 kDa) và PhaE (20 ÷ 40 kDa) được tìm thấy có mặt trong *Allochromatium vinosum* và *Desulfococcus multivorans* [37]. PHA synthase nhóm III sinh tổng hợp các scl – PHA và quá trình tổng hợp cần sự có mặt của cả PhaC và PhaE. PhaC của nhóm III có sự tương đồng 21 – 28% về trình tự với PhaC của PHA synthase nhóm I và nhóm II vì vậy nó được xem là dưới đơn vị xúc tác. Mặt khác, PhaE hiện nay vẫn chưa được biết rõ về chức năng cụ thể.

PHA synthase nhóm IV được biết bao gồm 2 dưới đơn vị PhaC (\approx 40 kDa) và PhaR (\approx 20 kDa) và để có thể hoạt động tổng hợp PHA thì nhóm này cần có sự có mặt của cả hai protein này [38, 39]. Nhóm IV có thể tổng hợp chủ yếu là scl – PHA trên một phổ rộng cơ chất giống như nhóm I và nhóm III và hầu hết các loài thuộc chi *Bacillus* như *B. megaterium* và *B. cereus* thuộc nhóm này [38, 39]. Một số PHA có thể có khả năng lên men một phổ rộng cơ chất và từ đó có thể tổng hợp đồng thời cả scl và mcl –PHA như *Thiocapsa pfennigii*, *A. caviae*, *Pseudomonas* sp. 61-3, and *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 [40, 41].

Cho đến nay, cấu trúc tinh thể chỉ được xác định cho các PHA synthase tổng hợp scl-PHA từ *C.necator* H16 và *Chromobacterium* sp. USM2 [34, 42, 43, 44].



Hình 1. 6. Cấu trúc PHA synthases

(a) nhóm I PhaC của *R. eutropha*, (b) Nhóm II PhaC của *P. aeruginosa*, (c) nhóm III PhaC của *A. vinosum* và (d) Nhóm IV PhaC của *B. cereus* SPV. Vị trí tâm xúc tác được khoanh đỏ (cysteine–aspartate–histidine) [45]

Bảng 1. 2. Các dưới đơn vị synthase tham gia tổng hợp PHA ở các loài khác nhau

Nhóm	Subunit	Loài	Cơ chất
I	PhaC ~60 – 73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i> <i>Sinorhizobium melioli</i> <i>Burkholderia sp.</i>	3HA _{scI} -CoA (~C3–C5) 4HA _{scI} -CoA, 5HA _{scI} -CoA.
II	PhaC ~60 – 65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>P. putida</i>	3HA _{mcI} -CoA (~ ≥C5)
III	PhaC PhaE	<i>Allochromatium vinosum</i> <i>Thiocapsa pfennigii</i> <i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	3HA _{scI} -CoA (3HA _{mcI} -CoA [-C6–C8], 4HA _{scI} -CoA, 5HA _{scI} -CoA)
IV	PhaC PhaR ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus sp. INT005</i>	3HA _{scI} -CoA

1.2.2. Protein phasin

Phasin là một nhóm các protein lưỡng phần bao gồm cả đặc tính ưa nước và kỵ nước có kích thước 14-24 kDa [46] đóng vai trò cấu trúc và điều hòa

trong sinh tổng hợp PHA. Một số phasin từ chủng vi khuẩn khác nhau được biết đến hiện nay như: PhaP từ *C. necator* và *B. megaterium* [30]. PhaI ở *P. putida* [31] PhaF của *P. oleovorans* và *P. putida* KT2442 [47, 48], ApdA từ *Rhodospirillum rubrum* [49], GA14 của *Rhodococcus ruber* [50] và Mms16 từ *Magnetospirillum gryphiswaldense* [51].

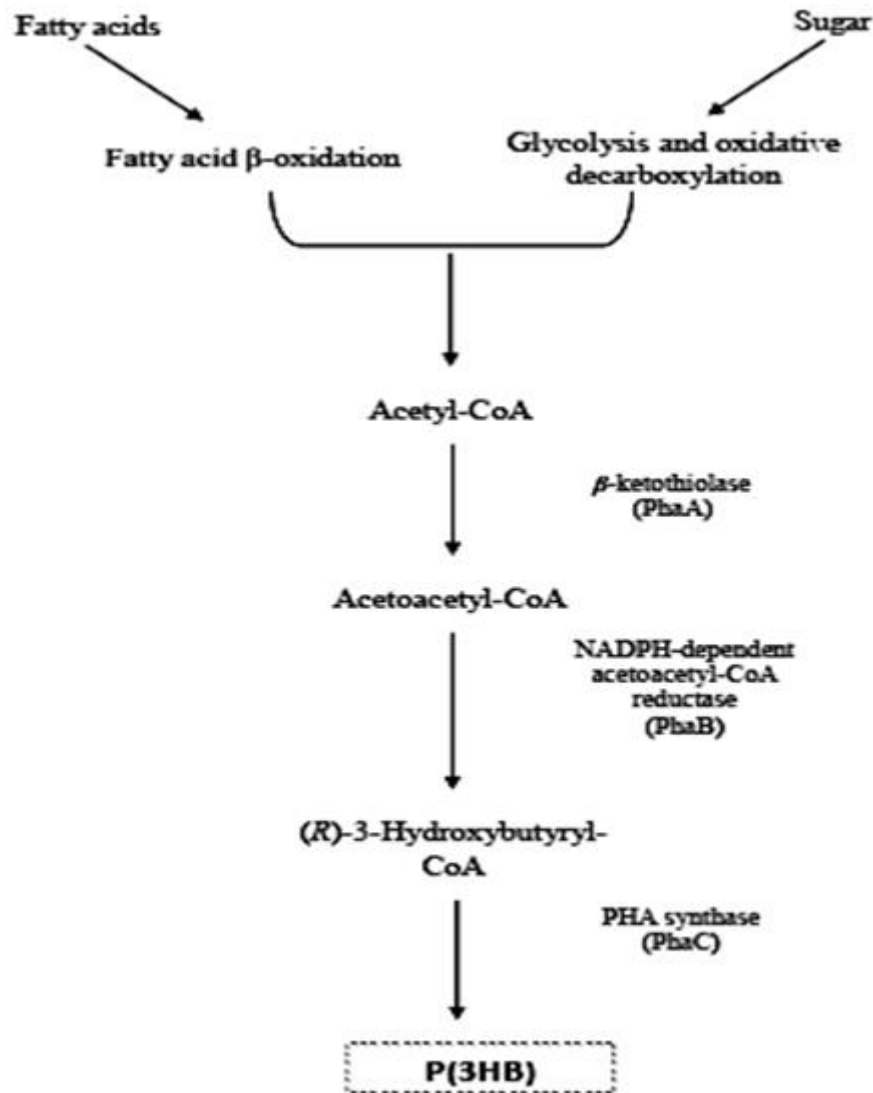
Phasin không đóng vai trò cho phản ứng trùng hợp PHA nhưng lại liên quan đến việc xác định kích thước và số lượng hạt PHA bằng cách ổn định bề mặt kỵ nước của hạt trong tế bào chất và đảm bảo cách ly hạt PHA trong suốt quá trình phân chia tế bào [46, 47, 48]. Trong *C. necator* và *B. megaterium*, mức độ biểu hiện của PhaP đã được báo cáo có liên quan đến PhaR và PhaQ [52].

1.2.3. Protein hoạt hóa

PhaM là một protein nhỏ khoảng 26 kDa và được tìm thấy trong *C. necator* với vai trò như một chất hoạt hóa của PHA synthase [32, 53]. Nghiên cứu gần đây cho thấy PhaM của *C. necator* có thể đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì hạt PHA ở các tế bào con sau khi phân chia nhờ sự có mặt của một dạng motif liên kết với nucleotid PAKKA ở đầu cuối C của PhaM [32, 53].

1.2. CON ĐƯỜNG SINH TỔNG HỢP PHA

Con đường sinh tổng hợp loại scl-PHA đơn giản nhất P(3HB) bao gồm ba phản ứng enzyme: phản ứng đầu tiên tham gia trùng ngưng của hai phân tử acetyl CoA, chủ yếu từ axit tricarboxylic (TCA) thành acetoacetyl-CoA bởi β -ketothiolase (mã hóa bởi phaA). Sau đó, acetoacetyl-CoA được chuyển thành 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA) với sự trợ giúp của các enzyme acetoacetyl-CoA reductase (mã hóa bởi phaB). Cuối cùng, synthase PHA (mã hóa bởi PhaC) polyme hóa các monome 3 hydroxybutyryl-CoA để tạo thành P3HB, với sự giải phóng tiếp theo của CoA. Trong trường hợp của sinh tổng hợp của SCL-copolyme như P(3HB-co-3HV), hai con đường tạo thành đến C4 monomer (3 hydroxybutyryl-CoA) hoặc C5 monomer (3-hydroxyvaleryl-CoA). Mặc dù quá trình trao đổi chất béo có mặt trong tất cả sinh vật tuy nhiên nguồn carbon có thể khác nhau do đó sẽ ảnh hưởng đến sản xuất MCL- PHA. Khả năng liên kết của các đơn vị hydroxyacyl-CoA khác nhau sẽ phụ thuộc vào PHA synthase (PhaC).



Hình 1.7. Con đường sinh tổng hợp P(3HB)

1.3. TÍNH CHẤT CỦA PHA

Phần lớn các PHA mang những thuộc tính vật lý tương đồng với các loại nhựa có nguồn gốc dầu mỏ như PP, PE, PS. Thuộc tính vật lý của PHA về cơ bản phụ thuộc vào thành phần cấu trúc chuỗi polymer và cấu trúc mạch C của đơn phân tạo nên chúng. Scl-PHA có độ kết tinh cao và độ bền kéo kém đặc biệt là PHB, loại scl-PHA phổ biến nhất trong tự nhiên [26]. Mcl-PHA là vật liệu vô định hình và đàn hồi thể hiện độ kết tinh và điểm nóng chảy thấp. Tỷ lệ của hai loại monome trong copolymer của PHA (scl-scl hoặc scl-mcl) giúp tăng tính linh hoạt và độ bền kéo của màng [26] giúp màng PHA có độ đàn hồi cao hơn theo thời gian đối với các màng tạo thành từ các copolymer ngẫu nhiên [54]. Các nhóm chức năng của PHA có thể được tiếp tục sử dụng để liên kết chéo làm thay đổi đáng kể tính chất của PHA này [18]. Bên cạnh đó, trọng lượng phân tử cao có thể làm tăng khả năng kéo dài của PHA [26].

Các PHA với thành phần 3HB cao thường có nhiệt độ nóng chảy cao, song mức độ linh động kém. Trong khi đó sự có mặt của phân đoạn 4HB, 3HV, hoặc các loại 3HA khác giúp tăng tính mềm dẻo và linh động của sản phẩm PHA với giá trị đàn hồi (GPa) và mức độ kéo dãn tới hạn (%) tăng lên. Tuy nhiên, thuộc tính nhiệt của các copolymer này có xu hướng giảm khi hàm lượng mol% các HA khác tăng lên. Nói chung, các phân tử này trở thành nhựa khi đun nóng và sẽ cứng lại khi làm lạnh nhiều lần, làm cho chúng trở nên ổn nhiệt. Một số tính chất đặc trưng của PHA như: chống chịu kém trước acid và bazơ nhưng chống chịu tốt trước tia cực tím, có thể tan trong cloroform và các hydrocacbon bị clo hóa, dễ dàng được ứng dụng trong y học vì có tính tương thích sinh học cao, nhiệt độ nóng chảy tại $>175\text{ }^{\circ}\text{C}$ và có điểm chuyển dịch lỏng-rắn tại $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, độ bền kéo là 40 MPa, gần bằng với polypropylene, không độc, ít bám dính hơn khi nóng chảy, vì vậy trong tương lai nó có thể là vật liệu tốt để chế tạo quần áo.

Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) rất có tiềm năng trong thương mại vì các tính chất vật lý của nó, rất giống với các chất dẻo gốc dầu mỏ. PHB là một loại nhựa nhiệt dẻo và có tính tương thích sinh học cao [55]. Ngoài ra, PHB không hòa tan trong nước và không bị thủy phân, điều này khác biệt với các polyme khác có nguồn gốc sinh học đồng thời tính thấm của nó đối với oxy rất thấp, điều này làm cho nó trở thành một vật liệu phù hợp để sử dụng trong quá trình sản xuất các sản phẩm nhạy cảm với oxy [56].

1.4. VI KHUẨN *BACILLUS MEGATERIUM*

Số lượng các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA được xác định vào khoảng trên 70 chi [57] và khoảng hơn 55 chi (vi khuẩn Gram âm và Gram dương) đã được sử dụng để sản xuất PHA [19, 58]. Ngoài vi khuẩn gram âm và gram dương, khả năng tích lũy PHA còn được phát hiện tích lũy trong vi khuẩn tự dưỡng hiếu khí (vi khuẩn lam) và kỵ khí (vi khuẩn tía lưu huỳnh và không lưu huỳnh), vi khuẩn cổ

Vi khuẩn gram âm trước đây được biết đến có khả năng tích lũy cao PHA và được ứng dụng để sản xuất thương mại tuy nhiên do chúng có chứa lớp lipopolysaccharide (LPS) trong vách tế bào nên sẽ lẫn trong quá trình tinh sạch PHA đồng thời chúng có các đặc tính kháng nguyên (do sự hiện diện của nội độc tố) dẫn đến phản ứng miễn dịch cơ thể. Ngược lại, vi khuẩn gram dương không có lớp LPS này và do đó có thể được sử dụng cho việc sản xuất các

polymer sinh học (PHA) đặc biệt cho các ứng dụng y sinh. Trong số vi khuẩn thuộc nhóm Gram dương, *Bacillus spp.* được quan tâm chú ý nhằm sử dụng sản xuất PHA thương mại ứng dụng trong mục đích y tế. Bên cạnh tính an toàn, *Bacillus* là ứng cử viên thích hợp bởi chúng có điều kiện lên men không quá nghiêm ngặt, khả năng tổng hợp cũng như hiệu quả thu hồi PHA cao.

Trong đó *Bacillus megaterium* là vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất. *Bacillus megaterium* là vi khuẩn gram dương, hình que, chiều dài lên tới 4 μm và đường kính 1,5 μm , không chứa các nội độc tố và được đánh giá là một vi khuẩn rất an toàn. Vi khuẩn này sinh trưởng và phát triển ở nhiệt độ từ 3 đến 45°C. *Bacillus megaterium* là một loại vi khuẩn sản xuất PHA nổi tiếng có khả năng chuyển đổi các nguồn carbon thành chiều dài chuỗi ngắn (scl)-polyme (ví dụ: poly(3-hydroxybutyrate)) hoặc sclcopolyme (ví dụ: poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate)). Phương pháp lên men truyền thống để sản xuất PHA không đủ hiệu quả để đạt được năng suất phù hợp với mục đích công nghiệp. Ngày nay, việc can thiệp vào con đường sinh tổng hợp nhựa là công cụ mạnh mẽ nhất để tăng sự tổng hợp nhựa sinh học.

Netu Israni và cộng sự (2020) đã nghiên cứu tạo chủng *B. megaterium* tăng trao đổi chất Ti3 nhằm tăng sự tổng hợp PHA cao hơn từ 3 đến 4 lần. Năm 2022, Milos Kacanski và cs đã nghiên cứu sử dụng *B. megaterium* để tạo PHA, kết quả thu được trọng lượng tế bào khô lên tới 19,05 g/L chứa đến 70,21% PHA.

1.5. ỨNG DỤNG CỦA PHA

Polyhydroxyalkanoat được tạo ra trong tế bào vi khuẩn làm nguyên liệu dự trữ năng lượng bởi nhiều vi khuẩn. Thành phần PHA của vi khuẩn bao gồm monome khác nhau các đặc tính vật lý từ dẻo đến giòn và có khả năng đàn hồi nên phù hợp để dùng làm nguồn vật liệu thay thế nhựa có nguồn gốc dầu mỏ. Bởi khả năng lên men thu PHA từ nguyên liệu tái tạo và khả năng phân hủy sinh học, PHA trở thành vật liệu thân thiện với môi trường có thể thay thế nhựa thương mại. Gần đây, PHA đã cho thấy các ứng dụng tiềm năng rộng rãi trong các sản phẩm như: bao bì thân thiện với môi trường, nông nghiệp, và các ngành công nghiệp thực phẩm [16, 18], tác nhân kiểm soát sinh học, nhiên liệu sinh học, đóng gói và y sinh như chất chống loãng xương, cấy ghép phân hủy sinh học, chất vận chuyển thuốc, thiết bị y tế và kỹ thuật mô... [72, 73]. Dưới đây là ứng dụng của PHA trong với hai lĩnh vực chủ yếu:

1.5.1. Ứng dụng trong đời sống sản xuất

Trong lĩnh vực sản xuất các vật dụng phục vụ đời sống, PHA đã và đang cho thấy vai trò to lớn của mình. PHA được sử dụng ban đầu để sản xuất các vật dụng hàng ngày chẳng hạn như các lọ đựng dầu gội đầu, dao cạo râu, vỏ điện thoại,... Nhiều sản phẩm khác nhau có nguồn gốc PHA đã được phát triển bởi các công ty như Procter & Gamble, Biomers, Metabolix,... Các sản phẩm như bình chứa dầu gội đầu, sản phẩm dưỡng tóc, dao cạo dùng một lần cũng đã được sản xuất dựa trên nền tảng sản phẩm PHB thương mại BIOPOL của Metabolix (Mỹ). Các ứng dụng khác bao gồm lớp phủ chống nước trên bìa cứng hoặc giấy, công nghiệp chế biến thực phẩm và làm chất phụ gia trong mỹ phẩm [74].

1.5.2. Ứng dụng trong y sinh

Bên cạnh các sản phẩm gia dụng thân thiện môi trường, các sản phẩm trong lĩnh vực y tế có nguồn gốc từ PHA đã được sản xuất. Trong đó, PHB được biết có thể phân hủy thành 3-hydroxybutyric acid đây một hợp chất trung gian có trong sinh vật bậc cao chính vì vậy có tính tương thích sinh học cao, không gây độc. Trong 20 năm qua PHA và vật liệu tổng hợp đã được sử dụng cho nhiều ứng dụng y sinh như chỉ khâu, kim ghim, đinh vít, tấm (xương), dây treo, miếng dán, dây dẫn thần kinh, chất làm đầy, băng gạc, chất thay thế cho chấn thương da, dây chằng, cấy ghép tế bào, gạc cầm máu, đinh ghim chỉnh hình, tái tạo mô, tái tạo sụn chêm, chốt và lồng hợp nhất cột sống [75] không gây tác dụng độc hại và không tạo ra phản ứng đáp ứng miễn dịch của cơ thể với vật liệu này. Hiện nay, không có nghiên cứu nào được chứng minh về chất sinh ung thư khi cấy PHA in vivo, mặc dù PHA thúc đẩy tăng sinh tế bào. Sự pha trộn của các PHA có kích thước khác nhau giúp giữ sự ổn định và nâng cao khả năng phân hủy sinh học [28]. Ngoài ra, PHA còn được ứng dụng như là các chất dẫn thuốc cũng như là chất điều khiển quá trình giải phóng thuốc. Khi phân hủy PHA sẽ tạo ra nhiều loại đơn phân khác nhau với cấu trúc mạch C và chiều quay quang học mang nhóm chức năng hydroxyl khác nhau. Các chất này được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như sản xuất các hợp chất quý (pheromone, kháng sinh, hợp chất thơm, vitamin) an toàn với con người [76]. Ngoài ra, các đơn phân từ PHA có thể được sử dụng như là một số loại thuốc trong quá trình điều trị [16].

1.6. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRÊN THẾ GIỚI

Mang nhiều đặc tính giống như nhựa tổng hợp có nguồn gốc từ dầu mỏ, với ưu điểm bị phân hủy bởi các vi sinh vật để tạo thành CO₂ (hoặc CH₄) và H₂O khi được thải ra môi trường, polyhydroxyalkanoates (PHA) đã và đang là vật liệu nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học, nhà sản xuất và chính phủ các nước trên thế giới. Gần đây, số lượng các nghiên cứu về PHA đã tăng lên nhanh chóng với rất nhiều các phát minh và công bố trên thế giới.

Hiện nay các nghiên cứu hầu hết tập trung vào các mục tiêu: cải tiến công nghệ lên men nhằm nâng cao năng suất, cải tiến công nghệ thu hồi và tách chiết đạt hiệu suất – thân thiện với môi trường, tận dụng nguồn nguyên liệu dư thừa và các loại nguyên liệu phế thải từ nông nghiệp và công nghiệp chế biến thực phẩm.

Hiện nay, công nghệ sinh học công nghiệp thế hệ tiếp theo (NGIB) là nền công nghệ sinh học dựa trên các chất cực đoan (halophile). Những vi sinh vật phát triển trong điều kiện khắc nghiệt có khả năng chống nhiễm khuẩn. Trong số đó, các vi khuẩn ưa mặn có thể phát triển nhanh chóng ở mức trung bình với nồng độ muối cao và dưới pH cao, do đó chúng có thể kháng với một số vi sinh vật khác.

Vi khuẩn ưa mặn đã được nghiên cứu khả năng phát triển trong môi trường nước biển ít nhất hai tháng khi nuôi liên tục, mở, không vô trùng vẫn không bị nhiễm. Giá trị của chúng có thể được cải thiện tốt hơn nữa bằng cách can thiệp di truyền. Các công cụ kỹ thuật phân tử đã được phát triển để tạo *Halomonas spp* tái tổ hợp sản xuất protein ngoại lai, các hợp chất phân tử nhỏ gồm axit 5-aminolevulinic, các chất đồng trùng hợp PHBV gồm 3-hydroxybutyrat (3HB) và 3-hydroxyvalerate (3HV) với hiệu quả tạo PHA cao. Công nghệ sinh học dựa trên các chất cực đoan được nuôi cấy dưới điều kiện không vô trùng, mở chắc chắn sẽ thúc đẩy sản xuất sinh học với chi phí giảm thiểu và do đó cải thiện khả năng cạnh tranh.

Với các lý do trên, chúng tôi đề ra mục tiêu phân lập được chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp PHA từ nước biển và mẫu trầm tích biển, chủng vi sinh vật thu được có khả năng sử dụng nguồn phụ phẩm chế biến cá để sinh trưởng và tổng hợp PHA. Trên cơ sở chủng phân lập được, áp dụng các công nghệ chỉnh sửa gen mới tác động vào các con đường trao đổi chất, con đường tổng hợp PHA; hoặc tạo ra các chủng vi khuẩn tái tổ hợp mang các gen mã hóa cho các enzyme của con đường tổng hợp PHA nhằm tạo ra chủng vi sinh vật

có khả năng tổng hợp PHA cao. Từ cơ sở chủng thu được, phối kết hợp tạo ra các chế phẩm sinh học chứa các chủng có khả năng tổng hợp PHA từ phụ phẩm cá, chế phẩm tạo ra có thể sử dụng thu PHA cho nhiều mục đích ứng dụng khác nhau

1.7. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC

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

Năm 2010, Thanh Mai và cs đã phân lập được chủng vi khuẩn V23-X1.1 và định danh đến loài *Bacillus cereus*. Chủng vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1-20 được nhóm nghiên cứu Viện Công nghệ Sinh học sử dụng trong nghiên cứu sản xuất P(3HB) vào năm 2009. Gần đây, nhóm nghiên cứu của TS. Trần Hữu Phong đã phân lập được một số chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp PHA cao từ đất, lên men và phân tách được PHA đạt độ tinh khiết cao.

Được đánh giá là ngành công nghiệp có mức độ tăng trưởng cao trong giai đoạn 2010-2015, ngành nhựa Việt nam đặt mục tiêu đến năm 2025 mức độ tăng trưởng/năm của ngành nhựa luôn đạt trên 10% (theo quyết định 2992/QĐ-BCT). Theo thống kê của Hiệp hội nhựa Việt Nam thì đến năm 2011 có khoảng 2000 công ty nhựa đang hoạt động (80% cỡ vừa, nhỏ và do tư nhân mở), phân

bố chủ yếu ở các tỉnh phía Nam như thành phố Hồ Chí Minh, Bình Dương, Đồng Nai,... Công nghiệp sản xuất nhựa phân hủy sinh học và các sản phẩm từ nhựa phân hủy sinh học ở Việt Nam hiện nay hầu như chưa có và nhỏ lẻ. Một số sản phẩm bao bì có gắn nhãn phân hủy sinh học đã xuất hiện trên thị trường do các công ty trong nước sản xuất như túi phân hủy sinh học Alta (Công ty Cổ phần Văn Hóa Tân Bình - Alta), zero plastic (Cty TNHH và in ấn Bao bì Đình Toàn), túi phân hủy sinh học D₂W (Cty TNHH SXTM Hồng Tiến Thành). Hầu hết các sản phẩm này đều có thành phần chủ yếu là PE và PP được bổ sung chất phụ gia, do đó quá trình phân hủy của chúng có bản chất là phân hủy do môi trường mà không do sự tác động của hoạt động vi sinh vật. Bên cạnh đó, hầu hết nguồn nguyên liệu cho công nghiệp nhựa tự hủy của Việt Nam được nhập khẩu từ nước ngoài với chi phí cao. Chính vì thế, nghiên cứu và sản xuất nhựa sinh học ở Việt Nam cần dành nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học và đặc biệt là sự thay đổi trong chính sách của chính phủ hơn nữa.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Đề tài được tiến hành nghiên cứu tại Phòng Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.2.1. Chủng giống

Bảng 2.1: Các chủng nghiên cứu

Chủng	Genotype
<i>E. coli</i> JM109	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK-mK+) supE44 relA1 D(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZDM15]</i>
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK⁻ mK⁺), λ-</i>
<i>E. coli</i> TOP10F	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ-</i>
<i>B. megaterium</i> DV01	Chủng có trong bộ sưu tập giống, phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học

2.2.2. Plasmid

Các plasmid nghiên cứu được cung cấp bởi Addgen và được lưu trữ tại phòng công nghệ tế bào động vật

2.2.3. Hóa chất

Hóa chất chính: Cao nấm men (Ấn Độ), cao thịt (Trung Quốc), pepton (Trung Quốc), glucoza dùng trong lên men (Việt Nam), SDS, Tris-HCl, Tris – base, EDTA (Mecrk, Đức), isoamylalcohol, chloroform (Roth, Đức); phenol, EtBr (Ethidium bromide), glycerol, agarose (Gribco, Mỹ); methanol, ethanol, K₂HPO₄, KH₂PO₄, (Merk, Đức); cao nấm men, peptone, d-NTPs (Promega, Mỹ); MgSO₄ (BioLabs, Anh); NaOH, NaCl, potassium acetate, acetic acid, glucose, hóa chất trong bộ kit tinh sạch ADN (Qiagen, Đức); yeast nitrogen base (YNB, Difco), ammonium sulfate, polyacrylamide, Bis-acryamide (Sigma), glucose (Việt Nam), amoni citrat (Trung Quốc), agar (Việt Nam), MgSO₄.7H₂O (Trung Quốc), MnSO₄.H₂O (Trung Quốc), K₂HPO₄.3H₂O

(Trung Quốc), CH₃COONa (Trung Quốc), NaCl (Việt Nam), NaCl, KCl, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, Urea, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂, MgCl₂, ZnSO₄, H₃BO₃, FeCl₃, CuSO₄, NiSO₄, marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific),...

2.2.4. Thiết bị

Một số thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: máy PCR (Đức), máy ly tâm Eppendorf, máy điện DNA (Bio-Rad, Mỹ), máy Speed-Vac, máy điện di protein (Bio-Rad), tủ cấy vô trùng, máy lắc ổn nhiệt (New Jersey, Mỹ), máy ly tâm lạnh cỡ lớn (Sorvall RC5B, Mỹ), máy đo pH (Metler, Thụy Sĩ), máy khử trùng, tủ nuôi cấy....

2.2.5. Môi trường

Môi trường cho nuôi cấy *E. coli*, *B. megaterium*

Môi trường cơ bản cho nuôi cấy các chủng vi sinh vật là môi trường Luria Bertani (LB g/l): pepton: 10 g/l; cao men: 5g/l; NaCl: 5g/l; pH=7-7.2, môi trường LB đặc: LB lỏng và agar 15 g/l.

Đối với chủng Chủng *Bacillus megaterium* DV01: Chủng nghiên cứu khi bảo quản lạnh được hoạt hóa được trên môi trường LB.

Đối với chủng tái tổ hợp nuôi cấy trên môi trường có kháng sinh thích hợp.

Môi trường nuôi cấy tạo tế bào *B. megaterium* khả biến

Tế bào khả biến của *B. megaterium* được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường pha Lag Paris với thành phần: K₂HPO₄ (60 mM); KH₂PO₄(40 mM), trisodium acetate (3 mM); kali glutamate (20 mM); Fe(III)-NH₄-citrate (2.2 mg/l); casamino acid (0.1%); glucose (1%); tryptophan (20 mg); MgSO₄ (3 mM).

Môi trường và điều kiện nuôi cấy chủng thu PHA

Khoảng 1: Môi trường nuôi cấy chủng cho lên men pha 1 được xác định là môi trường khoáng cơ bản (Rodríguez-Contreras et al. 2013) với một số cải tiến các thành phần (g/l): Na₂HPO₄.2H₂O (4,5); KH₂PO₄ (1,5); MgSO₄.7H₂O(0,2); (NH₄)₂SO₄ (2); CaCl₂.2H₂O (0,02); NH₄Fe(III)Citrate (0,05); cao nấm men (5); peptone (5); glucose (10).

Khoảng 2: là môi trường lên men Pha 2 thu PHA (g/l) với các thành phần Na₂HPO₄.2H₂O (4,5); KH₂PO₄ (1,5); MgSO₄.7H₂O (0,2); (NH₄)₂SO₄ (2); NH₄Fe(III) Citrate (0,05); glucose (10); axit citric (1); vi lượng (2 ml). Dung dịch vi lượng 0,1ml với các thành phần (mg/L): ZnSO₄.7H₂O (10);

MnCl₂.4H₂O(3); H₃BO₃(30); CoCl₂.6H₂O (20); CuCl₂.2H₂O(1); NiCl₂.6H₂O (2); Na₂MoO₄.2H₂O(3).

2.2.6. Chất bổ sung

Các môi trường dinh dưỡng được pha bằng nước cất và sau khi pha được khử trùng 20 phút ở 121°C, 1atm. Đối với các môi trường để chọn lọc khuẩn lạc, kháng sinh được bổ sung vào sau khi môi trường được làm nguội còn khoảng 40 – 50°C. Kháng sinh các chất bổ sung cần thiết trong nghiên cứu này được pha theo khuyến cáo của các hãng cung cấp đưa ra và được trình bày trong Bảng 2.2

Bảng 2. 2: Các chất bổ sung sử dụng cho môi trường chọn lọc

Cơ chất	Dung dịch pha	Nồng độ dung dịch gốc	Nồng độ cuối cùng
Ampicillin	H ₂ O khử ion	50 mg/1 ml	60 µg/ml
Tetracycline	H ₂ O khử ion	100 µg/100 l	6.5 µg/ml

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Chuẩn bị chủng giống

Chủng vi khuẩn bảo quản trong glyceryl ở tủ -20°C được hoạt hóa trên môi trường dinh dưỡng sau đó cấy chuyển ra các ống thạch nghiêng chứa môi trường khoáng 2, nuôi ở 37°C trong 24 giờ sau đó thu chủng và bảo quản ở 4°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nuôi cấy lắc thu chủng nghiên cứu PHB: chủng nuôi cấy qua đêm sau đó hút bổ sung 1% (v/v) vào môi trường nuôi cấy *B. megaterium*, lắc trong 8h sau đó ly tâm thu tế bào và rửa với nước cất khử trùng. Sau đó tiến hành bổ sung sinh khối vào môi trường khoáng 2. Nuôi cấy lắc thu PHB được thực hiện trong bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường khoáng 2, nuôi cấy ở 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian lắc tối đa cho các nghiên cứu là 72 – 96 giờ.

2.3.2. Tách chiết DNA tổng số

Để có thể thu sinh khối tế bào cho thí nghiệm này, chủng vi sinh vật được nuôi qua đêm trên môi trường LB sau đó ly tâm thu sinh khối sau đó tiến hành tách chiết DNA tổng số. Ly tâm thu sinh khối tế bào trong 5 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút. Tế bào được hòa tan đều trong hỗn hợp dung dịch A và được ủ ở 37°C trong 1 h. Sau khi ủ, bổ sung 100 µl NaCl 5 M rồi trộn đều. Sau bước này,

80 µl dung dịch CTAB / NaCl được bổ sung, trộn đều và mẫu được ủ trong 10 phút ở 65°C. Bổ sung 2 V (v/v) dung dịch chloroform: isoamyl alcohol (24:1), đảo đều và ly tâm thu pha nổi phía trên sang Eppendoff mới, tiếp tục lặp lại bước này lần 2. DNA được thu bằng cách tủa với isopropanol (0,6 thể tích (v/v)) trong khoảng 1 h ở -20°C và được rửa lại bằng 500 µl ethanol (70%). DNA được rửa, làm khô và hòa tan trong 100 µl TE. Dịch DNA được bảo quản ở -20°C để dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.3. Tách chiết DNA plasmid *E. coli*

Plasmid từ *E. coli* được tách theo phương pháp Alkaline của Sambrook với các bước tiến hành: Dịch tế bào nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (18-24h) được ly tâm 6000 v/p trong 10 phút thu tủa tế bào và hòa tan trong 100 µl sol I sau đó bổ sung thêm 200 µl sol II, đảo nhẹ 5-10 lần rồi ủ trong đá 15 phút. Tiếp tục bổ sung 150 µl sol III, đảo nhẹ 5-10 lần rồi ủ trong đá 15 phút sau đó ly tâm 13000 v/p trong 15 phút và thu dịch nổi sang ống Eppendoff mới. Bổ sung 500 µl dung dịch Chloroform: Isoamylalcohol được pha theo tỷ lệ 24:1 vào dịch nổi, vortex nhẹ nhàng sau đó ly tâm 13000 v/p trong 15 phút (2 lần) và hút dịch nổi sang Eppendoff mới, bổ sung 2 V cồn tuyệt đối hoặc 1 V isopropanol, đem ủ ở tủ -20°C từ 30-60 phút, ly tâm 13.000 v/p trong 20 phút thu cặn DNA. DNA kết tủa được rửa hai lần bằng cồn 70° (200 µl) và ly tâm 13000 v/p trong 15 phút. DNA thu được được làm khô và hòa tan kết tủa trong 30-50 µl nước hoặc TE và bảo quản ở -20°C.

Tách plasmid theo GeneJET Plasmid Miniprep Kit: DNA plasmid *E. coli* được tách bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit của Thermo và các phương pháp đưa ra bởi hãng.

2.3.4. Tách chiết DNA plasmid *Bacillus*

Chủng vi sinh vật được nuôi cấy qua đêm (16 – 20 h) trên môi trường chọn lọc sau đó tiến hành ly tâm 6000 v/p, 10 phút, loại dịch thu sinh khối tế bào. Bổ sung 200 µl SET có bổ sung 5 mg/ml vào sinh khối và vortex đều và ủ 37°C trong 10 phút. Bổ sung 350 µl Sol II đảo nhẹ, ủ 5 phút sau đó tiếp tục bổ sung 350 µl Na-acetate 3M trong đá, vortex trong 30 giây và ly tâm 10 phút, 12.000v/phút. Hút 750 µl dịch nổi sang ống Eppendoff mới, bổ sung 650 µl P: C: I (25:24:1), vortex trong 1 phút và ly tâm 15 phút ở 12.000v/p và hút dịch nổi (Pha I) sang ống Eppendoff mới tiếp tục bổ sung 620 µl C : I (24:1), vortex trong 1 phút sau đó ly tâm 15 phút ở 12.000 v/p và hút tiếp 550 µl dịch nổi sang

Eppendoff mới. Để kết tủa plasmid, bổ sung 550 μ l Isopropanol lạnh, đảo nhẹ một vài lần, ly tâm 30 phút loại dịch. Bổ sung 500 μ l cồn 70° để rửa kết tủa, ly tâm 15 phút thu DNA. DNA được làm khô và hòa trong 50 μ l TE và bảo quản ở tủ - 20°C để dùng cho nghiên cứu tiếp theo.

2.3.5. Phương pháp PCR

Bảng 2. 3: Các primer sử dụng

Tên môi	5' – 3'
PhaC – For	ATGGCAATTCCTTACGTGCAAGA
PhaC – Rev	TTATTTAGAGCGTTTTTC
Môi can thiệp trao đổi chất	
For2-PhaC – SpeI	GGTGTGTACTAGTATGGCAATTCCTTACG
Rev2-PhaC – SphI	CGCTTCGCATGCTTATTTAGAGCGTTTT

Các cặp môi đặc hiệu cho các gen đích trên Bảng 2.3 được thiết kế dựa trên trình tự gen được công bố trên ngân hàng gen quốc tế. Sau đó Phản ứng PCR trong nghiên cứu được thực hiện dưới điều kiện PCR tiêu chuẩn với các thành phần phản ứng gồm DNA hoặc plasmid DNA (\approx 1 ng) làm khuôn, môi (20 pmol), dNTP (0,2 mM mỗi loại), Taq-polymerase (2,5 U) hoặc Pfu – polymerase (2,5 U), đệm chạy PCR có chứa MgCl₂ hoặc MgSO₄ tùy theo khuyến nghị của nhà sản xuất đối với mỗi loại polymerase. Sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%.

Chu trình chạy: 95°C trong 5 phút; 95°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây, 72°C trong 45 giây (lặp lại 35 chu kỳ); 72°C trong 8 phút; 10°C trong 30 phút.

2.3.6. Cắt DNA bằng enzyme giới hạn và gắn DNA

Phản ứng cắt enzyme giới hạn và các phản ứng gắn nối DNA được thực hiện với các enzyme được cung cấp bởi New England Biolab hoặc các enzyme của Thermo theo hướng dẫn của hãng sản xuất. Các phản ứng với enzyme giới hạn có thể thực hiện lên đến 16 h và trong một số trường hợp enzyme giới hạn được bất hoạt trong 20 phút ở 65°C.

Bảng 2.4. Các phản ứng cắt và gắn bằng enzyme giới hạn

Loại thí nghiệm	Ghi chú
Cắt mở vòng vector	
Buffer Cut smart: 4ul	

Vector: 12ul		Các mẫu được ủ cắt 37°C qua đêm
H ₂ O: 18ul		
SpeI: 3ul		
SphI: 3ul		
Tổng: 40ul		
Phản ứng cắt gene tạo đầu cắt		
Buffer Cut smart: 4ul		Các mẫu được ủ cắt 37°C qua đêm
Gene: 14ul		
H ₂ O: 16ul		
SpeI: 3ul		
SphI: 3ul		
Tổng: 40ul		
Thành phần phản ứng lai gene vào vector pPSP6		
Buffer T4: 1ul		Ủ 22°C trong 1 giờ rồi 16°C qua đêm
Vector: 2.5ul		
Gene: 5.5ul		
Enzym T4: 1ul		
Tổng: 10ul		

2.3.7. Biến nạp DNA plasmid vào chủng chủ *E. coli*

DNA plasmid được biến nạp vào chủng chủ *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt. Chuẩn bị tế bào khả biến: Tế bào chủng chủ được chuẩn bị mới trong 24 h bằng cách cấy vạch lên đĩa Petri, sau đó được cấy chuyển sang môi trường LB lỏng ở 37°C, lắc 200 vòng/phút trong 2h. Sau đó ly tâm ở 4°C, 5.000 v/p trong 4 phút. Loại dịch và hòa tan tế bào trong 300 µl CaCl₂ 100 mM, ủ đá trong 30 phút. Tiếp tục tiến hành ly tâm 2 phút ở 5.000 v/p, loại dịch và hòa cạn tế bào trong 60 µl CaCl₂ 100 mM, ủ trên đá ít nhất 30 phút. Sau đó bổ sung 5 µl vector đã ligate, đặt trên đá 30 phút. Tiến hành sốc nhiệt ở 42°C trong vòng 1 phút, ủ trên đá 5 phút. Bổ sung 150 µl LB lỏng nuôi cấy ở 37°C trong vòng 1 giờ. Dịch tế bào được gặt lên đĩa môi trường LB đặc có kháng sinh, Xgal, IPTG sau đó ủ qua đêm 37°C và quan sát kết quả.

2.3.8. Biến nạp DNA plasmid vào chủng chủ *Bacillus*

Sử dụng phương pháp biến nạp pha lag để biến nạp DNA plasmid vào chủng chủ *Bacillus*. Nuôi *B. megaterium* DV01 trên môi trường Paris đến khi

$OD_{580} = 1$. Hút 0,5 ml dịch nuôi cấy vào các ống và bổ sung 0,1 – 1 μ g DNA plasmid và ủ 1-3h ở 37°C sau đó trang trên đĩa LB + kháng sinh và nuôi ở 37°C qua đêm. Quan sát và thu kết quả.

2.3.9. Phương pháp tách PHA

Sinh khối tế bào sau nuôi được thu bằng ly tâm và rửa 2 lần với dung dịch đệm phosphate, pH 7,2 và sấy khô. Sau đó tế bào được hòa lại trong 0.5 ml nước RO thích hợp và tiến hành gia nhiệt trong 15 phút. Bổ sung 2 ml dung dịch ethanol/acetone tỷ lệ 1:1 và ngâm ủ khoảng 2h và chuyển dịch tế bào sang ống thủy tinh có nút xoáy. Bổ sung 5 ml chloroform, xoáy chặt nắp và tiến hành lắc 5-6h để nhựa sinh học được hòa tan hoàn toàn sau đó thu pha chứa chloroform chuyển ra ống thủy tinh mới. Dịch chloroform chứa PHA được bổ sung 5 - 8V methanol lạnh và để trong tủ - 20°C trong ít nhất 30 phút sau đó ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 20 phút thu cặn PHA. Bổ sung ethanol 70% ly tâm lặp lại 2 lần để loại dung môi. Cặn được sấy khô 50°C trong tủ hút sau đó thu PHA và bảo quản cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.10. Phương pháp Crotonic xác định hàm lượng nhựa sinh học

Lượng PHA trong một mẫu có thể được xác định bằng phương pháp đo quang phổ bằng cách chuyển đổi PHA thành axit crotonic khi xử lý với axit sulfuric. Dung dịch chuẩn axit crotonic được chuẩn bị với các nồng độ tăng dần khác nhau. Độ hấp thụ của axit crotonic được đo ở bước sóng 235 nm (Law and Slepecky, 1961). Để thực hiện, tế bào vi sinh vật sau khi đã xử lý được bổ sung dịch chloroform để hòa tan các hạt PHA. Lượng nhỏ của dịch chiết (0,05-0,1 mL tùy thuộc vào lượng nồng độ PHB ước tính trong mẫu) được cho vào ống nghiệm và bay hơi cloroform. Thêm 7,5 mL H_2SO_4 . Hỗn hợp được gia nhiệt ở 100 °C trong 10 phút để chuyển đổi hoàn toàn PHB thành axit crotonic, được định lượng bằng cách đo độ hấp thụ của hỗn hợp được làm lạnh ở mức 235 nm. Lập đường chuẩn bằng cách sử dụng PHB tinh khiết đo ở bước sóng 235 nm.

Mẫu chuẩn được sử dụng là PHB (sigma) được hòa tan trong chloroform với hàm lượng 8 mg/ml sau đó tính các nồng độ thích hợp để dựng đường chuẩn. Kết quả xác định hàm lượng PHA trong dung dịch được xác định theo phương trình xây dựng được. Mẫu đối chứng chuẩn là chloroform + H_2SO_4 và được xử lý như quy trình trên.

2.3.11. Phương pháp nuôi sinh khối vi sinh vật tạo nhựa sinh học

Các chủng tái tổ hợp tạo thành được nuôi tăng cường sinh khối trong môi

trường khoáng pha 1 có bổ sung kháng sinh thích hợp sau 14-18h nuôi cấy. Sau đó, sinh khối được ly tâm tốc độ 5 000 vòng/phút trong 5 phút và chủng được chuyển sang môi trường khoáng pha 2. Sau thời gian nuôi cấy thích hợp tiến hành bổ sung chất cảm ứng và đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng tuyển chọn

Quá trình lên men thu sinh khối và tạo nhựa được thực hiện trong bình tam giác thủy tinh kín vô trùng, tại điều kiện 37°C đối với chủng *B. megaterium* tái tổ hợp, lắc 120 vòng/phút.

2.3.12. Phương pháp phân tích cấu trúc nhựa sinh học thu được từ vi khuẩn

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): được ghi bằng máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer với chất chuẩn nội là TMS, dung môi đo CDCl_3 .

Phổ hồng ngoại (IR): đo trên máy FTIR-Affinity-1S của hãng Shimadzu, theo phương pháp ép viên KBr

2.3.13. Phân tích thống kê

Các thí nghiệm đều được lặp lại và được thực hiện ba lần. Các số liệu trong nghiên cứu đều được thể hiện dưới dạng số trung bình bằng phần mềm Microsoft Excel. Các thí nghiệm được xử lý thống kê và đồ thị được vẽ bằng Microsoft Excel.

2.3.14. Phương pháp tinh sạch DNA từ gel agarose

Sản phẩm DNA được chạy điện di trên gel agarose sau đó cắt băng sản phẩm cần quan tâm và tiến hành thôi gel bằng GeneJET Gel extraction Kit theo protocol được cung cấp của hãng sản xuất.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN GEN ĐÍCH ĐỂ CAN THIỆP GEN VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN ĐÍCH

Sinh tổng hợp của polyhydroxyalkanoates (PHA) đã được nghiên cứu từ những năm 1920. Các con đường sinh tổng hợp PHA đã được nghiên cứu và rất nhiều các phương pháp khác nhau nhằm can thiệp vào con đường này nhằm nâng cao hiệu quả tăng cường tích lũy PHA.

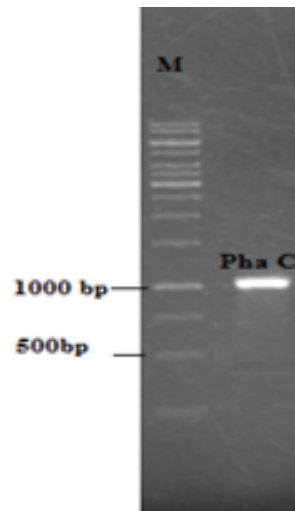
Để can thiệp vào khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng nghiên cứu một loạt các biện pháp có thể được áp dụng như: tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, tìm nguồn C phù hợp, tái tổ hợp gen, can thiệp gen, can thiệp vào con đường trao đổi chất Can thiệp vào chu trình trao đổi chất của vi sinh vật tích lũy PHA loại bỏ hoặc làm suy yếu các con đường cạnh tranh nhằm tập trung cho con đường chính để tổng hợp PHA. Đã có rất nhiều nghiên cứu được tiến hành can thiệp vào con đường trao đổi chất này và đã có kết quả rõ rệt [77, 78]. Trong con đường sinh tổng hợp PHA của chủng *B. megaterium* protein PhaC – PHA synthase đóng vai trò quan trọng. Trong khuôn khổ đề tài, phương pháp này lựa chọn để tạo chủng tái tổ hợp với việc tăng cường biểu hiện gen *phaC* mã hóa cho protein PhaC synthase tham gia trong con đường sinh tổng hợp PHA của *B. megaterium* DV01. Cặp môi sử dụng nhằm khuếch đại gen *phaC* được liệt kê trong Bảng 2.3. Cụm gen chính tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PHA của chủng *B. megaterium* được thể hiện trên Hình 3.1.



Hình 3.1. Cụm gen sinh tổng hợp PHB của *B. megaterium*

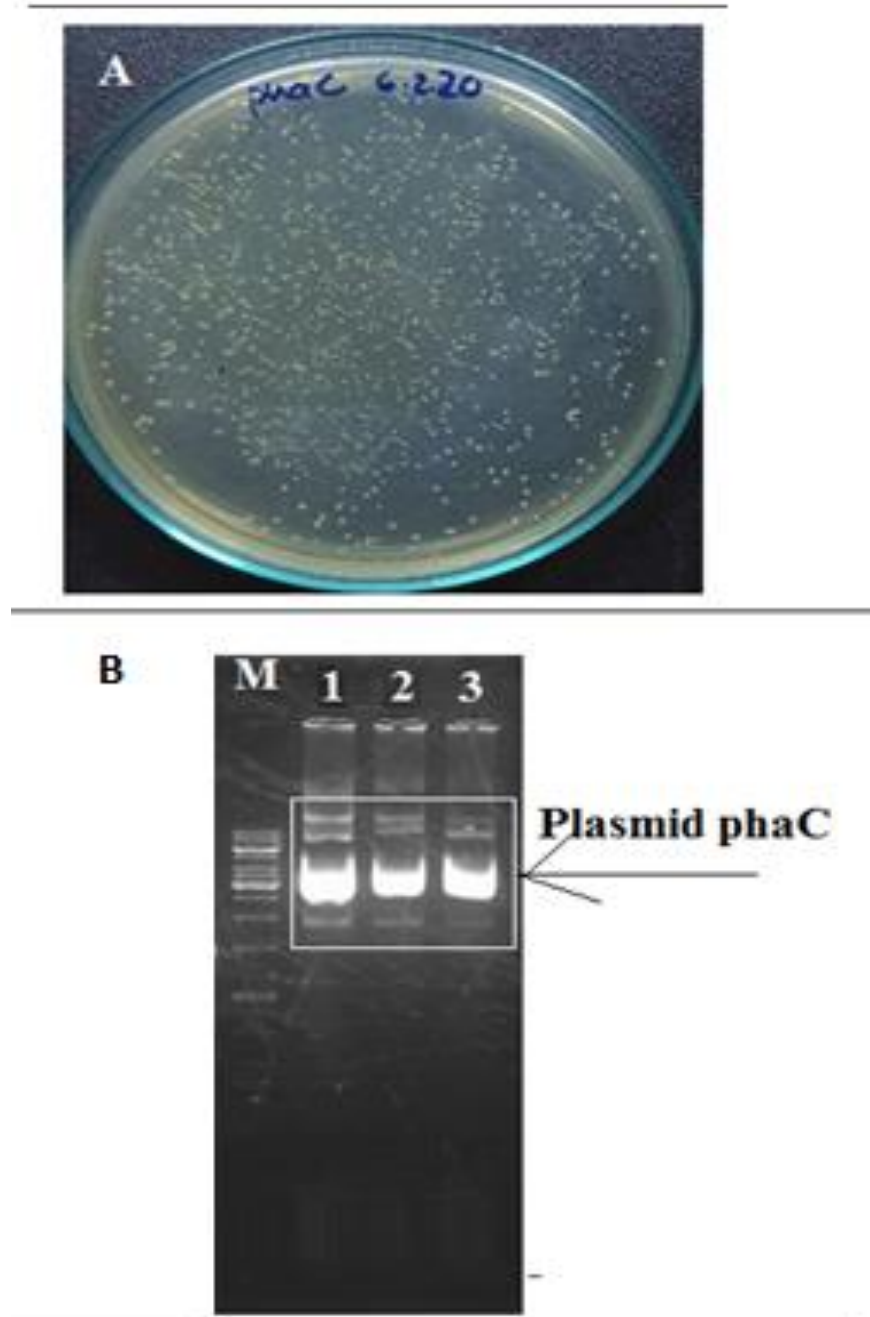
Gen *phaC* mã hóa cho protein PhaC - PHA synthase của chủng *B. megaterium* DV01 có khả năng tổng hợp và tích lũy PHA được lựa chọn trong nghiên cứu này. Để tách dòng và xác định trình tự gen, chủng DV01 được hoạt hóa và nuôi trên môi trường LB ở 37°C sau 20h sau đó tiến hành thu tế bào và tách chiết thu DNA tổng số theo phương pháp của Ausubel và cộng sự [79]. Dựa trên đoạn môi khuếch đại gen *phaC* đã được thiết kế, bằng phương pháp

PCR chúng tôi đã phân lập được đoạn gen có kích thước tương ứng với kích thước dự đoán của gen *phaC* đã được công bố trên ngân hàng gen (Hình 3.2).



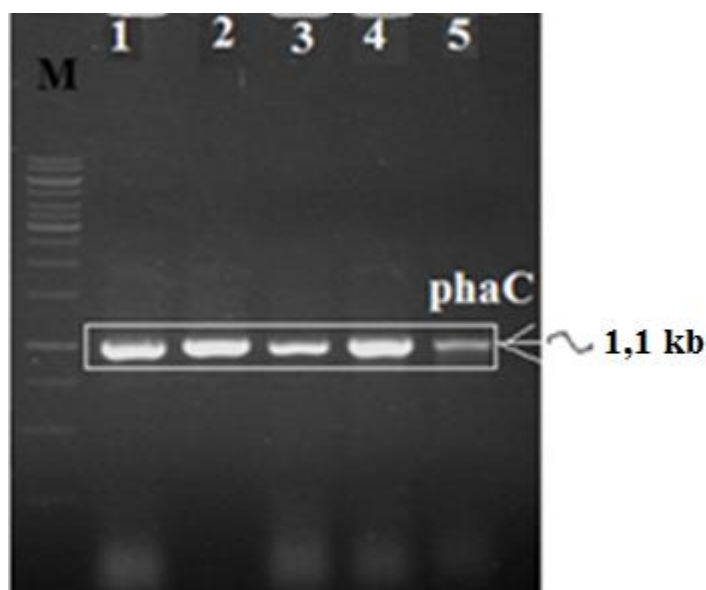
Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *phaC* của chủng tuyển chọn

Bằng cặp mồi đã thiết kế, chúng tôi đã khuếch đại được đoạn gen có kích thước khoảng 1,1 kb, đoạn gen này được tách dòng bằng vector pJET1.2 và biến nạp trong *E. coli* DH5 α . Kết quả khuẩn lạc tách dòng *phaC* và hình ảnh tách plasmid được thể hiện trên Hình 3.3. Hình ảnh điện di đồ kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen đích *phaC* từ các khuẩn lạc *E. coli* DH5 α bằng cặp mồi phaCF/R được thể hiện trên Hình 3.4. Kết quả này cho thấy với mỗi dòng *E. coli* DH5 α tái tổ hợp đã được biến nạp gen, khi chạy PCR sử dụng chính các dòng này làm khuôn thì đều cho các băng tương ứng với *phaC* về mặt kích thước. Trình tự gen tách dòng sau khi gửi đọc bởi Viện Công nghệ sinh học, dựa trên các phần mềm xử lý trình tự hiện nay như Chromas, Mega6, Bioedit và một số trang web về phân tích sinh học đã xác định được các gen này.



Hình 3.3. Hình ảnh khuẩn lạc tách dòng mang gen *phaC* (A) và hình ảnh tách plasmid của chủng DH5 α tái tổ hợp (B)

Kết quả phân tích trình tự cho thấy, gen được tách dòng hoàn toàn tương ứng với gen mã hóa cho *phaC* của *B. megaterium*. Gen *phaC* mã hóa cho PHA synthase của chủng DV01 tương đồng 99% với trình tự gen này của chủng *B. megaterium* BPK-3 ([GU190757.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU190757.1)) công bố trên ngân hàng gen NCBI. Như vậy chúng tôi được rằng gen *phaC* đã tách dòng thành công. Trình tự gen đã được đăng ký trên ngân hàng genbank với mã số tương ứng MW269525.



Hình 3.4. Hình ảnh điện di đồ khuếch đại gen *phaC* từ các khuẩn lạc DH5 α tách dòng

3.2. TẠO CHŨNG TÁI TỔ HỢP TĂNG CƯỜNG BIỂU HIỆN GEN *phaC*

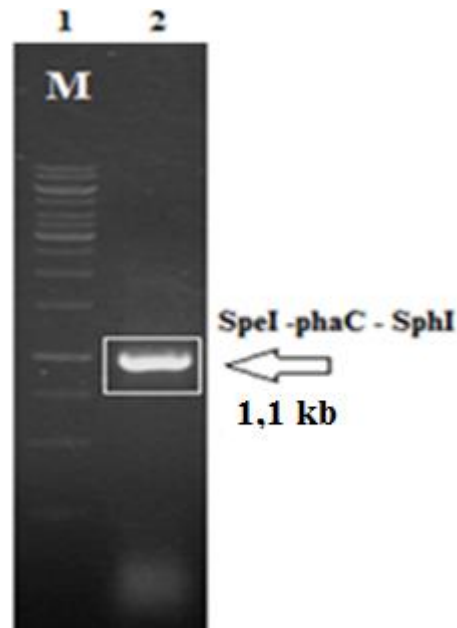
3.2.1. Thiết kế vector tái tổ hợp pPSP6

Bắt đầu từ năm 1991, Rygus và Hillen đã phát triển hệ thống biểu hiện cảm ứng xylose cho tái tổ hợp trong *B. megaterium*. Sau đó, hệ thống biểu hiện trong loài này đã được nâng cấp bởi promoter RNAP của phage khác nhau như: T7-, SP6- và K1E- RNA polymerase. Trong nghiên cứu này, vector pSP6 được lựa chọn nhằm tăng cường biểu hiện của gen *phaC* nhằm mục đích đánh giá khả năng tăng cường quá trình sinh tổng hợp PHA.

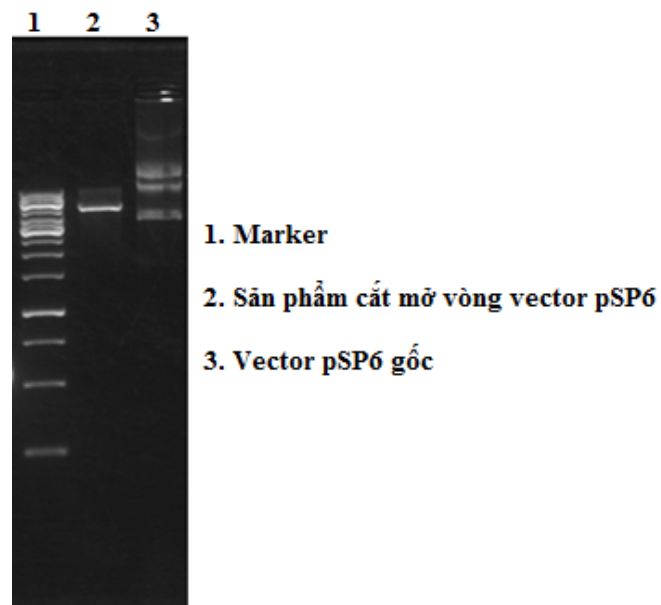
Bên cạnh các việc ứng dụng trong nghiên cứu *in vitro* cho quá trình phiên mã, SP6 và T7 RNAP của enterobacteriophage cũng được sử dụng thành công trong một số hệ thống vi khuẩn và sinh vật nhân chuẩn để sản xuất protein tái tổ hợp năng suất cao. Vector pPSP6 do Addgen cung cấp được thiết kế để chèn thêm đoạn gen đích *phaC* mã hóa cho protein tham gia trong quá trình tổng hợp PHA là PHA synthase PhaC. Hai vị trí enzym giới hạn được thiết kế là SphI và SpeI. Gen đích được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi For2/PhaC – SpeI// Rev2/PhaC – SphI (Hình 3.5). Sản phẩm PCR được chèn vào pPSP6 vector tại vị trí cắt mở vòng bằng hai enzyme giới hạn *SpeI* và *SphI* và tạo thành vector pPSP6/*phaC* và được biến nạp vào *E. coli*. Kết quả tách dòng được thể hiện trên Hình 3.7.

Các dòng tế bào mọc trên môi trường LB kháng sinh được tuyển chọn ngẫu nhiên và nuôi trên môi trường LB lỏng + ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ ở 37°C và

lắc 120 vòng/phút qua đêm. Sau đó được tách và kiểm tra sự có mặt của plasmid. Kết quả tách kiểm tra plasmid mang gen *phaC* được thể hiện trên Hình 3.8. Các plasmid này được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen đích bằng cặp mồi chính For2/PhaC –SpeI// Rev2/PhaC –SphI (Hình 3.9). Kết quả cho thấy đã thiết kế được vector pPSP6 mang gen *phaC* và tách dòng thành công. Các khuẩn lạc có mang vector pPSP6/*phaC* được bảo quản cho các thí nghiệm tiếp theo.



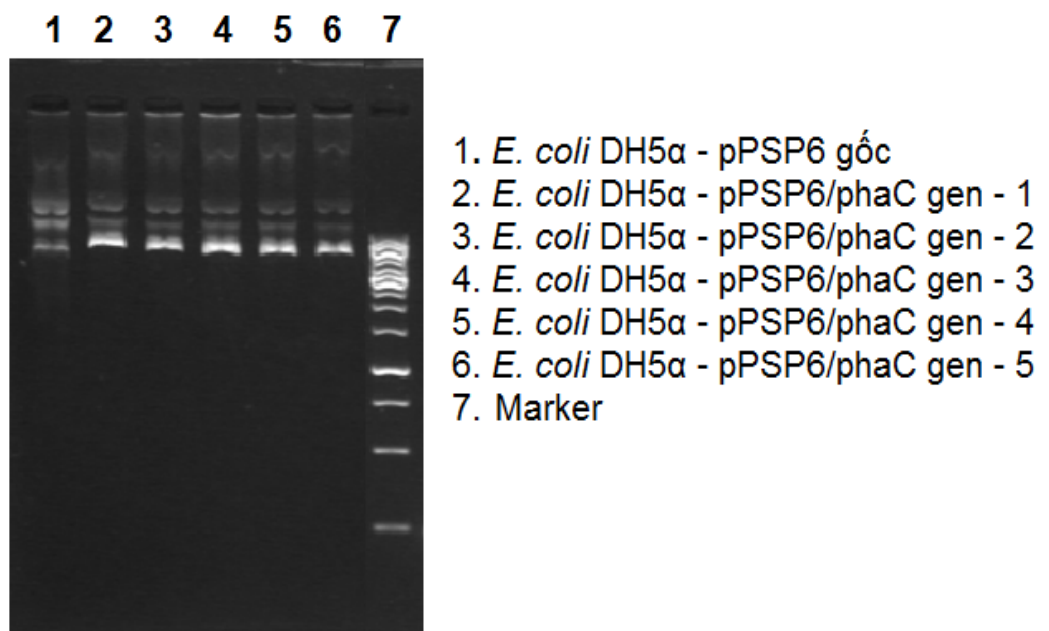
Hình 3.5. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *phaC* bằng cặp mồi For2/PhaC –SpeI// Rev2/PhaC–SphI



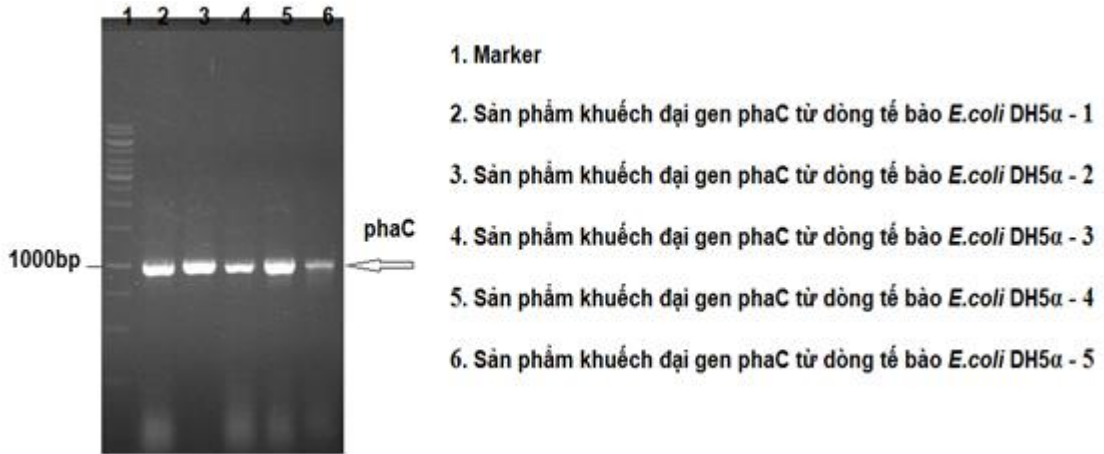
Hình 3.6. Điện di đồ sản phẩm cắt mở vòng vector pSP6



Hình 3.7. Khuẩn lạc *E. coli* DH5 α tách dòng mang plasmid pPSP6-phaC



Hình 3.8. Điện di đồ sản phẩm plasmid pPSP6/ phaC tách từ các khuẩn lạc *E. coli* DH5 α khác nhau



Hình 3.9. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *phaC* từ plasmid pPSP6/*phaC* bằng cặp mồi For2/*PhaC* –SpeI// Rev2/*PhaC*–SphI

3.2.2. Tạo chủng tái tổ hợp *B. megaterium* DV01 mang vector pPSP6/*phaC*

Sự tổng hợp PHB ở *Bacillus megaterium* phụ thuộc vào cụm gen tham gia quá trình này như: PhaP, PhaQ, PhaR, PhaB và đặc biệt là PhaC. Trong đó, nhóm IV PHA synthase được biết bao gồm 2 dưới đơn vị PhaC (≈ 40 kDa) và PhaR (≈ 20 kDa) và để có thể hoạt động tổng hợp PHA thì nhóm này cần có sự có mặt của cả hai protein này [38, 39]. Cho đến nay, cấu trúc tinh thể chỉ được xác định cho các PHA synthase tổng hợp scl-PHA từ *C.necator* H16 và *Chromobacterium* sp. USM2 [42, 43, 44].

Trong hai thập kỷ qua, nhiều công cụ bao gồm plasmid biểu hiện gen và chủng sản xuất đã được phát triển. Quá trình ứng dụng một số hệ thống vector dưới sự kiểm soát của promoter P_{XylA} và RNA polymerase (T7, SP6, K1E) khác nhau trong chủng chủ *B. megaterium* đã làm tăng lượng sản phẩm protein tái tổ hợp lên tới 1,25 g/l. Hàm lượng sinh khối có thể đạt tới 80 g/l đối với tế bào nuôi cấy có mật độ cao trong hệ thống lên men có kiểm soát. *B. megaterium* có kích thước tế bào lớn 1.5 x 4 μm đã trở thành đối tượng chính trong các nghiên cứu sản xuất protein tái tổ hợp. Hệ thống vector ứng dụng cho biểu hiện protein tái tổ hợp ở loài này không ngừng được phát triển và cải tiến trong nhiều năm qua.

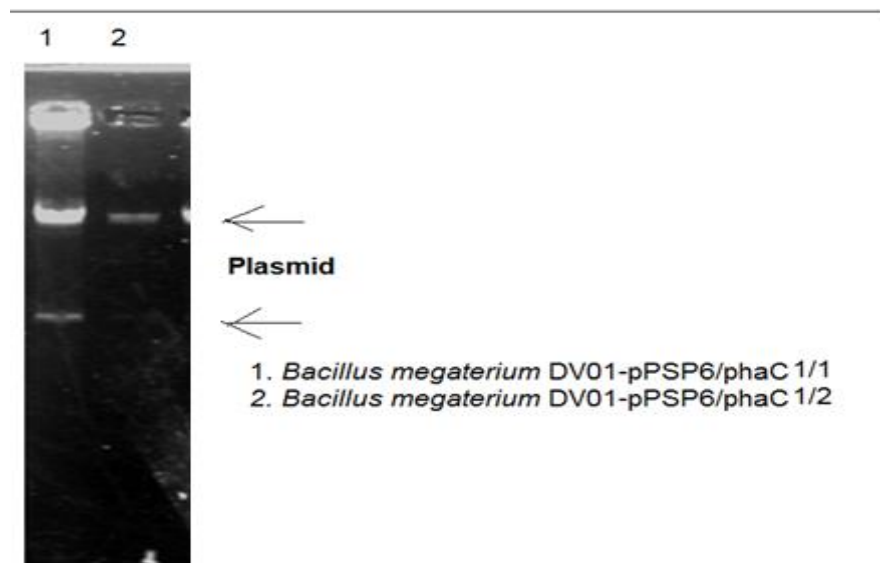
Các plasmid đã được thiết kế gắn thêm gen *phaC* được tách từ chủng *E. coli* DH5α và biến nạp vào chủng chủ *B. megaterium* DV01 bằng phương pháp biến nạp pha Lag và nuôi trên môi trường LB có bổ sung tetracyclin 6,5 $\mu\text{g/ml}$. Các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc được thu để nuôi cấy và tách kiểm tra sự có mặt của plamid. Chủng tái tổ hợp mang cụm gen đích *phaC*,

vector pPSP6 tạo thành được ký hiệu là *B. megaterium* DV01 pPSP6/phaC nhằm mục đích đánh giá sự biểu hiện khả năng tổng hợp PHA của các chủng này.

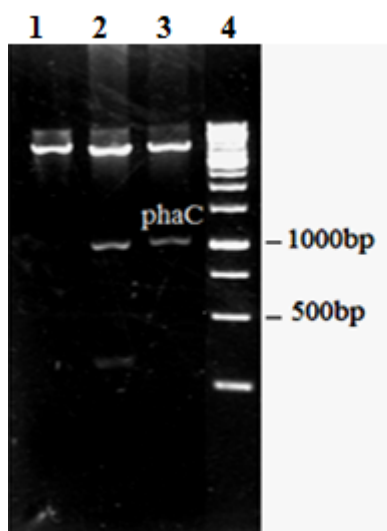
Kết quả biến nạp vector pPSP6/phaC vào *B. megaterium* DV01 được thể hiện trên Hình 3.10. Kết quả tách kiểm tra plasmid tái tổ hợp được thể hiện trên Hình 3.11. Sản phẩm DNA plasmid các chủng tái tổ hợp được tách và cắt kiểm tra bằng hai enzym giới hạn *SpeI* và *SphI* cho thấy có sự có mặt của đoạn gen *phaC* với kích thước khoảng 1,1 kb (Hình 3.12). Từ kết quả trên cho thấy đã biến nạp được các plasmid mang gen đích quan tâm pPSP6/phaC vào *B. megaterium* DV01.



Hình 3.10. Hình ảnh sàng lọc các dòng tế bào chủng *B. megaterium* DV01 mang vector pPSP6 và pPSP6 – PhaC trên môi trường LB có bổ sung tetracycline



Hình 3.11. Điện di đồ sản phẩm tách DNA plasmid của các chủng *B. megaterium* DV01 mang vector pPSP6/phaC tái tổ hợp



1. Sản phẩm cắt mở vòng plasmid pPSP6/phaC của chủng *B. megaterium* pPSP6/phaC1/3 bằng SphI và SpeI
2. Sản phẩm cắt mở vòng plasmid pPSP6/phaC của chủng *B. megaterium* pPSP6/phaC1/2 bằng SphI và SpeI
3. Sản phẩm cắt mở vòng plasmid pPSP6/phaC của chủng *B. megaterium* pPSP6/phaC1/1 bằng SphI và SpeI
4. Marker

Hình 3.12. Điện di đồ sản phẩm phản ứng cắt kiểm tra plasmid pPSP6/phaC bằng enzyme giới hạn SphI và SpeI

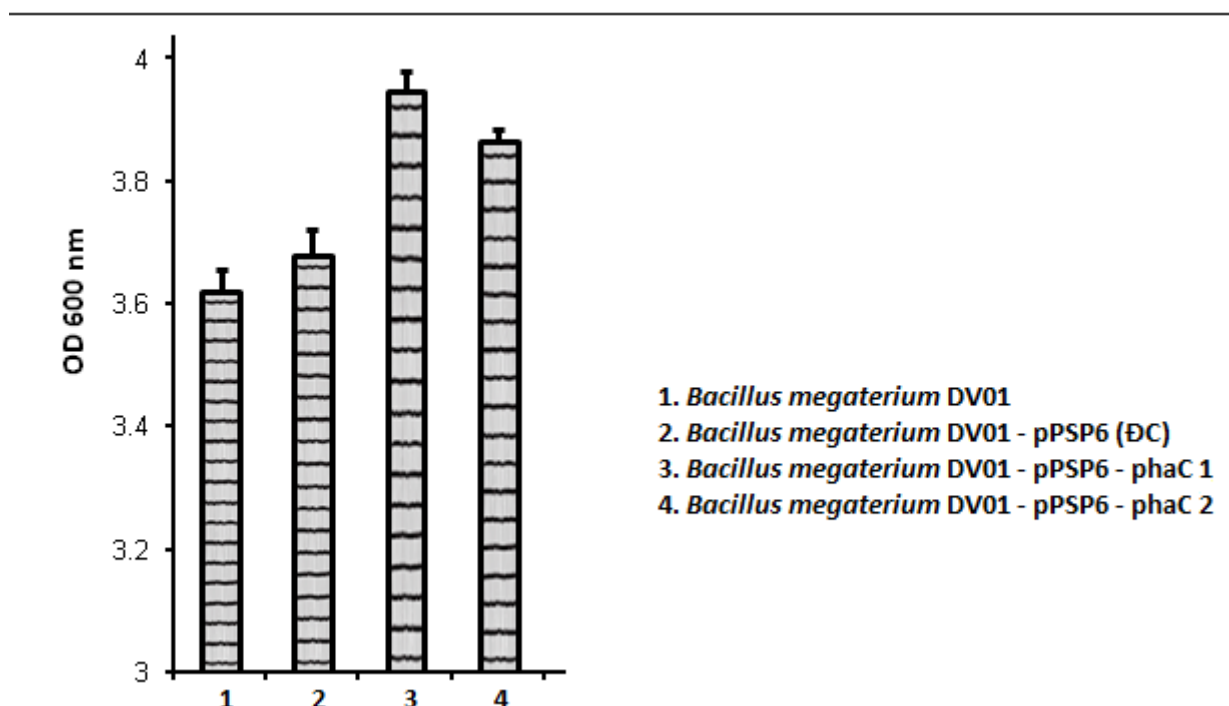
3.3. SÀNG LỌC CHỦNG CHỨA VECTOR TÁI TỔ HỢP pPSP6/phaC CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP PHA CAO

Trong nhiều thập kỷ qua *B. megaterium* là một đối tượng chính trong công nghiệp nhằm sản xuất các enzym, vitamin và các loại thuốc, và các protein tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã hướng tới tái tổ hợp tăng cường biểu hiện gen *phaC* của chủng chủ *B. megaterium* DV01 ban đầu nhằm đánh giá ảnh hưởng của gen này đến khả năng sinh tổng hợp PHA.

Để xác định được khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng tái tổ hợp bằng phương pháp tăng cường biểu hiện *phaC* với việc sử dụng vector pPSP6, các chủng tái tổ hợp được nuôi trên môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh tetracycline nồng độ 6.5 $\mu\text{g/ml}$. Sau 16 giờ nuôi cấy, chủng nghiên cứu được chuyển sang nuôi trên môi trường khoáng 2 với tỷ lệ giống bổ sung 1% nuôi lắc 120 vòng/phút. Sau 10h nuôi cấy chất cảm ứng xylose được bổ sung với nồng độ 0.5% (w/v) và tiếp tục nuôi cấy 72h sau đó tiến hành ly tâm thu cặn tế bào và xác định hàm lượng PHA tạo thành theo phương pháp crotonic. Danh sách các chủng nghiên cứu và ký hiệu của các chủng được thể hiện trong Bảng 3.1. Kết quả hàm lượng PHA của chủng tái tổ hợp tạo thành được thể hiện trên Bảng 3.2. Khả năng sinh trưởng của các chủng nghiên cứu được thể hiện trên Hình 3.13. Hàm lượng PHA của chủng tái tổ hợp được thể hiện trên hình 3.14.

Bảng 3.1. Bảng ký hiệu và đặc điểm của các chủng tái tổ hợp tạo thành

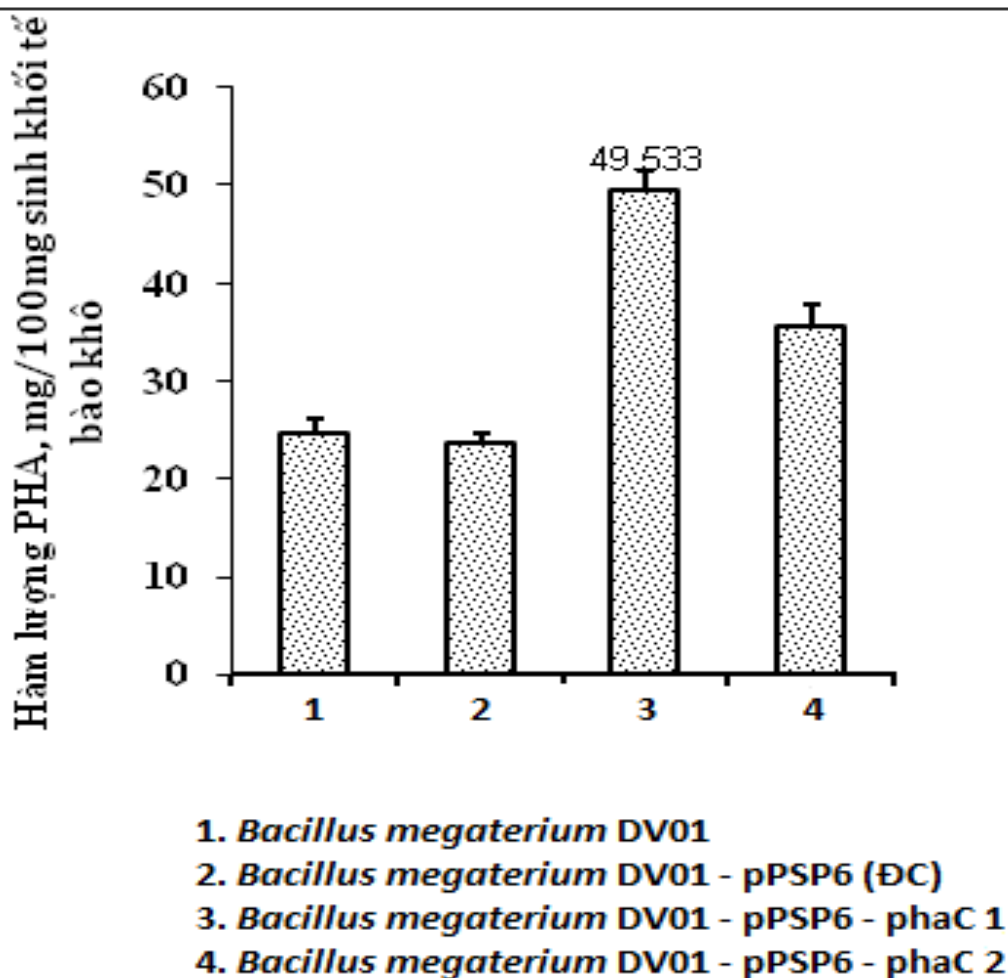
Chủng tái tổ hợp tạo thành	Vector	Gen đích	Ký hiệu viết tắt chủng	Ghi chú
<i>B. megaterium</i> DV01	0		Bme01	Chủng đối chứng
<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6	pPSP6	0	BmegapPSP6	Chủng đối chứng
<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC	pPSP6	<i>phaC</i>	BmegapPSPH AC	Chủng nghiên cứu

**Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng của các chủng tái tổ hợp nghiên cứu****Bảng 3.2. Ảnh hưởng của việc tăng cường biểu hiện phaC lên khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng *B. megaterium* DV01**

STT	Ký hiệu chủng	OD _{600nm}	Hàm lượng PHA, mg/100 mg sinh khối tế bào khô
1	<i>B. megaterium</i> DV01	3.621 ± 0.034	24,671 ± 1,473
2	<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6	3.678 ± 0.043	23,660 ± 1,112

3	<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC 1	3.947 ± 0.031	49,533 ± 2,076
4	<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC 2	3.864 ± 0.022	35,611 ± 2.343

Kết quả trên Bảng 3.2 cho thấy các chủng tái tổ hợp cho thấy có kết quả tăng cường PHA tích lũy vượt trội hơn rất nhiều so với chủng đại *B. megaterium* DV01. Trong đó hai chủng tái tổ hợp *B. megaterium* DV01 mang vector pPSP6 có gắn gen *phaC* mã hóa cho PHA synthase PhaC (*B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1) có khả năng sinh trưởng mạnh nhất với giá trị OD đạt được 3.947 ± 0.031 và đồng thời khả năng tích lũy PHA của chủng này khi xác định theo phương pháp crotonic cũng đạt giá trị cao nhất với hàm lượng là $49,533 \pm 2,076$ mg/100 mg tế bào khô tương ứng với khả năng tích lũy trong tế bào chủng đạt gần 50%. Chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 có khả năng tăng cường sinh tổng hợp PHA cao được lựa chọn, bảo quản cho các mục đích nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.14. Hàm lượng PHA của các chủng tái tổ hợp nghiên cứu

3.4. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ SINH TỔNG HỢP PHA CỦA CHỦNG TÁI TỔ HỢP TẠO THÀNH

3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA

Nhiệt độ nuôi cấy được biết là một trong những yếu tố ảnh hưởng rất mạnh mẽ đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp các chất tích lũy của VSV đặc biệt là các chủng tái tổ hợp. Chúng là yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất, chất lượng protein tái tổ hợp và tính ổn định của plasmid. Để đánh giá được ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 được nuôi cấy trên môi trường khoáng 1 có bổ sung tetracycline 6,5 - 10 µg/ml với tỷ lệ giống bổ sung là 5%, nuôi cấy 14h sau đó chuyển sang môi trường pha 2 bổ sung 0,5% xylose và tiếp tục được nuôi ở 30, 37, và 45°C trong 72h. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của các chủng được thể hiện trên Bảng 3.3 và khả năng sinh tổng hợp, tích lũy PHA được thể hiện trên Bảng 3.4.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của chủng tái tổ hợp

Nhiệt độ Chủng tái tổ hợp	OD _{600nm}		
	30°C	37°C	45°C
<i>B. megaterium</i> DV01	3.55 ± 0.031	3.69 ± 0.019	3.46 ± 0.012
<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6	3.45 ± 0.021	3.73 ± 0.025	3.52 ± 0.051
<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC 1	3.86 ± 0.024	3.93 ± 0.044	3.51 ± 0.056

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp PHA của chủng tái tổ hợp

Nhiệt độ Chủng tái tổ hợp	PHA, mg/100 mg sinh khối tế bào khô		
	30°C	37°C	45°C
<i>B. megaterium</i> DV01	20,22 ± 0.72	28,68 ± 0,48	17,92 ± 0,68

<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6	19,14 ± 0,44	28,38 ± 2,04	18,68 ± 1,44
<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC 1	37,9 ± 1,48	50,16 ± 2,24	32,66 ± 2,48

Khảo sát khả năng tích lũy PHA ở dải nhiệt độ này cho thấy, chủng tái tổ hợp sinh trưởng và tiết enzym quan tâm tốt nhất khi được nuôi ở nhiệt độ 37°C. Giá trị OD tại bước sóng 600nm đo được tại nhiệt độ này của chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 cũng phát triển khá mạnh khi giá trị OD 600nm tại nhiệt độ 37°C đạt 3.93 ± 0.044 . Trong khi đó, giá trị OD của chủng gốc Bmega01 chỉ đạt 3.69 ± 0.019 . Sự khác biệt về hàm lượng sinh khối tế bào, tốc độ sinh trưởng và khả năng phát triển tương đối ở các nhiệt độ khảo sát khác nhau rất có ý nghĩa với chủng nghiên cứu trong mục đích sản xuất. xét về phương diện này, chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 có tiềm năng rất lớn. Tuy nhiên, để được lựa chọn chủng cho sản xuất, ngoài việc có khả năng phát triển tốt ra, chủng tái tổ hợp còn phải đáp ứng được điều kiện nữa đó chính là cần phải xác định được khả năng tổng hợp PHA hay chính là xác định được hàm lượng PHA tạo thành

Nhiệt độ nuôi cấy cho thấy ảnh hưởng rất rõ rệt đến sự sinh trưởng và tích lũy PHA của các chủng. Hàm lượng PHA xác định dựa trên phương trình đường chuẩn của phương pháp Crotonic (Phụ lục) và trình này trên Bảng 3.4 của các chủng tái tổ hợp khi được nuôi cấy tại nhiệt độ khác nhau cho thấy hàm lượng PHA tích lũy được cũng khác nhau. Tuy nhiên, so với chủng đối chứng, chủng tái tổ hợp *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 cho thấy có sự cải thiện rõ rệt về hàm lượng PHA xác định được. Tại 37°C cho thấy là nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của chủng nghiên cứu. Ở nhiệt độ này, chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 có khả năng tích lũy $50,16 \pm 2,24$ mg/100 mg sinh khối khô cao hơn rất nhiều so với các chủng đối chứng. Khi chủng được nuôi cấy ở nhiệt độ 30 hay 45°C hàm lượng PHA tích lũy hay khả năng sinh trưởng của chủng đều giảm thấp hơn khi được nuôi cấy ở 37°C. Từ các nghiên cứu này cho thấy, nhiệt độ thích hợp cho các chủng tái tổ hợp sinh trưởng và tích lũy PHA là 37°C.

3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng tuyển chọn

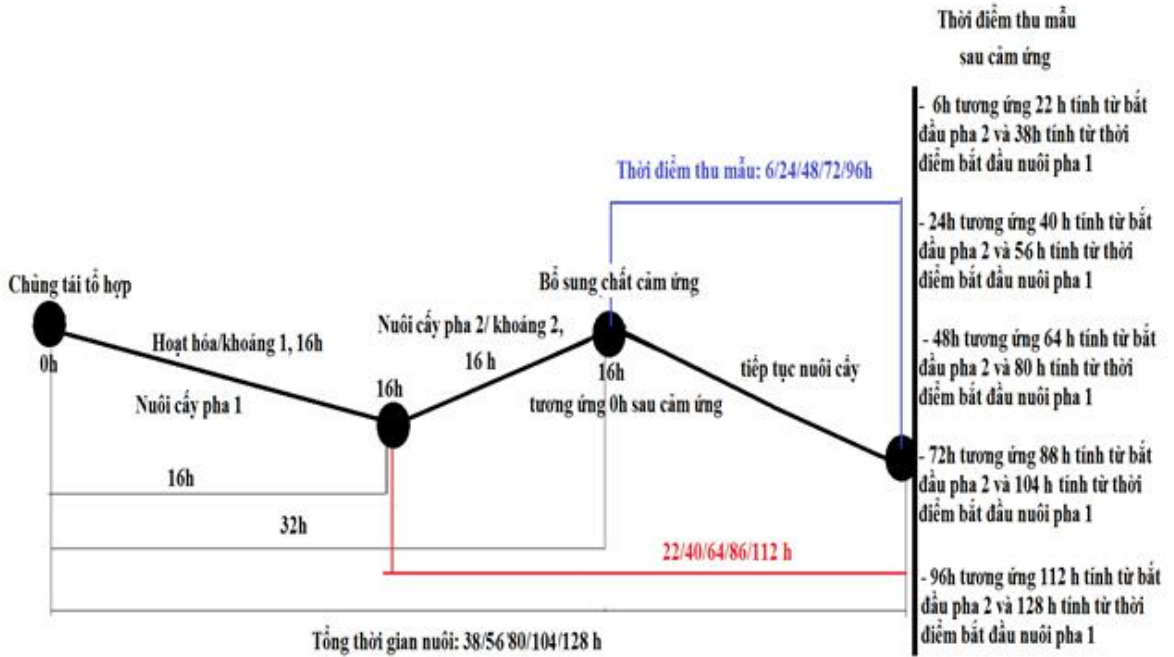
Quá trình tích lũy PHA xảy ra khi sinh vật sinh trưởng trong điều kiện cực hạn, hạn chế nguồn chất dinh dưỡng N, P và dư thừa nguồn C. Chính vì vậy, để có thể tích lũy PHA, các chủng tái tổ hợp cần thời gian sinh trưởng đủ lâu trong môi trường này. Nhằm xác định được thời gian thích hợp cho tích lũy PHA của chủng tái tổ hợp, chủng nghiên cứu *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 được nuôi cấy trên môi trường khoáng 1 có bổ sung tetracycline 6,5 µg/ml với tỷ lệ giống bổ sung là 5%, nuôi cấy 16h sau đó chuyển sang môi trường pha 2 (khoáng 2 – Tetracycline) tiếp tục nuôi 16h sau đó bổ sung 0,5% xylose. Nhiệt độ nuôi cấy của các chủng trong nghiên cứu này là ở 37°C. Thời điểm 16h nuôi cấy trước khi bổ sung chất cảm ứng được tính là thời điểm 0h tương đương với 32h nuôi cấy tính từ lúc bắt đầu cấy chủng. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy các chủng được tính tại các thời điểm 6, 24, 48, 72, 96h sau khi được bổ sung chất cảm ứng tương ứng với thời điểm nuôi cấy 22, 40, 64, 88 và 112h tính từ lúc chủng tái tổ hợp được nuôi cấy trên môi trường khoáng 2 và tương ứng với 38, 56, 80, 104 và 128h tính từ lúc bắt đầu nuôi cấy trên pha 1. Sơ đồ thời gian thí nghiệm và thời điểm lấy mẫu được thể hiện trên Hình 3.15.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp, tích lũy PHA được thể hiện trên Bảng 3.5.

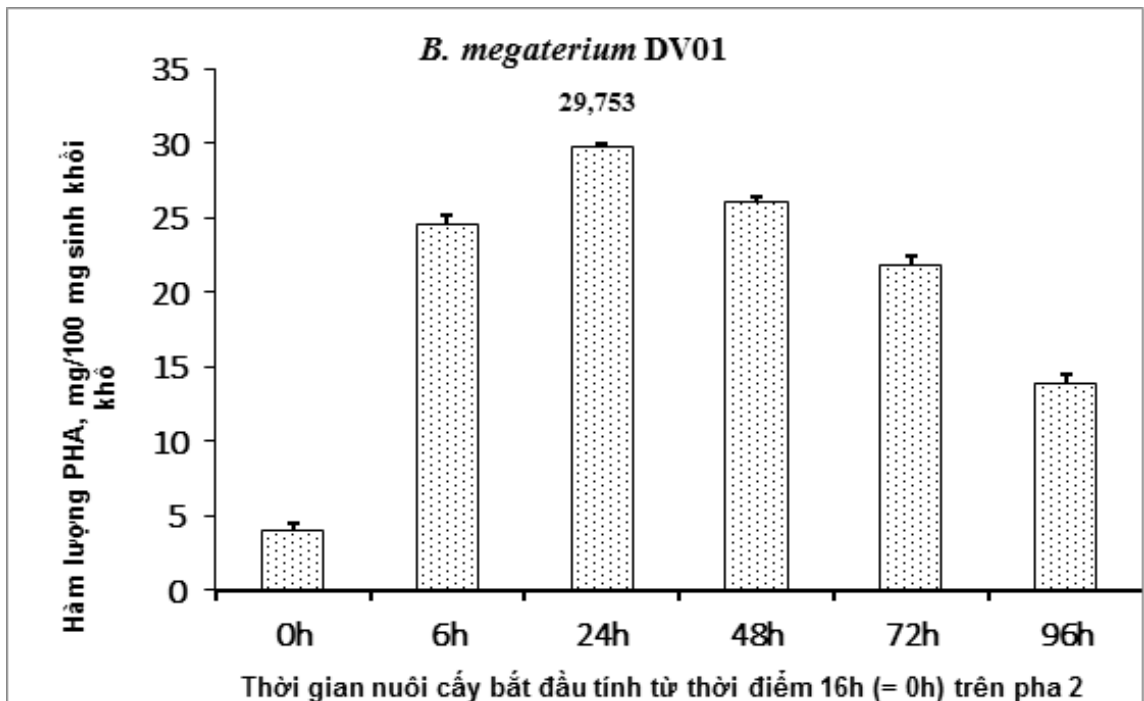
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp PHA của các chủng tái tổ hợp

Chủng Thời gian nuôi cấy		Hàm lượng PHA, mg/100mg sinh khối khô
		<i>B. megaterium</i> DV01/pPSP6-phaC 1
Không cảm ứng	0h	2,730 ± 0,814
	6h	11,273 ± 0,910
	24h	20,554 ± 1,535
	48h	25,408 ± 0,613
	72h	26,127 ± 1,089
	96h	16,419 ± 0,539
Có cảm ứng	6h	12,674 ± 0,713
	24h	28,944 ± 0,600
	48h	51,966 ± 0,798

	72h	50,959 ± 1,191
	96h	37,693 ± 0,691

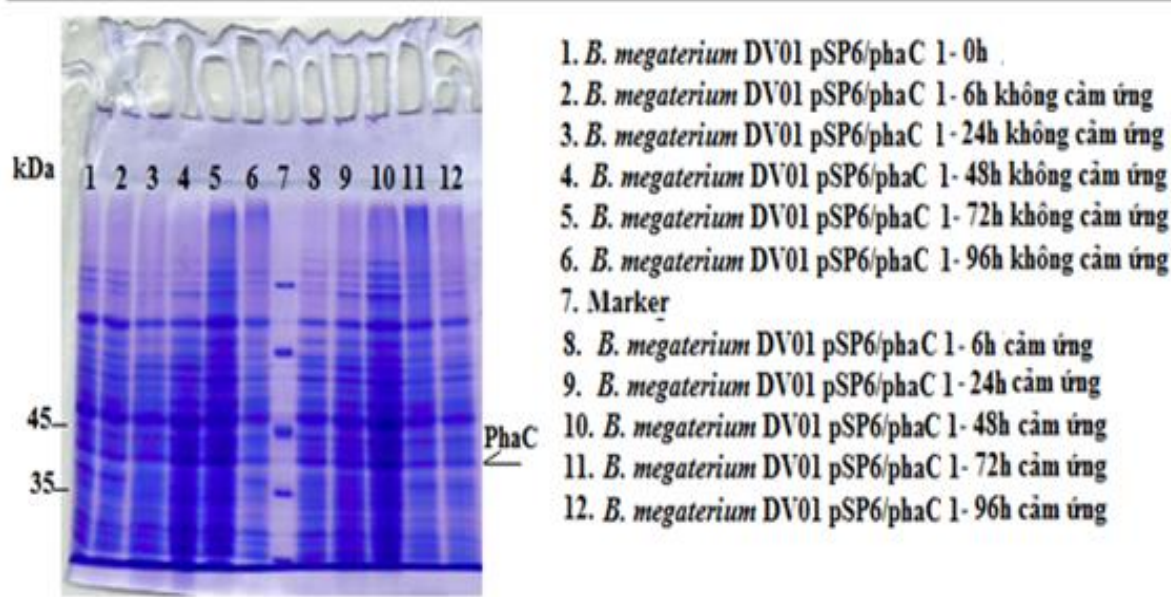


Hình 3.15. Sơ đồ thời gian thí nghiệm và thời điểm lấy mẫu



Hình 3.16. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng gốc *B. megaterium* DV01

Dựa vào kết quả trên cho thấy rằng, chủng đại *B. megaterium* DV01 có khả năng tích lũy được trong thí nghiệm này là 29,75% hàm lượng PHA so với tế bào khô khi đạt $29,753 \pm 0,284$ mg/100 mg sinh khối khô sau 40h nuôi cấy (tương ứng với thời điểm 24 sau cảm ứng với chủng tái tổ hợp). Chủng tái tổ hợp sinh tổng hợp PHA tốt nhất trong khoảng thời gian 24 – 72h nuôi cảm ứng tương đương với 40-88h tính từ lúc bắt đầu chuyển sang nuôi trên môi trường khoáng 2. Chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 mang vector pPSP6 và gen *phaC* cho thấy rằng hoạt tính tích lũy PHA của chủng cũng rất cao, đạt $51,966 \pm 0,798$ mg/100 mg sinh khối khô sau khi nuôi 48h trên môi trường khoáng 2 có bổ sung xylose cảm ứng (tương ứng với 64h tính từ thời điểm chuyển nuôi pha 2 trên môi trường khoáng 2). Hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào được tích lũy >50% CDW. Kết quả điện di protein biểu hiện của PhaC được thể hiện trên hình 3.17.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự biểu hiện protein PhaC của chủng tái tổ hợp

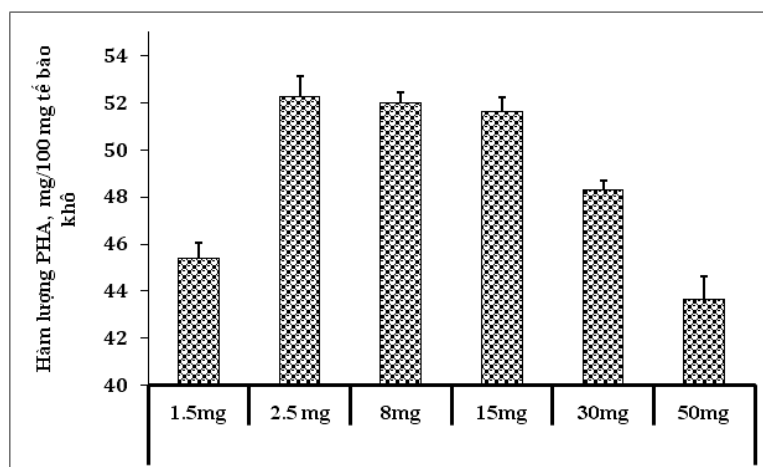
Kết quả điện di protein trên Hình 3.18 cho thấy mức độ biểu hiện của hai protein tái tổ hợp PhaC của chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 với kích thước khoảng 40kDa tương đối mạnh. Protein PhaC của chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 biểu hiện mạnh nhất sau 48h cảm ứng tức sau 64 h nuôi cấy trên môi trường khoáng pha 2. Kích thước PhaC tương ứng với kích thước của protein này của chủng *Bacillus megaterium* đã công bố này [38, 39].

3.4.3. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng tái tổ hợp

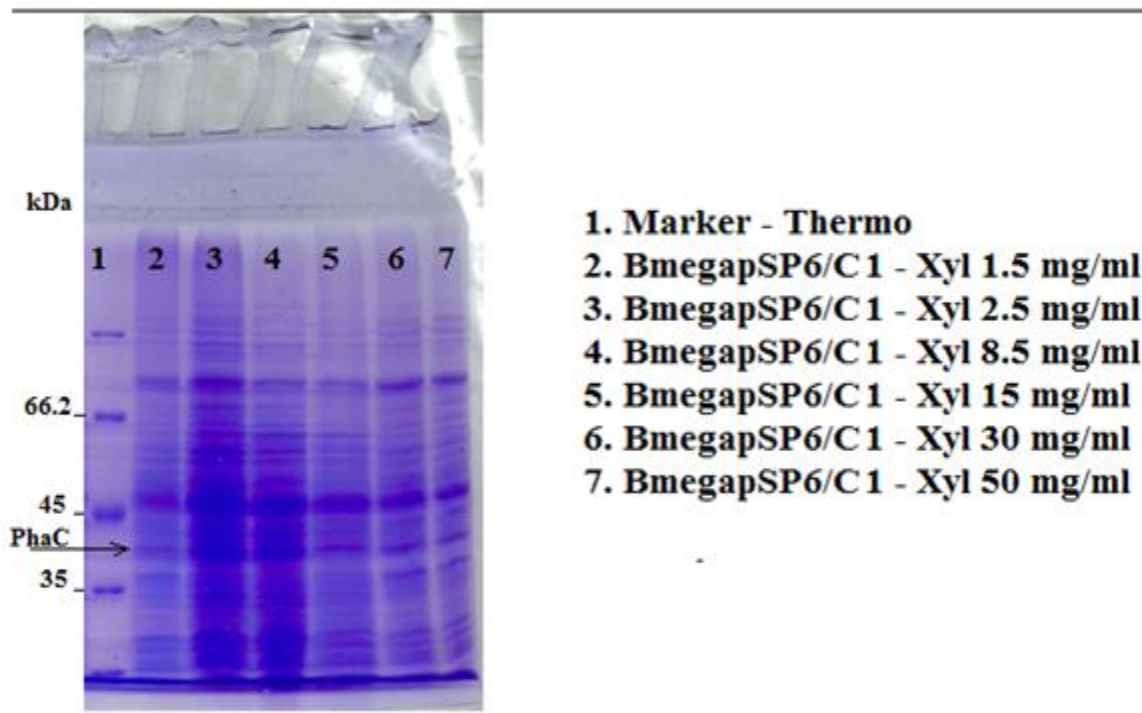
Chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 được hoạt hóa trên môi trường LB có bổ sung tetracycline nồng độ cuối đạt 6,5 – 10 $\mu\text{g/ml}$ môi trường và nuôi ở 37°C, lắc 120 vòng/ phút, trong 18h sau đó chủng được chuyển sang nuôi qua đêm trên môi trường khoáng 1 có bổ sung kháng sinh trên. Sau 20h nuôi cấy trên pha 1 chủng tiếp tục được chuyển sang môi trường khoáng 2 nuôi sau 16h bắt đầu cảm ứng xylose ở các nồng độ khác nhau và thu sinh khối sau 48h. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng được thể hiện trên Bảng 3.6 và Hình 3.18. Kết quả điện di protein ảnh hưởng của các nồng độ chất cảm ứng khác nhau đến khả năng biểu hiện protein của chủng tái tổ hợp này được thể hiện trên Hình 3.19.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng khác nhau lên hàm lượng PHA xác định theo Crotonic của chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1

STT	Nồng độ chất cảm ứng	Hàm lượng PHA, mg/100mg sinh khối khô
1	1.5mg/l	45,39 \pm 0.652
2	2.5 mg/l	52,30 \pm 0.854
3	8mg/l	52,02 \pm 0.454
4	15mg/l	51,66 \pm 0.596
5	30mg/l	48,29 \pm 0.384
6	50mg/l	43,67 \pm 0.976



Hình 3.18. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng lên khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1



Hình 3.19. Điện di đồ ảnh hưởng của nồng độ xylose khác nhau của chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 lên khả năng biểu hiện PhaC

Dựa trên kết quả trình bày tại Bảng 3.6 và Hình 3.18 cho thấy, chủng *B. megaterium* DV01/pPSP6-phaC 1 cho thấy có khả năng tổng hợp, tích lũy PHA tốt trong khoảng 1.5 đến 30mg/ml xylose và hàm lượng PHA theo crotonic cho thấy đạt cao nhất khi bổ sung cảm ứng xylose với hàm lượng 2.5 mg/ml với hàm lượng PHA đạt khoảng 52% tương ứng $52,30 \pm 0.854$ mg PHA/ 100 mg sinh khối khô tương ứng với 52,3% trọng lượng tế bào khô là PHA.

3.5. PHÂN TÍCH, XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC NHỰA SINH HỌC CỦA CHŨNG TÁI TỔ HỢP

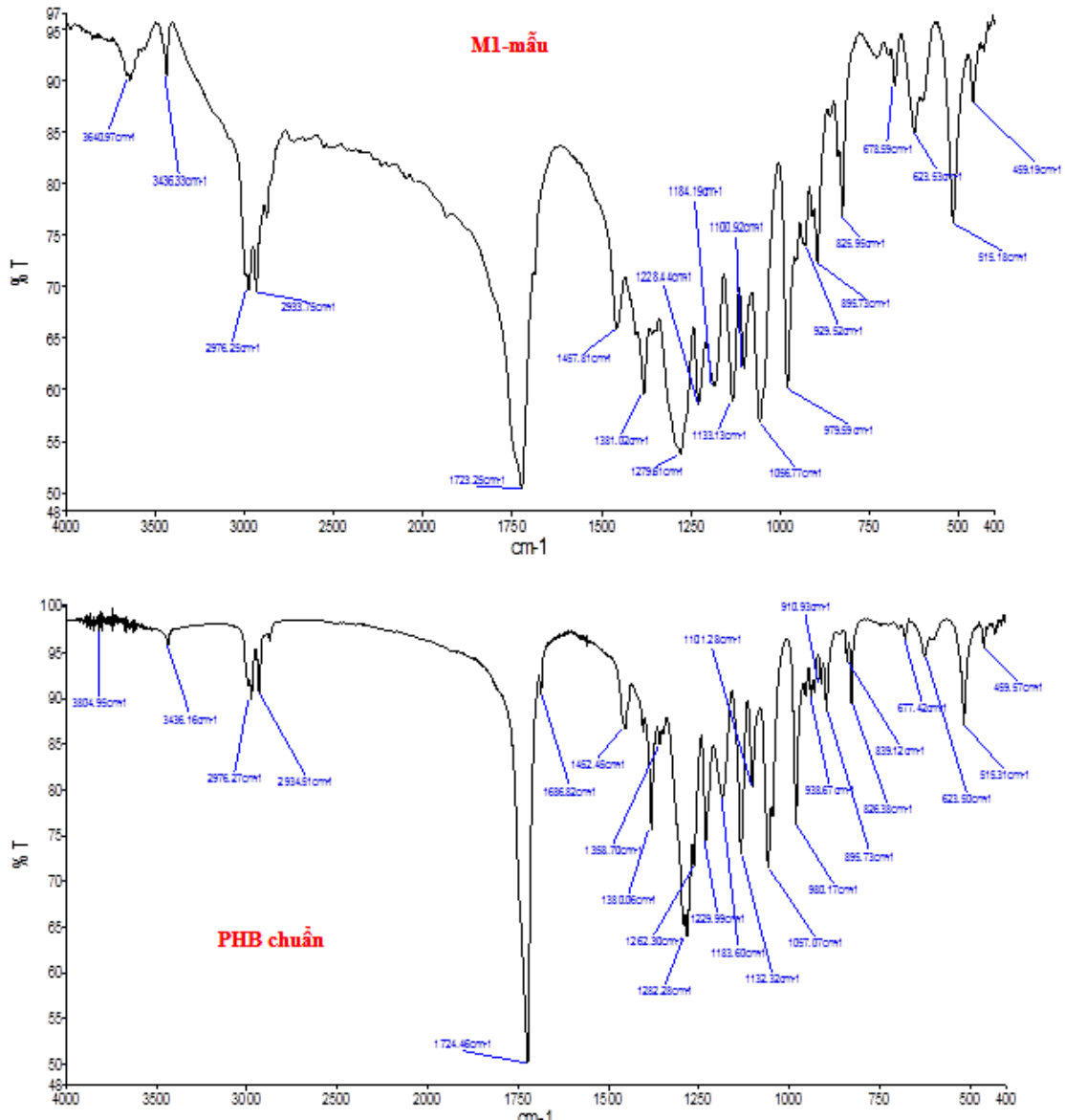
Chủng tái tổ hợp được nuôi trên bình môi trường 1000 ml có chứa 450 ml dịch khoáng 2, tetracycline, chất cảm ứng phù hợp và nuôi lắc 120 vòng/phút, 37°C. Cảm ứng xylose sau 16h nuôi cấy và tiến hành nuôi 48h sau cảm ứng sau đó thu sinh khối. Lượng sinh khối thu được bằng ly tâm và làm khô để tách chiết thu PHA. PHA sau khi tách được sẽ được sử dụng để phân tích cấu trúc bằng phổ IR và NMR.

3.5.1. Phân tích phổ hồng ngoại của PHA từ chủng tái tổ hợp

Quang phổ hồng ngoại (viết tắt là IR spectroscopy) là phép phân tích quang phổ trong vùng hồng ngoại của phổ bức xạ điện từ, nơi ánh sáng có bước sóng dài hơn và tần số thấp hơn vùng nhìn thấy. Nhiều kỹ thuật quang phổ hồng

ngoại dựa trên tính chất này, hầu hết trong số đó đều dựa trên quang phổ hấp thụ. Các nhóm chức có mặt trong các PHA được chiết xuất được xác định bằng phổ hồng ngoại FTIR. Mẫu PHA được trộn với 2% KBr và được nén thành các đĩa mẫu mờ và được cố định trong máy đo phổ FTIR (Perkin-Elmer RX I) việc quét được thực hiện với phạm vi phổ 4000-400 cm^{-1} . Kết quả chạy phổ hồng ngoại của chủng tái tổ hợp được thể hiện trên Hình 3.20.

Phổ IR của PHA thu từ chủng tái tổ hợp có dải hấp thụ mạnh tại 1723 cm^{-1} và 1056 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C=O và C-O. Dải hấp thụ ở 2976, 2933 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-H trong các nhóm methyl (CH_3 -), methylene ($-\text{CH}_2$ -) và methine ($>\text{CH}$ -). Dải hấp thụ ở 1457 và 1381 cm^{-1} đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) (dải hấp thụ ở 3460 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của H_2O -mẫu bị ẩm). Trong khi đó với mẫu chuẩn PHB của sigma, phổ IR có dải hấp thụ mạnh tại 1722 cm^{-1} và 1055 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C=O và C-O. Dải hấp thụ ở 2954, 2922, 2853 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-H trong các nhóm methyl (CH_3 -), methylene ($-\text{CH}_2$ -) và methine ($>\text{CH}$ -). Dải hấp thụ ở 1456 và 1378 cm^{-1} đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm methyl ($-\text{CH}_3$). Hình ảnh phổ IR của mẫu nghiên cứu cho thấy khá tương ứng với mẫu chuẩn.



Hình 3.20: Phổ hồng ngoại của PHA thu hồi từ chùng tái tổ hợp

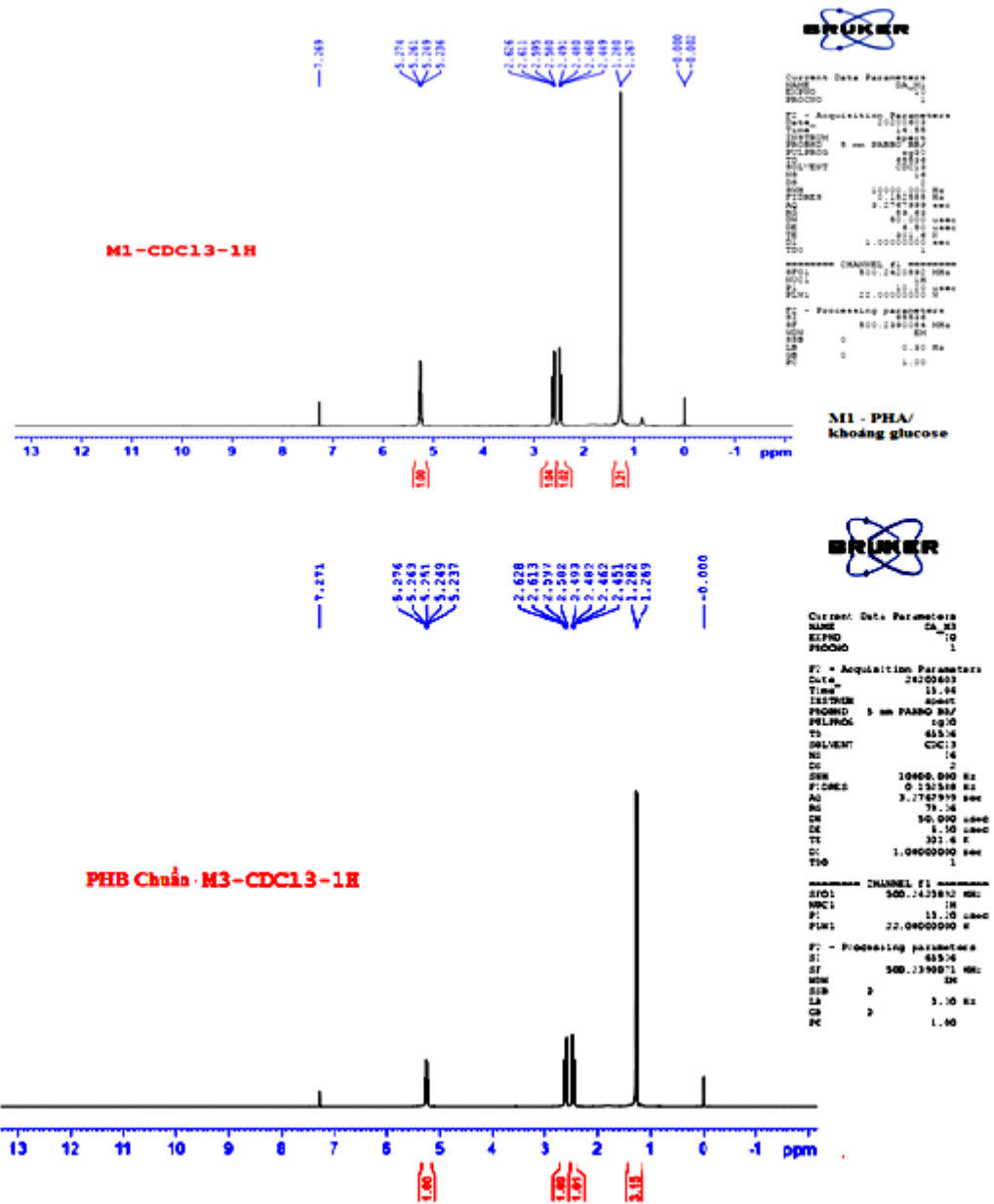
3.5.2. Phân tích phổ cộng hưởng từ - NMR của PHA từ chùng tái tổ hợp

Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) là một hiện tượng vật lý trong đó các hạt nhân nguyên tử trong từ trường tĩnh mạnh bị nhiễu bởi từ trường dao động yếu (không phụ thuộc vào sóng điện từ vì chúng ở trong trường gần) và tạo ra tín hiệu điện từ để đáp ứng. Đặc tính tần số của từ trường ở lõi. Quá trình này xảy ra gần cộng hưởng khi tần số dao động phù hợp với tần số tự nhiên của hạt nhân, tần số này phụ thuộc vào cường độ của từ trường tĩnh, môi trường hóa học và tính chất từ của các đồng vị liên quan. Trong các ứng dụng thực tế trong từ trường tĩnh lên đến khoảng 20 Tesla, cùng tần số với sóng truyền hình VHF và UHF (60, 1000 MHz). NMR là kết quả từ các tính chất từ cụ thể của các hạt

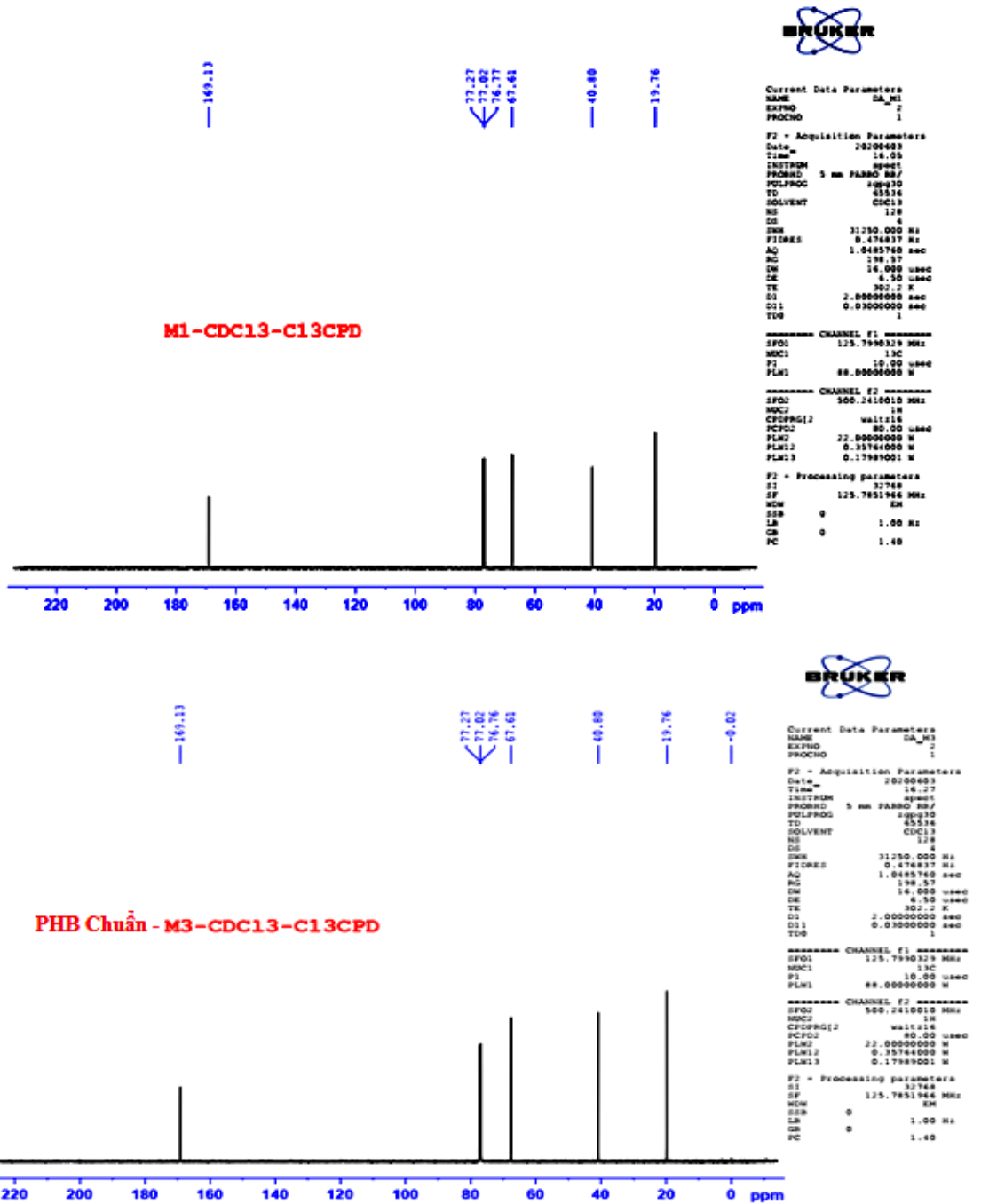
nhân nguyên tử cụ thể. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng rộng rãi để xác định cấu trúc của các phân tử hữu cơ trong dung dịch và nghiên cứu vật lý của các vật liệu phân tử, tinh thể và vô định hình. NMR cũng được sử dụng rộng rãi trong các kỹ thuật hình ảnh y tế tiên tiến như chụp cộng hưởng từ (MRI).

Trên phổ ^1H NMR (đo trong CDCl_3 , 500 MHz) của mẫu chuẩn xuất hiện tín hiệu cộng hưởng một nhóm methyl (CH_3 -) dạng doublet tại δ_{H} 1.26 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), một nhóm methylene ($-\text{CH}_2-$) tại δ_{H} 2.46 (1H, d, $J = 5.5, 15.5$ Hz) và 2.59 (1H, d, $J = 7.5, 15.5$ Hz), và một nhóm methine ($>\text{CH}-$) tại δ_{H} 5.24 (1H, six, $J = 6.0$ Hz). Trên phổ ^{13}C NMR (đo trong CDCl_3 , 125 MHz) có tín hiệu cộng hưởng của 4 cacbon gồm 1 nhóm methyl (δ_{C} 19.76), 1 nhóm methylene (δ_{C} 40.80), 1 nhóm methine liên kết với ôxi (δ_{C} 67.61) và một nhóm carbonyl dạng ester (δ_{C} 169.13).

Trên phổ ^1H NMR (đo trong CDCl_3 , 500 MHz) của mẫu nghiên cứu xuất hiện tín hiệu cộng hưởng một nhóm methyl (CH_3 -) dạng doublet tại δ_{H} 1.26 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), một nhóm methylene ($-\text{CH}_2-$) tại δ_{H} 2.46 (1H, d, $J = 5.5, 15.5$ Hz) và 2.59 (1H, d, $J = 7.5, 15.5$ Hz), và một nhóm methine ($>\text{CH}-$) tại δ_{H} 5.24 (1H, six, $J=6.5$ Hz). Trên phổ ^{13}C NMR (đo trong CDCl_3 , 125 MHz) có tín hiệu cộng hưởng của 4 cacbon gồm 1 nhóm methyl (δ_{C} 19.76), 1 nhóm methylene (δ_{C} 40.80), 1 nhóm methine liên kết với ôxi (δ_{C} 67.61) và một nhóm carbonyl dạng ester (δ_{C} 169.13).

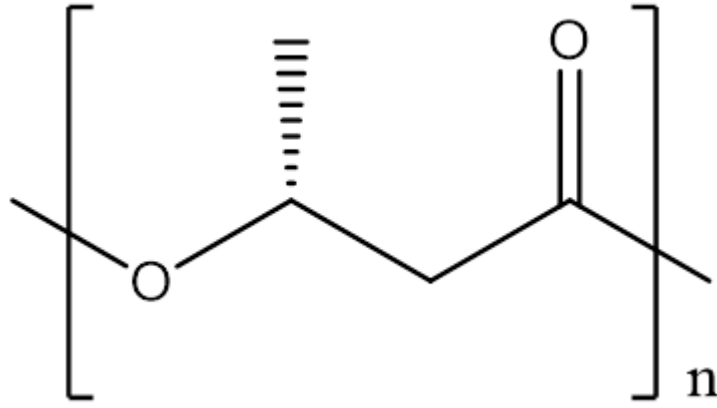


Hình 3.21. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H của PHA thu hồi từ chủng tái tổ hợp và PHA chuẩn

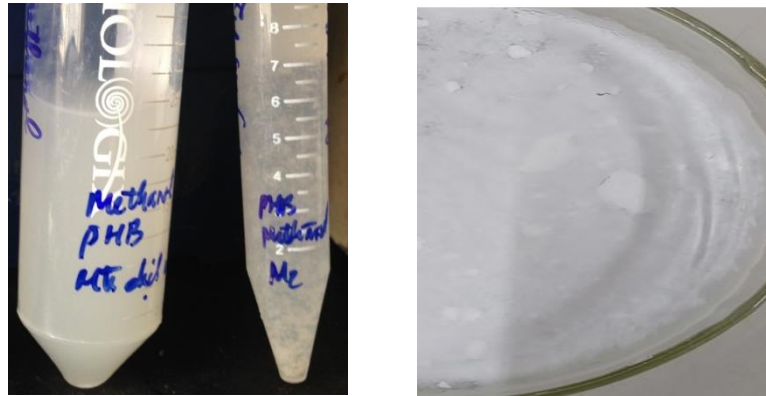


Hình 3.22. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C của PHA thu hồi từ chủng tái tổ hợp và PHB chuẩn sigma.

Thông qua kết quả phân tích phổ IR và NMR của PHA thu được từ chủng tái tổ hợp cho thấy, sản phẩm nhựa sinh học của chủng này được xác định là Poly (3-hydroxybutyrate hay P (3HB) với các đặc trưng cấu trúc được thể hiện trên Hình 3.23.



Hình 3.23. Cấu trúc phân tử PHA của chủng tái tổ hợp



Hình 3.24. Hình ảnh PHA tách chiết bằng dung môi của chủng tái tổ hợp

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đã tách dòng gen, xác định trình tự của gen *phaC* với độ tương đồng gần 99%, đã đăng ký trên ngân hàng genbank với mã số tương ứng MW269525.

Đã thiết kế thành công vector tái tổ hợp pPSP6 mang gen *phaC*. Đã tạo được chủng tái tổ hợp *B. megaterium* pPSPHAC/1 có khả năng tích lũy PHA cao hơn chủng gốc ban đầu. Hàm lượng PHA tích lũy đạt > 50% CDW. Đã khảo sát được các điều kiện nuôi cấy tối ưu để thu hồi PHA là: nhiệt độ nuôi cấy 37°C, thời gian thu mẫu là 48h sau cảm ứng, nồng độ chất cảm ứng là 2.5 mg/l.

Đã tách chiết PHA thành công với độ tinh sạch đạt 90%. Đã phân tích được cấu trúc sản phẩm PHA tách chiết từ chủng nghiên cứu là PHB.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy của chủng tái tổ hợp và xác định khả năng sinh tổng hợp ở quy mô lớn hơn để có thể đưa vào mô hình sản xuất nhựa sinh học.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

- 1. Nguyễn Trọng Linh, Nguyễn Thị Thu Trang, Trần Mạnh Hải, Nguyễn Thị Đà.** Đánh giá tác động của chế phẩm Polyhydroxyalkanoate lên men bởi chủng tái tổ hợp *Bacillus megaterium* pPSPHAR 1/1 đến dòng tế bào nguyên bào sợi của người. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Tây Nguyên – 2022.
- 2. Nguyễn Thị Đà, Nguyễn Trọng Linh, Nguyễn Thu Trang, Trần Mạnh Hải, Lê Thị Huyền.** Sàng lọc và đánh giá khả năng tích lũy Polyhydroxyalkanoate từ một số chủng *Bacillus sp.* Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm – Tập 3, số 3, 2020.
- 3. Phạm Thanh Huyền, Bach Thi Mai Hoa, Nguyen Trong Linh, La Thi Huyen, Nguyen Thi Da** (2022). Response surface methodology optimization of polyhydroxyalkanoate by recombinant *Bacillus megaterium* pPSPHAR1/1 strain using fish processing waste production. *Vietnam Journal of Science and Technology* **60** (3) .[doi:10.15625/2525-2518/16270](https://doi.org/10.15625/2525-2518/16270)
- 4. Nguyễn Thị Đà, Nguyễn Thu An, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Trọng Linh, Trần Mạnh Hải.** Nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *phaC* và gen *phaR* nâng cao khả năng sinh tổng hợp Polyhydroxybutyrate của chủng *Bacillus megaterium* DV01. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Tây Nguyên – 2022

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rujnic-Sokele M., Pilipovic A., 2017, Challenges and opportunities of biodegradable plastics: *A mini review*, *Waste Manag, Res*, 35, 132–140.
2. Peregrina, Alexandra, João Martins-Lourenço, Filomena Freitas, Maria A.M. Reis, and Cecília M. Arraiano, 2021, Post-Transcriptional Control in the Regulation of Polyhydroxyalkanoates Synthesis, *Life* 11, 8, 853.
3. Razza F., Innocentii F., 2012, Bioplastics from renewable resources: The benefits of biodegradability, *Asia Pac. J. Chem. Eng*, 7, 301–S309.
4. Steinbuchel A and Valentin HE., 1995, Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbia Lett*, 1281, 219–228.
5. Desmet MJ., 1983, Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans*, during growth on octane. *J. Bacteriol* 154, 870–878.
6. Gao X., Chen JC., Wu Q., Chen GQ., 2011, Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels, *Curr Opin Biotechnol* 22, 768–774.
7. Anderson AJ., Dawes EA., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol Rev* 54, 450–472.
8. Pena C., Castillo T., Garcia A., Millan M., Segura D., 2014, Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate), *a review of recent research work*, *Microb Biotechnol* 7, 278 – 293.
9. Prieto A., Escapa IF., Martínez V., Dinjaski N., Herencias C., de la Peña F., et al., 2016, A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*, *Environ, Microbiol*, 18, 341–357.
10. Lemoigne M., 1926, Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide β -oxybutyric, *Bull, Soc, Chim, Biol*, 8, 770-782.
11. Steinbüchel, A., 2001, Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example, *Macromol, Biosci*, 1, 1–24.

12. Nielsen C., Rahman A., Rehman AU., Walsh MK., and Miller CD., 2017, Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates, *Microb, Biotechnol*, 10, 1338–1352.
13. Kahar P., Tsuge T., Taguchi K., Doi Y., 2004, High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia utropha* and its recombinant strain, *Polym Degrad Stab*, 83, 79–86.
14. Tanaka K., Ishizaki A., Kanamaru T., Kawano T., 1995, Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO(2), H(2), and O(2) by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol Bioeng* 45(3), 268-75.
15. Zhang X., Lin Y., Wu Q., Wang Y., Chen GQ., 2019, Synthetic Biology and Genome-Editing Tools for Improving PHA, *Metabolic Engineering*, 38(7), 689-700.
16. Chen GQ., 2010, Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. *Plastics from bacteria*, Springer, 17-37.
17. Choi SY., Cho IJ., Lee Y., Kim Y., Kim K., Lee SY., 2020, Microbial Polyhydroxyalkanoates and Nonnatural Polyesters, *Advanced Materials* 32(35), 1907138.
18. Meng DC., 2014, Engineering the diversity of polyesters, *Curr, Opin, Biotechnol*, 29, 24–33.
19. Doi Y., 1990, *Microbial Polyesters*, New York, NY, Wiley VCH
20. Al-Kaddo KB., Sudesh K., and Samian MR., 2016, Screening of bacteria for PHA production using waste glycerol as carbon source and the ability of new strain to produce P (3HB-co-3HV) copolymer, *Malaysian J. Microbiol*, 12, 245–253.
21. Vigneswari S., Vijaya S., Majid MIA., Sudesh K., Sipaut CS., Azizan MNM., et al., 2009, Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties, *J. Ind. Microbiol, Biotechnol*, 36, 547–556.
22. Murugan P., Chhajjer P., Kosugi A., Arai T., Brigham CJ., and Sudesh K., 2016, Production of P(3HB-co-3HHx) with controlled compositions by recombinant *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113 from renewable resources, *CLEAN-Soil Air Water I* 44, 1234–1241.

23. Klinke S., Ren Q., Witholt B., and Kessler B., 1999, Production of medium-chain-length poly(3-Hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*, *Appl, Environ, Microbiol*, 65, 540–548.
24. Chen YJ., Huang YC., and Lee CY., 2014, Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7. *J. Biosci. Bioeng*, 118, 145–152.
25. Reusch RN., 1999, Streptomyces lividans potassium channel contains poly-(R)-3-hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate, *Biochemistry* 38, 15666–15672.
26. Yang Zheng, Chen Jin-Chun, Ma Yiming, Chen Guo-Qiang, 2020, Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction, *Metabolic Engineering* 58, 82-93.
27. Philip S., Keshavarz T., and Roy I., 2007, Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *J. Chem, Technol, Biotechnol*, 82, 233–247.
28. Sugappriya M., Sudarsanam D., Joseph J., Mudasir AM., and Selvaraj C., 2019, Applications of Polyhydroxyalkanoates Based Nanovehicles as Drug Carriers, *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*, 125 -169.
29. Luengo José M., García Belén, Sandoval Angel, Naharro Germán, Olivera Elías R., 2003, Bioplastics from microorganisms, *Current Opinion in Microbiology* 6(3), 251-260.
30. Sznajder A., Pfeiffer D., and Jendrossek D., 2015, Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16, *Appl Environ Microbiol* 81, 1847–1858.
31. Dinjaski N., Prieto MA., 2013, Swapping of phasin modules to optimize the in vivo immobilization of proteins to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida*, *Biomacromolecules* 14, 3285– 3293.
32. Pfeiffer D., Wahl A., Jendrossek D., 2011, Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells

- of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16, *Molecular microbiology*, 82, 936-951.
33. Kobayashi T., Uchino K., Abe T., Yamazaki Y., Saito T., 2005, Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16, *Journal of bacteriology* 187(15), 5129–5135.
 34. Yuan W., Jia Y., Tian J., Snell KD., Müh U., Sinskey AJ., Lambalot RH., Walsh CT., Stubbe J., 2001, Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies, *Arch Biochem Biophys* 394, 87–98.
 35. Mezzolla V., D’Urso O., Poltronieri P., 2018, Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis, *Polymers*, 10(8), 910 – 922.
 36. Qi Q., Rehm B., 2001, Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*, Molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase, *Microbiology* 147, 3353–3358.
 37. Liebergesell M., Rahalkar S., Steinbüchel A., 2000, Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase, subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme, *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 186–194.
 38. Tsuge T., Hyakutake M., Mizuno K., 2015, Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 6231–6240.
 39. McCool GJ., Cannon MC., 2001, PhaC and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*, *J Bacteriol*, 183, 4235–4243.
 40. Fukui T., Doi Y., 1997, Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*, *J Bacteriol*, 179, 4821–4830.
 41. Matsusaki H., Manji S., Taguchi K., 1998, Clonig and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp, strain 61-3, *J Bacteriol*, 180, 6459–6467.

42. Wittenborn EC., Jost M., Wei Y., Stubbe J., Drennan CL., 2016, Structure of the catalytic domain of the class I polyhydroxybutyrate synthase from *Cupriavidus necator*, *J. Biol. Chem.*, 291, 25264–25277.
43. Chek MF., Kim SY., Mori T., Arsad H., Samian MR., Sudesh K., 2017, Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp, USM2, producing biodegradable plastics, *Sci. Rep.*, 7, 5312 – 5327.
44. Yuan W., Jia Y., Tian J., Snell KD., Müh U., Sinskey AJ., Lambalot RH., Walsh CT., Stubbe J., 2001, Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies, *Arch Biochem Biophys* 394, 87–98.
45. Valappil SP., Misra SK., Boccaccini AR., Keshavarz T., Bucke C., Roy I., 2007, Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV, *J Biotechnol.*, 132, 251–258.
46. Mezzina M P., Pettinari MJ., 2016, Phasins, Multifaceted Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated Proteins, *Applied and environmental microbiology* 82(17), 5060–5067.
47. Galán B., Dinjaski N., Maestro B., 2011, Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442, *Mol Microbiol* 79, 402–418.
48. Prieto MA., Bühler B., Jung K., et al., 1999, PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for phage genes, *J Bacteriol* 181, 858–868.
49. Handrick R., Reinhardt S., Schultheiss D., Reichart T., Schüler D., Jendrossek V., Jendrossek D., 2004, Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation, *the activator is a PHB-granule-bound protein (phasin)*, *J Bacteriol* 186(8), 2466-2475.
50. Pieper-Fürst., Madkour MH., Mayer F., 1995, Steinbüchel A Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus*

- rubber that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules, *American Society for Microbiology* (177) 9, 2513-2523.
51. Schultheiss D., Handrick R., Jendrossek D., Hanzlik M., Schüler D., 2005, The presumptive magnetosome protein Mms16 Is a poly(3-Hydroxybutyrate) granule-bound protein (Phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*, *J. Bacteriol*, 187, 2416–2425.
 52. York GM., Stubbe J., Sinskey AJ., 2002, The *Ralstonia eutropha* PhaR Protein Couples Synthesis of the PhaP Phasin to the Presence of Polyhydroxybutyrate in Cells and Promotes Polyhydroxybutyrate Production, *Journal of Bacteriology* 184(1), 59–66.
 53. Wahl Andreas, Schuth Nora, Pfeiffer Daniel, Nussberger Stephan, Jendrossek Dieter, 2012, PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*, *BMC microbiology*, 12, 262 - 274.
 54. McChalicher CW., Srienc F., 2007, Investigating the structure-property relationship of bacterial PHA block copolymers, *Journal of Biotechnology*, 132, 296-302.
 55. Kulpreecha S., Boonruangthavorn A., Meksiriporn B., Thongchul N., 2009, Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*, *J Biosci Bioeng* 107, 240–245.
 56. Bugnicourt E., Cinelli P., Lazzeri A., & Álvarez V., 2014, Polyhydroxyalkanoate (PHA), Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging, *Express Polymer Letters* 8, 791-808.
 57. Lu J., Tappel RC., Nomura CT., 2009, Mini-review, Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates), *Polym, Rev*, 49, 226-248.
 58. Ng LM., and Sudesh K., 2016, Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea* sp. USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHA synthase, *J. Biosci. Bioeng*, 122, 550–557.
 59. Desouky S., El-Shiekh H., Elabd M., Amr Shehab, 2014, Screening, Optimization and Extraction of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from

- Bacillus thuringiensis, *Journal of Advances in Biology & Biotechnology* 1(1), 40-54.
60. Motamedi H., Ardakani MR., Mayeli N., 2015, Isolation and screening of native polyhydroxyalkanoate producing bacteria from oil contaminated soils of Abadan refinery, *Biological Journal of Microorganism* 3(12), 93-104.
 61. Ciesielski S., Pokoj T., Mozejko J., Klimiuk E., 2013, Molecular identification of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from enriched microbial community, *Polish journal of Miceobiology* 62(1), 45-50.
 62. Trần Hữu Phong, 2017, Nghiên cứu lên men và thu nhận Polyhydroxyalkanoates từ vi khuẩn phân lập ở một số vùng đất của Việt Nam, *Luận án tiến sĩ sinh học*.
 63. Wang HH., Zhou XR., Liu Q., Chen GQ., 2011, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(5), 1497-1507.
 64. Kalaiyezhini D., Ramachandran KB., 2014, Biosynthesis of Poly-3-Hydroxybutyrate (PHB) from Glycerol by *Paracoccus denitrificans* in a Batch Bioreactor: Effect of Process Variables, *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 45(1), 69–83.
 65. Zhao YX., Rao ZM., Xue YF., Gong P., Ji YZ., Ma YH., 2015, Poly (3-hydroxybutyrate- -3-hydroxyvalerate) production by Haloarchaeon *Halogramum amyloiticum*, *Applied Microbial and Cell Physiology* 99(18), 7639-7649.
 66. Han J., Hou J., Liu HL., Cai SF., Feng B., Zhou J., Xiang H., 2010, Wide distribution,
 67. Liu WT., Hanada S., Marsh TL., Kamagata Y., and Nakamura K., 2002, *Kineosphaera limosa* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive polyhydroxyalkanoate-accumulating coccus isolated from activated sludge, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52 (Pt.5). 1845–1849.
 68. Bhati R., Samantaray S., Sharma L., Mallick N., 2010, Polybetahydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy, *Biotechnol J* 5, 1181–1185.
 69. Wei YH., Chen WC., Huang CK., Wu HS., Sun YM., Lo CW., et al.,

- 2011, Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains, *Int. J. Mol. Sci* 12, 252–265.
70. Miyake M., Takase K., Narato M., 2000, Polyhydroxybutyrate production from carbon dioxide by cyanobacteria, *Appl Biochem Biotechnol*, 84, 991.
71. Ansari S., Fatma T., 2016, Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB), Screening, Optimization and Characterization, *PLoS ONE* 11(6).
72. Ray S., Kalia VC., 2017, Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates, *Indian J Microbiol*, 57(3), 261-269.
73. Zhang XC., Guo Y., Liu X., Chen XG., Wu Q., Chen GQ., 2018, Engineering Cell Wall Synthesis Mechanism for Enhanced PHB Accumulation in *E. coli*. *Metab. Eng.* 45, 32–42.
74. Poli N., Donato PD., Abbamondi GR., Nicolaus B., 2011, Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea, *Archaea*.
75. Wu Q., Huang H., Hu G., Chen J., Ho KP., Chen GQ., 2001, Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp, JMa5 cultivated in molasses media, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80,111–118.
76. Koller M. A., Salerno, G., Braunegg, 2014, Polyhydroxyalkanoates: Basics, production and applications of microbial biopolyesters, *Bio-Based Plastics, Materials and Applications*, First Edition, Edited by Stephan Kabasci.
77. Andreeßen B., Lange AB., Robenek H., Steinbüchel A., 2010, Conversion of glycerol to poly (3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* 76, 622-626.
78. Kroumova AB., Wagner GJ., Davies HM., 2002, Biochemical observations on medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis and accumulation in *Pseudomonas mendocina*, *Arch Biochem Biophys* 405(1), 95-103.
79. Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith JA., Struhl K., Wiley CJ., Allison RD., Bittner M., Blackshaw S., 2003, *Current Protocols in Molecular Biology*.

PHỤ LỤC

LOCUS phaC 1093 bp DNA linear BCT 29-OCT-2020

DEFINITION [B.megaterium] [strain DV01]- complete sequence.

ACCESSION MW269525

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Bacillus megaterium

ORGANISM Bacillus megaterium

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1093)

AUTHORS N,d.T., L,h., N,L.T. and N,T.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-OCT-2020) Cell animal Technology, IBT, VAST, 18 -

Hoang Quoc Viet, Cau giay, Ha Noi 084, Viet Nam

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:ntda@ibt.ac.vn

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:1

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1093

/organism="Bacillus megaterium"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="DV01"

/isolation_source="soil"

/db_xref="taxon:1404"

/country="Viet Nam"

/authority="huyen.L.T"

/authority="da.N.T"

/authority="Linh. N.T"

/authority="Trang. N.T"

/note="extrachromosomal

[cultured bacterial source]"

gene 1..1092

/gene="phaC gene"

/allele="PHB cluster"

CDS 1..1092

/gene="phaC gene"

/allele="PHB cluster"

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="PhaC protein sequence"

/translation="MVAIPYVQEWELFNSMPSEYKSSARRFKRAYEIMTTEAPEVGG

LTPKEVIWKKNKAKLYRYTPVKDNLHKTPILLVYALINKPYILDLTPGNSLVEYLLNR

GFDVYLLDWGTPGLEDSNMKLDDYIVDYIPKAAKKVLRSTKSPELSVLGYCMGGTMTS

IFAALNEDLPIKNLIFMTSPFDFSDTGLYGAFLLDDRYFNLDKAVDTFGNIPPEMIDFG

NKMLKPITNFYGPYVTLVDRSENQRFVESWKLQKQWVADGIPFAGEAYRQWIRDFYQQ

NKLINGELEVRGRKVDLKNIKANILNIAASRDHIAMPHQVAALMDAVSSEDKEYKLLQ

TGHVSVVFGPKAVKETYP SIGDWLEKRSK"

BASE COUNT 360 a 184 c 230 g 319 t

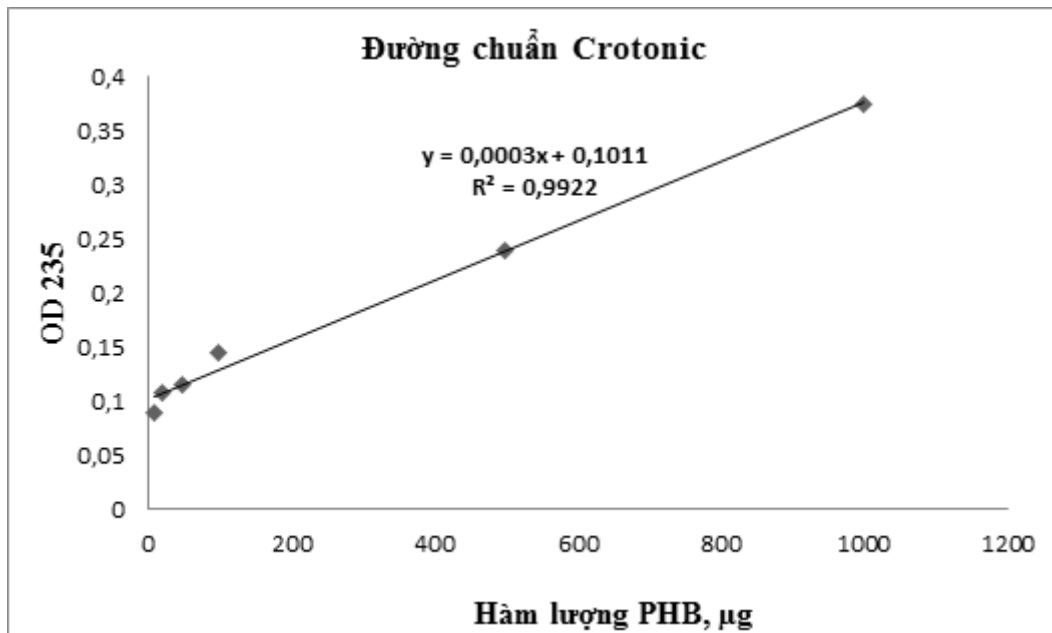
ORIGIN

```

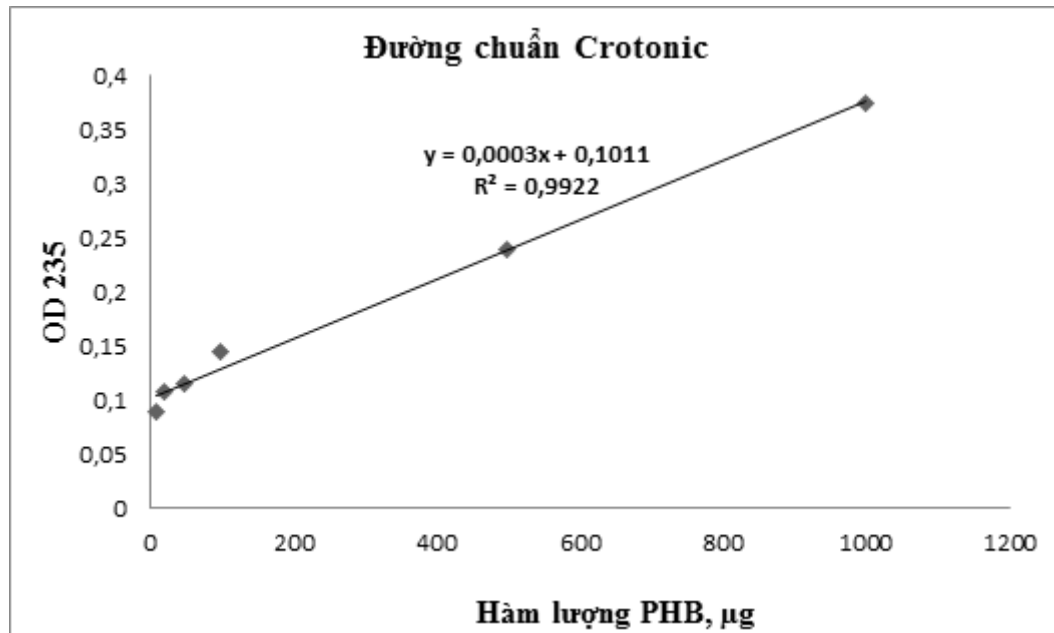
1 atggtggcaa ttcttacgt gcaagagtgg gaaaaattat tcaattcaat gccaaagtga
61 tataaaagt ctgcaagacg ttttaagcgt gcatatgaaa ttatgacaac agaagcagaa
121 ccggaagtgg gattaacacc aaaagaggtt atttgaaaa agaacaaagc gaaattatac
181 cgctatacgc cagtaaaaga taacctgcat aaaacaccaa tcttactcgt atatgcattg
241 atcaataaac catatattt agatttaacg cctggaaaca gccttggtga atacttatta
301 aaccgcgggt ttgactgta ttacttgac tggggaactc ctgggcttga agacagcaat
361 atgaagctag atgattatat tgtggattat attccaaaag cggcgaaaaa ggtgctgcgc
421 acttctaaat ctctgagtt gtctgttctt ggttactca tgggcggaac tatgacatct
481 tttttgctg cattaatga agactgccc attaaaaact taattttat gacaagtcca
541 ttgtatttt cggatacagg ttatcacggg gcattcctag acgatcgcta cttaattta
601 gataaacgag tagatacatt tggaaatc cctccagaga tgattgactt tggaaacaag
661 atgttaaacc caatcacgaa ttctacggg ccatatgtaa cgttgggtga tcgttcggaa
721 aatcagcgtt ttgtgaaag ctggaagctc atgcaaaagt ggggtgctga cggcatccca
781 tttgctgtg aagcttatcg tcagtggatt cgtgatttct atcaacaaa caaattaatc
841 aatggtgaac tgaagttcg cggacgcaaa gtagatttga aaaatattaa agctaattt
901 ttaaacttg ctgctagccg tgatcatatt gcgatccgc atcaagtggc agctttaatg
961 gacgctgtt caagtgaaga taaagagtat aaattgtgc aacaggtca cgtatctgtt
1021 gtattgtgc caaaagcagt gaaggaaaca taccctcaa tcggcgattg gctagaaaaa
1081 cgctctaaat aaa

```

//



Đường chuẩn crotonic dùng trong thí nghiệm sàng lọc chủng chứa vector tái tổ hợp pPSP6/phaC có khả năng tổng hợp PHA cao



Đường chuẩn crotonic dùng trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chủng tái tổ hợp tạo thành