



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026350

(51)⁷ C02F 3/34; C12N 1/16

(13) B

(21) 1-2014-02446

(22) 16/01/2013

(86) PCT/JP2013/050649 16/01/2013

(87) WO 2013/108775 25/07/2013

(30) 2012-009451 19/01/2012 JP

(45) 25/11/2020 392

(43) 26/01/2015 322A

(73) NISSAN CHEMICALS INDUSTRIES, LTD. (JP)

7-1, Kanda Nishiki-cho 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0054 Japan

(72) Katsutoshi HORI (JP); Masatake FUJIOKA (JP).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHŨNG YARROWIA LIPOLYTICA, TÁC NHÂN PHÂN HỦY DẦU VÀ CHẤT BÉO VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN HỦY VÀ LOẠI BỎ DẦU VÀ CHẤT BÉO NHỜ SỬ DỤNG CHŨNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật hữu ích cho việc phân hủy dầu và chất béo, và phương pháp sử dụng vi sinh vật này. Theo kết quả sàng lọc, chủng *Yarrowia lipolytica* có khả năng đồng hóa tốt axit béo tự do. Hiệu quả phân hủy dầu và chất béo đạt được bằng cách cho chủng *Yarrowia lipolytica* hoạt động trong điều kiện có sự có mặt của sản phẩm thủy phân dầu và chất béo, hoặc trong điều kiện dầu hoặc chất béo được phân hủy thành axit béo và glyxerol.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quá trình phân hủy dầu và chất béo. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Yarrowia*, hữu ích đối với quá trình phân hủy dầu và chất béo trong nước thải, thiết bị thu dầu mỡ hoặc các nguồn tương tự, tác nhân phân hủy dầu và chất béo và phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo nhờ sử dụng vi sinh vật, và tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phân hủy dầu và chất béo bằng vi sinh vật được dùng trong quá trình xử lý nước thải và các quá trình xử lý tương tự. Cụ thể là, khi xem xét thiết bị thu dầu mỡ là thiết bị xử lý được cấu hình để loại bỏ các thành phần dầu và chất béo có trong nước thải từ nhà bếp của các nhà hàng công nghiệp bằng cách tách rắn-lông, nguồn nước thải này là nguyên nhân gây ra mùi hôi và thu hút côn trùng có hại, có yêu cầu về công sức và chi phí cho việc thu thập và vận chuyển phần dầu được tách ra, và việc bảo dưỡng như lau chùi và các công việc tương tự, thiết lập công nghệ tiên tiến để loại bỏ dầu trong thiết bị thu dầu mỡ là mong muốn của các ngành công nghiệp, chủ yếu là ngành công nghiệp nhà hàng, và theo đó ứng dụng công nghệ phân hủy dầu và chất béo bằng vi sinh vật được thử nghiệm. Tuy nhiên, do nước thải từ nhà bếp của các nhà hàng công nghiệp chứa dầu và chất béo nhìn chung là có nồng độ 1g/L hoặc cao hơn, hoặc có nồng độ cao bằng 10g/L hoặc cao hơn, và nước thải trong nhiều thiết bị thu dầu mỡ có thời gian lưu trữ ngắn khoảng 10 phút, nên rất khó để xử lý dầu trong thiết bị thu dầu mỡ, vì vậy tác nhân phân hủy dầu và chất béo đủ để sử dụng thực tế vẫn được mong đợi.

Trong bối cảnh như vậy, một trong số các tác giả sáng chế đã báo cáo một loại vi sinh vật mới (*Burkholderia arboris*) tiết lipaza, triaxylglycerol hydrolaza, đây là một loại vi sinh vật có hiệu quả trong việc xử lý nước thải chứa dầu và chất béo (Tài liệu sáng chế 1). Mặt khác, tác giả sáng chế này cũng đã báo cáo cách thức để thúc đẩy sự phân hủy dầu và chất béo bằng cách sử dụng kết hợp vi sinh vật có đặc tính đồng hóa glycerol tốt (Tài liệu sáng chế 2).

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP 2010-227858 A

Tài liệu sáng chế 2: JP No. 2010-227849 A

Tài liệu sáng chế 3: JP 2011-160713 A

Tài liệu sáng chế 4: JP 2561441 B1

Tài liệu sáng chế 5: JP 2006-42774 A

Tài liệu sáng chế 6: US 2006/094092 A1

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: J. Mol. Catal. B. Enzym. Vol. 71 No. 3-4, p. 166-170, 2011

Tài liệu phi sáng chế 2: Eur. J. Lipid. Sci. Technol. Vol. 112, No.11, p. 1200-1208, 2010

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Phản ứng thủy phân triaxylglyxerol, là thành phần chính có trong dầu và chất béo, là một phản ứng thuận nghịch, và khi sự phân hủy dầu và chất béo diễn ra, thì các axit béo và glyxerol là sản phẩm thủy phân của triaxylglyxerol tích tụ lại, dẫn đến tốc độ thủy phân giảm xuống. Theo kỹ thuật nêu trong Tài liệu sáng chế 2 nêu trên, thì sự phân hủy dầu và chất béo được thúc đẩy bằng cách loại bỏ glyxerol, là một trong các sản phẩm của quá trình thủy phân, nhờ vi sinh vật có khả năng đồng hóa glyxerol cao. Tuy nhiên, trong sản phẩm thủy phân thì lượng axit béo áp đảo hơn so với glyxerol. Bản thân các axit béo được giải phóng ra (axit béo tự do) cũng là các thành phần dầu, do đó chúng nên được loại bỏ cùng với triaxylglyxerol. Đặc biệt trong trường hợp khi sử dụng vi sinh vật có khả năng thủy phân triaxylglyxerol cao như vi sinh vật đã báo cáo trong Tài liệu sáng chế 1, thì sự tiêu thụ các axit béo bởi vi sinh vật không thể bắt kịp so với sự tạo thành các axit béo mới, do đó một lượng lớn các axit béo tự do tích tụ lại trong bể xử lý, điều này dẫn đến làm giảm hiệu quả phân hủy dầu và chất béo. Tài liệu sáng chế 6 bộc lộ axit arachidonic (ARA) tạo ra bởi chủng vi khuẩn *Yarrowia lipolytica* trong đó gen mã hóa lipaza có thể bị phá vỡ để giảm thiểu sự thoái biến của ARA tích tụ trong tế bào.

Vì vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất một loại vi sinh vật hữu ích cho việc phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo hiệu quả, và sử dụng chúng, để giải quyết vấn đề nêu trên.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Theo mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã nghĩ đến việc sử dụng vi sinh vật có

khả năng thủy phân triaxylglyxerol cao kết hợp với các tác nhân thủy phân triaxylglyxerol khác (hỗn hợp chứa lipaza và các loại tương tự), và nghiên cứu để thu được một loại vi sinh vật có khả năng đồng hóa axit béo cao. Cụ thể là, các vi sinh vật được sàng lọc từ phần dầu mỡ trong bể thu dầu mỡ, và các mẫu môi trường như đất, bùn và nước hồ, bằng cách dùng khả năng đồng hóa axit béo làm chỉ thị, và các đặc tính đã được nghiên cứu cũng như các loài vi khuẩn đã được xác định. Kết quả là, nhiều chủng *Yarrowia lipolytica* được xác định là các vi sinh vật có khả năng đồng hóa axit béo cao. Nhìn chung, chủng *Yarrowia lipolytica* được biết đến là vi sinh vật tiết lipaza, và ứng dụng của chúng trong việc phân hủy dầu và chất béo cũng đã được ghi nhận (như trong các tài liệu sáng chế 3 đến 5 và Tài liệu phi sáng chế 1 và 2, và các tài liệu tương tự). Đáng ngạc nhiên là, tất cả các chủng *Yarrowia lipolytica* đều được xác định thành công là có khả năng đồng hóa axit béo, nhưng không biểu thị khả năng phân hủy dầu và chất béo (tức là không tiết lipaza). Chưa có báo cáo nào trước đó về chủng *Yarrowia lipolytica* chỉ ra đặc tính này.

Các tác giả sáng chế còn nghiên cứu và phát hiện ra rằng chủng *Yarrowia lipolytica* được xác định thành công là có khả năng phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris*, chủng này có khả năng thủy phân triaxylglyxerol cao, và chủng *Yarrowia lipolytica* còn thúc đẩy sự phân hủy dầu và chất béo khi sử dụng kết hợp với chủng *Burkholderia arboris*. Đặc biệt đáng chú ý là, khi sử dụng kết hợp hai loại vi sinh vật này thì có sự cải tiến mạnh mẽ về hiệu quả phân hủy dầu và chất béo và sự loại bỏ có thể đạt được trong môi trường nhiệt độ thấp mà dầu và chất béo khó phân hủy. Hơn nữa, dầu và chất béo cũng có thể được phân hủy và loại bỏ hiệu quả trong điều kiện mà dầu và chất béo có mặt ở nồng độ cao. Xét về môi trường sử dụng thực tế mà điều kiện xử lý khắc nghiệt được mong đợi, thì hiệu quả này có thể xem là cực kỳ thuận lợi trong sử dụng thực tế. Trên thực tế, hiệu quả với nước thải thực tế cũng đã được xác nhận, và tính hữu dụng cũng như thực tiễn của các vi sinh vật (*Yarrowia lipolytica*) đã thu được cũng đã được xác nhận (xem các Ví dụ dưới đây). Mặt khác, điều này cũng đã được làm rõ trong một thí nghiệm xác minh bằng cách cho kết hợp vi sinh vật đã thành công thu được vào một thiết bị thu dầu mỡ, kết quả là hiệu quả phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo đã được cải tiến mạnh mẽ (xem các Ví dụ dưới đây).

Sáng chế thể hiện dưới đây chủ yếu dựa trên các thành tựu nêu trên và đề xuất các phương án được đặc trưng trong yêu cầu bảo hộ, mà xác định sáng chế.

[1] Phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo, bao gồm việc cho chủng *Yarrowia lipolytica* là chủng có khả năng đồng hóa axit béo tự do tiếp xúc với axit béo là sản phẩm thủy phân của triaxylglyxerol hoặc với axit béo và glyxerol được thủy phân từ

triaxylglyxerol, trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* không tiết lipaza và là một chủng được chỉ định bởi số đăng ký NITE BP-1167.

[2] Phương pháp theo mục [1], trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* được chỉ định bằng số đăng ký NITE BP-1167 có khả năng phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris*.

[3] Phương pháp theo mục [1] hoặc [2], trong đó có sự có mặt của glyxerol lipaza trong quá trình thủy phân của triaxylglyxerol thành axit béo

[4] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó có sự có mặt của vi sinh vật có khả năng tiết lipaza trong quá trình thủy phân triaxylglyxerol thành axit béo và glyxerol.

[5] Phương pháp theo mục [4], trong đó vi sinh vật là chủng *Burkholderia arboris*, tốt hơn là chủng *Burkholderia arboris* là chủng có số đăng ký là NITE P-724.

[6] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó còn có vi sinh vật có khả năng đồng hóa glyxerol được sử dụng kết hợp.

[7] Phương pháp theo mục [6], trong đó vi sinh vật có khả năng đồng hóa glyxerol là chủng *Candida cylindracea*, tốt hơn là trong đó chủng *Candida cylindracea* là chủng có số đăng ký là NITE P-714.

[8] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó dầu và chất béo là dầu và chất béo trong nước thải hoặc thiết bị thu dầu mỡ.

[9] Phương pháp xử lý nước thải, bao gồm việc phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo trong nước thải bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8].

[10] Phương pháp làm sạch thiết bị thu dầu mỡ, bao gồm việc phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo trong thiết bị thu dầu mỡ bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8].

[11] Chủng *Yarrowia lipolytica* có các đặc tính sau:

(1) Chủng *Yarrowia lipolytica* đồng hóa axit béo tự do;

(2) Chủng *Yarrowia lipolytica* không tiết lipaza; và

(3) Chủng *Yarrowia lipolytica* có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris*, trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* là chủng có số đăng ký là NITE BP-1167.

[12] Tác nhân phân hủy dầu và chất béo chứa chủng *Yarrowia lipolytica* theo mục [11] là tác nhân có hoạt tính.

[13] Tác nhân theo mục [12] còn bao gồm thành phần thủy phân triaxylglycerol thành axit béo và kết hợp với glyxerol.

Cũng được bộc lộ ở đây là bộ kit bao gồm thành phần thứ nhất chứa chủng *Yarrowia lipolytica*, và thành phần thứ hai chứa thành phần nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 biểu thị kết quả phân tích phát sinh loài của chủng *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) 1A1.

Fig.2 biểu thị so sánh về khả năng phân hủy axit oleic của 12 chủng đã được sàng lọc. Axit oleic còn lại trong môi trường nuôi cấy được phân tích bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC).

Fig.3 biểu thị khả năng phát triển của chủng *Y. lipolytica* 1A1. Sự phát triển thu được trong môi trường nuôi cấy thạch với nồng độ 10g/L (1%) dầu chiết xuất từ cây cải dầu (cao hơn) và 10g/L (1%) axit oleic (thấp hơn) tương ứng được bổ sung làm nguồn cacbon. Chủng *Burkholderia arboris* (*B. arboris*) SL1B1 được sử dụng làm vi sinh vật so sánh.

Fig.4 biểu thị sự phân hủy dầu và chất béo hoạt động ở 28°C (lượng dầu và chất béo là 10g/L). So sánh trường hợp khi nuôi cấy riêng rẽ chủng *B. arboris* SL1B1 (trái) và trường hợp khi nuôi cấy hỗn hợp chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 (phải).

Fig.5 biểu thị sự phân hủy dầu và chất béo hoạt động ở 22°C (lượng dầu và chất béo là 10g/L). So sánh trường hợp khi nuôi cấy riêng rẽ chủng *B. arboris* SL1B1 (trái) và khi nuôi cấy hỗn hợp chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 (phải).

Fig.6 biểu thị sự phân hủy dầu và chất béo hoạt động ở 22°C (lượng dầu và chất béo là 30g/L). So sánh trường hợp khi nuôi cấy riêng rẽ chủng *B. arboris* SL1B1 (trái) và khi nuôi cấy hỗn hợp chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 (phải).

Fig.7 biểu thị lượng giá trị hexan trung bình giảm trong thử nghiệm phân hủy dầu và chất béo trong nước thải thực tế nhờ hỗn hợp vi sinh vật. Hỗn hợp vi sinh vật bao gồm chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 được cho nhiễm vào nước thải thực tế và được cho phản ứng. Lượng giá trị hexan trung bình giảm được đo ở thời điểm sau 12 giờ (trái) và sau 18 giờ (phải).

Fig.8 biểu thị sự thay đổi về số lượng các tế bào phát triển được ở thời điểm sau 12 giờ và sau 18 giờ đối với các tế bào phát triển được đã được nhiễm. Hỗn hợp vi sinh vật gồm chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 được nhiễm vào nước thải thực tế và phản ứng diễn ra. So sánh số lượng tế bào phát triển được ở thời điểm sau 12 giờ và sau 18 giờ.

Fig.9 biểu thị kết quả xét nghiệm trong một thiết bị thu dầu mỡ. Hỗn hợp gồm ba loại vi sinh vật là chủng *B. arboris* SL1B1, chủng *Candida cylindracea* SL1B2 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 được nhiễm vào trong thiết bị thu dầu mỡ, sau đó đo giá trị hexan trung bình theo thời gian. Để so sánh, phần thử nghiệm không nhiễm hỗn hợp vi sinh vật (Ví dụ so sánh 1) và phần thử nghiệm có nhiễm hỗn hợp hai loại vi sinh vật là chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Candida cylindracea* SL1B2 (Ví dụ so sánh 2) được đưa ra.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phương án được cụ thể hóa dấu hiệu kỹ thuật bởi các yêu cầu bảo hộ, theo đó các yêu cầu bảo hộ xác định sáng chế.

1. Phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo. Phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo theo sáng chế được sử dụng để xử lý dầu và chất béo có trong nước thải, sử dụng để làm sạch thiết bị thu dầu mỡ và các mục đích tương tự. Cụ thể là, sáng chế có thể được ứng dụng để xử lý nước thải có chứa dầu và chất béo như nước thải từ các nhà hàng, bệnh viện, khách sạn, và tương tự, nước thải hộ gia đình, nước thải công nghiệp và nước thải chảy từ các nhà máy chế biến thực phẩm, các nhà máy chế biến dầu mỡ và các nguồn tương tự, hoặc để phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo tích tụ lại trong thiết bị thu dầu mỡ trong nhà bếp hoặc tương tự. Thuật ngữ “thiết bị thu dầu mỡ” chỉ một hệ thống có tác dụng tách và thu dầu và chất béo trong nước thải, và thường được thiết lập gồm 3 bể. Bể thứ nhất bao gồm một túi lưới có tác dụng giữ các mẫu nguyên liệu thực phẩm, đồ ăn còn thừa hoặc các vật liệu tương tự. Bể thứ hai có tác dụng tách phần dầu mỡ và phần nước. Nước thải được tách khỏi phần dầu mỡ được đưa vào bể thứ ba, tại bể này các chất cặn lắng xuống bị loại bỏ. Yêu cầu phải lắp đặt hệ thống thiết bị thu dầu mỡ đối với các bếp ăn sử dụng chuyên nghiệp trong các nhà hàng, bệnh viện hoặc các nơi tương tự.

Các ví dụ về dầu và chất béo được xử lý có thể bao gồm các loại dầu thực vật (như dầu bông, dầu hạt cải dầu, dầu đậu nành, dầu bắp, dầu ô-liu, dầu cây rum, dầu gạo, dầu mè,

dầu cọ, dầu dừa, dầu đậu phộng và các loại dầu tương tự), mỡ động vật (như mỡ lợn, mỡ bò, mỡ sữa và các loại mỡ tương tự) và dầu cá. Các sản phẩm được chế biến từ các loại dầu và chất béo này (như bơ thực vật, bơ, và các loại tương tự) cũng có thể là các đối tượng được xử lý.

Đặc trưng quan trọng của phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo theo sáng chế đó là, chủng *Yarrowia lipolytica* là chủng đồng hóa axit béo tự do cho tiếp xúc với axit béo là sản phẩm thủy phân của triaxylglyxerol (sau đây gọi là “điều kiện thứ nhất”), hoặc với axit béo và glyxerol được thủy phân từ triaxylglyxerol (sau đây gọi là “điều kiện thứ hai”), trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* không tiết lipaza và là chủng được chỉ định bằng số đăng ký NITE BP-1167. Thuật ngữ “để hoạt động” như được sử dụng ở đây chỉ sự hình thành trạng thái cho phép tiếp xúc với axit béo tự do là sản phẩm thủy phân của dầu và chất béo. Cụ thể là, hỗn hợp chứa chủng *Yarrowia lipolytica* đồng hóa axit béo tự do, hoặc các chủng tương tự được đặt hoặc bổ sung, hoặc hỗ trợ mà chủng *Yarrowia lipolytica* được cố định hoặc được bố trí trong một đường ống dẫn nước thải, trong bể lưu nước thải, thiết bị thu dầu mỡ hoặc tương tự. Cũng có thể xử lý bể xử lý phân hủy chuyên dụng khác bên ngoài thiết bị thu dầu mỡ.

Theo sáng chế, nhờ sử dụng chủng *Yarrowia lipolytica* có khả năng đồng hóa các axit béo tự do cao, mà axit béo tự do được tạo ra bởi sự thủy phân triaxylglyxerol đã được loại bỏ. Ngoài ra, sự tích lũy các axit béo tự do cũng đã được ngăn chặn, nhờ đó đẩy mạnh được sự thủy phân triaxylglyxerol. Trong trường hợp điều kiện thứ nhất được thông qua, thường thì triaxylglyxerol được thủy phân trước, sáng chế được ứng dụng. Đối với việc thủy phân triaxylglyxerol, thì lipaza hoặc vi sinh vật có khả năng tiết lipaza (xem phần giải thích dưới đây) có thể được sử dụng. Mặt khác, trong trường hợp điều kiện thứ hai được thông qua, theo như lệ thường là có sự có mặt của trạng thái mà lipaza hoặc vi sinh vật có khả năng tiết lipaza được tạo thành.

Trong trường hợp khi một trong các điều kiện được đáp ứng, thì nhiều lipaza có thể được sử dụng, và tốt hơn là sử dụng hợp phần chứa lipaza thương mại sẵn có. Các ví dụ về hợp phần chứa lipaza có thể bao gồm lipazalipaza A10FG (được sản xuất bởi Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.), lipaza AL, lipaza OF và lipaza MY (các hợp phần này được sản xuất bởi Meito Sangyo Co., Ltd.), Lipolase, Lipex, Resinase, Lipozyme, Patalase, Lipopan và Lecithase (các hợp phần này được sản xuất bởi Novozymes Japan Ltd.), lipaza AS “Amano”, lipaza AYS “Amano”, lipaza PS “Amano”, lipaza AK “Amano”, lipaza PS “Amano”, lipaza A “Amano”, lipaza AY “Amano”, lipaza G “Amano”, lipaza R “Amano”,

lipaza DF “Amano” và lipaza MER “Amano” (các hợp phần này được sản xuất bởi Amano Enzyme, Inc.). Mặt khác, các chi như chi *Bacillus*, chi *Burkholderia*, chi *Acinetobacter*, chi *Pseudomonas*, chi *Alcaligenes*, chi *Rhodobacter*, chi *Ralstonia*, chi *Acidovorax* và các chi tương tự được sử dụng làm các vi sinh vật có khả năng tiết lipaza. Trong số này, tốt hơn là sử dụng các vi sinh vật thuộc chi *Burkholderia*. Ví dụ đặc trưng về các vi sinh vật thuộc chi *Burkholderia* là chủng chủng *Burkholderia arboris* SL1B1. Chủng này đã được lưu trữ tại Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Kho lưu trữ vi sinh vật sáng chế với số đăng ký là NITE P-724, và có thể được chia nhỏ bằng cách trải qua các thủ tục xác định trước. Chủng này phân hủy dầu và chất béo ở tốc độ cao. Ngoài ra, chủng này thậm chí còn có thể phát triển và phân hủy dầu và chất béo trong điều kiện axit yếu.

Khả năng tiết lipaza của vi sinh vật có thể được xác định bằng cách đo hoạt tính lipaza trong dịch nuôi cấy đã thu được, bằng cách ly tâm phần môi trường nuôi cấy chứa vi sinh vật. Hoạt tính lipaza có thể được xác định bằng cách tiến hành phản ứng enzym nhờ sử dụng 4-nitrophenyl palmitat (4-NPP), là một este của axit palmitic và 4-nitrophenol, đóng vai trò là chất nền, và xác định lượng 4-nitrophenol được tạo ra bởi quá trình thủy phân este nhờ đo sự hấp thụ ở 410nm. Đầu tiên, bổ sung 4-NPP (18,9mg) vào 3% (tính theo thể tích/thể tích) Triton X-100 (12mL) rồi hòa tan ở 70°C thu được dung dịch chất nền. 1mL dung dịch chất nền này, 0,9mL nước trao đổi ion và 1mL của đệm GTA 150 mM (thu được bằng cách cho NaOH hoặc HCl vào 150 mM axit 3,3-dimethylglutaric, 150mM Tris và 150 mM 2-amino-2-metyl-1,3-propanediol, rồi điều chỉnh môi trường pH 6) được đặt vào trong một bình nhỏ, giữ ấm ở 28°C trong 5 phút. Bổ sung 0,1mL dịch nuôi cấy, rồi xác định giá trị ở 410nm khi khuấy. Hoạt tính lipaza thu được bằng cách đo hoạt tính nhờ xác định lượng enzym tạo ra 1μmol 4-nitrophenol là một đơn vị (U), và đo số đơn vị trong mỗi 1mL dịch nuôi cấy.

Khả năng phân hủy triaxylglyxerol và axit béo của vi sinh vật có thể được đánh giá bằng cách xác định lượng axit béo thu được trong triaxylglyxerol còn tồn tại trong môi trường nuôi cấy và axit béo tự do được tạo ra bởi quá trình thủy phân, nhờ phương pháp sắc ký khí. Phương pháp đặc trưng để định lượng được chỉ ra dưới đây. Thứ nhất, tạo môi trường axit cho 1mL dịch nuôi cấy bằng axit hydrocloric, rồi bổ sung 2mL. Khuấy hỗn hợp trong 2 phút rồi ly tâm, sau đó chuyển 1mL lớp clorofom sang một bình chứa khác và cô đặc bằng cách làm bay hơi dung môi. Bổ sung 2mL dung dịch metanolysis (tỉ lệ metanol : axit sulfuric là 17 : 3), làm nóng hỗn hợp ở 100°C trong 2 giờ, nhờ đó triaxylglyxerol và axit béo tự do được este hóa methyl. Sau đó bổ sung 2mL clorofom và 1mL nước tinh khiết, khuấy

hỗn hợp rồi phân tích lớp clorofom bằng phương pháp sắc ký khí để định lượng metyl este trong axit béo.

Khả năng thủy phân triaxylglyxerol và phân hủy hoàn toàn axit béo của vi sinh vật được đo bằng cách phân tích triaxylglyxerol còn lại trong môi trường nuôi cấy và axit béo là sản phẩm thủy phân của nó, bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC). Phương pháp đặc trưng được chỉ ra dưới đây. Cho 40mL etyl axetat vào 20mL dịch nuôi cấy, hỗn hợp này được tạo môi trường axit bằng cách bổ sung axit hydrocloric rồi khuấy trong 10 phút. Sau đó, cô đặc 20mL lớp etyl axetat và hòa tan trong 4mL clorofom, rồi lấy 2 μ l phân tích bằng phương pháp TLC và bổ sung dung dịch clorofom : axeton (theo tỉ lệ 96 : 4). Đóng vai trò là chất nền chuẩn cho triaxylglyxerol và axit béo, axit trioleic và axit oleic cũng có thể được tuân tự sử dụng. Sau khi bổ sung, xit 4% dung dịch etanol (tính theo trọng lượng / thể tích) của axit 12 molybdo (IV) phosphoric vào ngay sau đó, rồi làm nóng ở 100°C trong 30 phút, nhờ đó triaxylglyxerol và axit béo tự do được hiển thị.

Như được chỉ ra trong phần Ví dụ dưới đây, kết quả xét nghiệm của các tác giả sáng chế đã xác minh rằng chủng *Yarrowia lipolytica* đã được xác định có khả năng đồng hóa tốt axit béo tự do và không tiết lipaza. Dựa trên thực tế này, theo một phương án của sáng chế, chủng *Yarrowia lipolytica* có đặc tính không tiết lipaza được sử dụng. Mặt khác, kết quả xét nghiệm của các tác giả sáng chế cũng xác minh rằng chủng *Yarrowia lipolytica* đã thu được, có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris* và đạt được hiệu quả phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo. Dựa trên thực tế này, chủng *Yarrowia lipolytica* có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris* ưu tiên được sử dụng. Ngoài ra, trong trường hợp này, chủng *Burkholderia arboris* được sử dụng kết hợp. Các ví dụ đặc trưng về chủng *Yarrowia lipolytica* có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris* là chủng 1A1, chủng 8A1, chủng 8D1 và chủng 24B2, các chủng này được chỉ ra trong phần Ví dụ dưới đây. Trong số này, tốt hơn là sử dụng chủng 1A1 có hiệu quả cao khi dùng kết hợp với chủng *Burkholderia arboris* SL1B1. Chủng này đã được lưu trữ vào kho chứa có thẩm quyền đã được xác định trước nêu dưới đây.

Viện lưu trữ: Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Kho lưu trữ Vi sinh vật Sáng chế (2-5-8 Kazusa Kamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818 JAPAN)

Ngày cung cấp: 25 tháng 11 năm 2011

Số đăng ký: NITE BP-1167

Theo một phương án nữa của sáng chế, vi sinh vật đồng hóa glyxerol, là một trong

các sản phẩm thủy phân của triaxylglyxerol được sử dụng kết hợp để ngăn ngừa việc giảm tốc độ phân hủy dầu và chất béo do sự tích lũy glyxerol. Vi sinh vật ở đây không đặc biệt giới hạn, miễn là nó có thể đồng hóa glyxerol, ví dụ các vi khuẩn thực, nấm men và nấm sợi có thể được sử dụng. Tốt hơn là sử dụng nấm men thuộc chi *Candida*. Ví dụ đặc trưng về nấm men thuộc chi *Candida* là chủng *Candida cylindracea* SL1B2 (Tài liệu sáng chế 2). Chủng này được lưu trữ tại Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia, Kho lưu trữ Vi sinh vật Sáng chế với số đăng ký là NITE P-714, và có thể được chia nhỏ do phải trải qua các thủ tục xác định trước. Chủng này có khả năng đồng hóa glyxerol cao, và cũng có đặc tính có thể phát triển cộng sinh cùng với *Burkholderia arboris*. Theo đó, sử dụng kết hợp với chủng *Candida cylindracea* SL1B2 là đặc biệt ưu tiên trong phương án mà chủng *Burkholderia arboris* được sử dụng (cụ thể là, theo phương án mà chủng *Burkholderia arboris* là chủng có khả năng tiết lipaza được sử dụng để tạo thành điều kiện mà triaxylglyxerol được thủy phân thành axit béo và glyxerol). Ví dụ đặc trưng về *Burkholderia arboris* ở đây là chủng *Burkholderia arboris* SL1B1 nói trên (với số đăng ký là NITE P-724).

Khả năng phân hủy hoàn toàn glyxerol của vi sinh vật có thể được đo bằng cách định lượng nồng độ glyxerol trong dịch nuôi cấy nhờ một quá trình enzym. Để tiến hành việc định lượng này, có thể sử dụng một bộ định lượng thương mại có sẵn trên thị trường như Fkit-glyxerol (được sản xuất bởi Roche). Ngoài ra, khả năng đồng hóa triaxylglyxerol, axit béo và glyxerol của vi sinh vật có thể được xác định bằng cách nghiên cứu tiềm năng phát triển trong môi trường nuôi cấy có chứa tuần tự triaxylglyxerol, axit béo và glyxerol đóng vai trò là nguồn cacbon. Phương pháp nghiên cứu tiềm năng phát triển bao gồm việc đo mật độ quang học của các tế bào vi sinh vật đã được minh họa, nhưng phương pháp này không thích hợp với một vài trường hợp khi dịch môi trường nuôi cấy trở nên đục do sự nhũ tương hóa chất nền trong trường hợp triaxylglyxerol hoặc axit béo được sử dụng làm nguồn cacbon. Phương pháp linh hoạt hơn là phương pháp đo đơn vị tạo dòng (CFU) đã được minh họa. Một lượng xác định của dịch không bị pha loãng và dịch pha loãng của môi trường nuôi cấy được trải trên môi trường nuôi cấy thạch, và tiến hành đếm các dòng tạo thành bằng môi trường nuôi cấy tĩnh.

Điều kiện nhiệt độ áp dụng phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo theo sáng chế không đặc biệt giới hạn miễn là chủng *Yarrowia lipolytica* được sử dụng có thể phát triển và đồng hóa axit béo tự do. Nhiệt độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C. Chủng *Yarrowia lipolytica* 1A1 biểu thị hoạt động tốt trong điều kiện nhiệt độ thấp mà ở nhiệt độ này hiệu quả phân hủy dầu và chất béo giảm. Đặc biệt trong trường hợp khi

chủng *Burkholderia arboris* SL1B1 được sử dụng kết hợp, thì sự phát triển của chủng *Burkholderia arboris* SL1B1 cũng được thúc đẩy, và do đó hiệu quả phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo cũng tăng lên đáng kể như đã so sánh với trường hợp khi chủng *Burkholderia arboris* SL1B1 được sử dụng riêng rẽ.

Trường hợp khi sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều loại vi sinh vật, chẳng hạn trường hợp khi sử dụng kết hợp chủng *Yarrowia lipolytica* và *Burkholderia arboris*, và trường hợp khi chủng *Candida cylindracea* được sử dụng kết hợp, thì các vi sinh vật tương ứng được nuôi cấy riêng rẽ và cho sử dụng. Ngoài ra, hỗn hợp (tác nhân vi sinh vật hỗn hợp) có thể được điều chế trước và sử dụng. Trường hợp khi sử dụng kết hợp ba hoặc nhiều loại vi sinh vật, thì không cần thiết phải tạo tất cả các vi sinh vật vào trong một tác nhân vi sinh vật hỗn hợp (tức là, trong trường hợp sử dụng ba loại vi sinh vật, thì có thể điều chế một tác nhân vi sinh vật chứa một loại vi sinh vật và một tác nhân vi sinh vật chứa hai loại vi sinh vật khác, rồi kết hợp sử dụng các tác nhân vi sinh vật này).

Lượng sử dụng của chủng *Yarrowia lipolytica* theo sáng chế có thể được điều chỉnh trước phù hợp với đối tượng được xử lý, điều kiện xử lý và tương tự. Ví dụ về lượng sử dụng, trong trường hợp áp dụng phương pháp này cho nước thải từ nhà máy (có giá trị hexan trung bình khoảng 300mg/L), thì sản phẩm nuôi cấy chủng *Yarrowia lipolytica* có nồng độ từ 1×10^4 CFU/mL đến 1×10^9 CFU/mL được bổ sung từ 1mL đến 100mL cho mỗi 1L thể tích của bể xử lý. Trong trường hợp áp dụng phương pháp này cho thiết bị thu dầu mỡ, thì sản phẩm nuôi cấy chủng *Yarrowia lipolytica* có nồng độ 1×10^4 CFU/mL đến 1×10^{11} CFU/mL được bổ sung từ 1mL đến 100mL cho mỗi 1L thể tích của thiết bị thu dầu mỡ. Tương tự, lượng sử dụng của thành phần được sử dụng kết hợp có thể được điều chỉnh phù hợp với đối tượng được xử lý, điều kiện xử lý và tương tự. Lượng sử dụng trong trường hợp khi sử dụng kết hợp chủng *Burkholderia arboris* là từ 1mL đến 100mL sản phẩm nuôi cấy có nồng độ từ 1×10^4 CFU/mL đến 1×10^9 CFU/mL cho mỗi 1L thể tích của bể xử lý (trong trường hợp xử lý nước thải) hoặc từ 1mL đến 100mL sản phẩm nuôi cấy có nồng độ từ 1×10^4 CFU/mL đến 1×10^{11} CFU/mL cho mỗi 1L thể tích của thiết bị thu dầu mỡ (trong trường hợp làm sạch hồ dầu mỡ). Tương tự, lượng sử dụng trong trường hợp sử dụng kết hợp chủng *Candida cylindracea* là từ 1mL đến 100mL sản phẩm nuôi cấy có nồng độ từ 1×10^4 CFU/mL đến 1×10^9 CFU/mL cho mỗi 1L thể tích của bể xử lý (trong trường hợp xử lý nước thải), hoặc từ 1mL đến 100mL sản phẩm nuôi cấy có nồng độ từ 1×10^4 CFU/mL đến 1×10^{11} CFU/mL cho mỗi 1L thể tích của thiết bị thu dầu mỡ (trong trường hợp làm sạch thiết bị thu dầu mỡ). Ngoài ra, để duy trì hiệu lực, tốt hơn là bổ sung hoặc thay thế vi sinh

vật trong một khoảng thời gian, chẳng hạn từ 1 giờ đến 7 ngày. Tương tự như lượng sử dụng vi sinh vật, tần suất bổ sung hoặc thay thế này cũng có thể được điều chỉnh trước phù hợp với đối tượng được xử lý, điều kiện xử lý và tương tự.

2. Vi sinh vật và tác nhân phân hủy dầu và chất béo có khả năng đồng hóa axit béo tự do cao

Khía cạnh thứ hai theo sáng chế đề cập đến vi sinh vật có khả năng đồng hóa axit béo tự do cao, và tác nhân phân hủy dầu và chất béo chứa vi sinh vật là thành phần hoạt chất. Như đã đề cập ở trên, chủng *Yarrowia lipolytica* đã được xác định thành công bởi các tác giả sáng chế biểu thị đặc tính là chúng có khả năng đồng hóa axit béo tự do cao nhưng không tiết lipaza. Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng đã làm rõ chủng *Yarrowia lipolytica* có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris* và có thể đạt được hiệu quả phân hủy dầu và chất béo. Dựa trên những phát hiện này, chủng *Yarrowia lipolytica* được đề cập có các đặc tính sau: (1) chủng *Yarrowia lipolytica* đồng hóa axit béo tự do; (2) chủng *Yarrowia lipolytica* không tiết lipaza; và (3) chủng *Yarrowia lipolytica* có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris*, trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* là chủng được chỉ định bằng số đăng ký NITE BP-1167. Do chủng *Yarrowia lipolytica* theo sáng chế có đặc tính (3), nên chủng này thích hợp để sử dụng kết hợp cùng với chủng *Burkholderia arboris*. Cụ thể là, chủng *Yarrowia lipolytica* ngăn chặn sự tích lũy của axit béo tự do và thúc đẩy sự thủy phân triaxylglycerol, và cũng thúc đẩy sự phát triển của chủng *Burkholderia arboris*, bằng cách sử dụng kết hợp cùng với chủng *Burkholderia arboris*, thì sự phân hủy dầu và chất béo cũng được thúc đẩy.

Tác nhân phân hủy dầu và chất béo và chủng *Yarrowia lipolytica* theo sáng chế được áp dụng cho các sản phẩm thủy phân triaxylglycerol. Cụ thể là, chủng *Yarrowia lipolytica* được sử dụng làm thành phần hoạt chất. Ngoài ra, chủng *Yarrowia lipolytica* và thành phần thủy phân triaxylglycerol thành axit béo và glycerol (ở đây chỉ “thành phần thủy phân triaxylglycerol”) được sử dụng kết hợp. Theo tác nhân phân hủy dầu và chất béo của phương án này, thì sự phân hủy dầu và chất béo được tiến hành nhờ thành phần thủy phân triaxylglycerol, trong khi sự tích lũy axit béo (axit béo tự do), là sản phẩm thủy phân của triaxylglycerol, được ngăn chặn bởi chủng *Yarrowia lipolytica*. Kết quả là, thu được hiệu quả phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo. Trong phần mô tả, cụm từ “chủng *Yarrowia lipolytica* và thành phần thủy phân triaxylglycerol được sử dụng kết hợp” hoặc “chứa kết hợp của chủng *Yarrowia lipolytica* và thành phần thủy phân triaxylglycerol” chỉ chủng *Yarrowia lipolytica* và thành phần thủy phân triaxylglycerol được sử dụng kết hợp. Tác nhân phân hủy dầu và chất béo theo sáng chế được đề cập điển hình là tác nhân hỗn hợp thu được

bằng cách trộn chủng *Yarrowia lipolytica* theo sáng chế với thành phần thủy phân triaxylglyxerol. Ví dụ như, tác nhân phân hủy dầu và chất béo thu được bằng cách trộn sản phẩm nuôi cấy chủng *Yarrowia lipolytica* theo sáng chế với thành phần thủy phân triaxylglyxerol. Lipaza hoặc vi sinh vật có khả năng tiết lipaza được sử dụng làm thành phần thủy phân triaxylglyxerol. Lipaza và vi sinh vật có khả năng tiết lipaza này đã được giải thích trong khía cạnh thứ nhất theo sáng chế. Tốt hơn là sử dụng chủng *Burkholderia arboris*, và tốt hơn nữa là sử dụng chủng *Burkholderia arboris* SL1B1 có số đăng ký là NITE P-724 làm vi sinh vật có khả năng tiết lipaza.

Mặt khác, ví dụ, tác nhân phân hủy dầu và chất béo theo sáng chế cũng có thể được đề cập ở dạng là một bộ kit bao gồm thành phần thứ nhất chứa chủng *Yarrowia lipolytica* và thành phần thứ hai chứa thành phần thủy phân triaxylglyxerol. Trong trường hợp này, hai thành phần này được sử dụng đồng thời hoặc trong các khoảng thời gian đã định trước. Tốt hơn là, hai thành phần này được sử dụng đồng thời. Thuật ngữ “đồng thời” như được sử dụng ở đây không yêu cầu đồng thời một cách nghiêm ngặt. Theo đó, khái niệm “đồng thời” ở đây bao gồm trường hợp khi hai thành phần này được sử dụng trong điều kiện không có sự khác biệt về thời gian, như trong phương án kết hợp sử dụng hai thành phần này, và sau đó được bổ sung/sử dụng hoặc tương tự, và cũng bao gồm trường hợp khi hai thành phần này được sử dụng trong trường hợp không có sự khác biệt đáng kể về thời gian, như trong trường hợp khi một thành phần được bổ sung/sử dụng, và sau đó thành phần còn lại được bổ sung/sử dụng ngay sau đó.

Tốt hơn là để tạo tác nhân phân hủy dầu và chất béo chứa chủng *Yarrowia lipolytica*, và sử dụng thành phần thủy phân triaxylglyxerol kết hợp, là sử dụng tác nhân phân hủy dầu và chất béo. Thời gian sử dụng của tác nhân phân hủy dầu và chất béo chứa chủng *Yarrowia lipolytica* và sử dụng thành phần thủy phân triaxylglyxerol trong trường hợp này giống với trường hợp được đề cập ở dạng là một bộ kit nêu trên. Cụ thể là, tốt hơn là hai thành phần này được sử dụng đồng thời, nhưng hai thành phần này có thể được sử dụng ở các khoảng thời gian khác biệt đã được định trước. Ngoài ra, ngược lại với phương án nêu trên, cũng tốt hơn là để tạo tác nhân phân hủy dầu và chất béo chứa thành phần thủy phân triaxylglyxerol, và sử dụng chủng *Yarrowia lipolytica* kết hợp, khi tác nhân phân hủy dầu và chất béo được sử dụng. Trong trường hợp này, thời gian sử dụng phù hợp với trường hợp của phương án nêu trên.

Tốt hơn là kết hợp vi sinh vật đồng hóa glyxerol là thành phần thứ ba trong tác nhân phân hủy dầu và chất béo theo sáng chế. Theo phương án này, thì sự tích lũy glyxerol, là sản

phẩm thủy phân của triaxylglyxerol, có thể được ngăn chặn, và theo đó tác nhân phân hủy dầu và chất béo có thể đạt được hiệu quả phân hủy dầu và chất béo. Vi sinh vật đồng hóa glyxerol đã được giải thích trong khía cạnh thứ nhất theo sáng chế. Trong khi đó, tốt hơn là sử dụng chủng *Candida cylindracea*, và tốt hơn nữa là sử dụng chủng *Candida cylindracea* SL1B2 có số đăng ký là NITE P-714 làm vi sinh vật đồng hóa glyxerol.

Thành phần làm tăng cường hoạt tính của vi sinh vật được sử dụng (chẳng hạn như nguồn cacbon, nguồn nitơ), tác nhân hút ẩm, thành phần lưu giữ vi sinh vật trong một khoảng thời gian dài, tác nhân khử trùng, tác nhân gia cố, tác nhân chống oxy hóa và các tác nhân tương tự có thể được kết hợp.

Tác nhân phân hủy dầu và chất béo theo sáng chế được đề cập ở dạng lỏng, dạng rắn, hoặc dạng khô. Các ví dụ về dạng lỏng có thể bao gồm dịch môi trường nuôi cấy vi sinh vật (dịch này có thể được cô đặc hoặc pha loãng nếu cần thiết), dạng lỏng thu được bằng cách thu vi sinh vật từ dịch môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm hoặc bằng cách tương tự, rồi phân tán vi sinh vật trong nước, đệm hoặc môi trường nuôi cấy hoặc tương tự. Đối với dạng rắn, dạng rắn được khử nước bằng cách ly tâm, nén ép hoặc dùng các cách tương tự, chất rắn ở trạng thái bột nhão, hoặc chất rắn ở trạng thái sền sệt, giống như trạng thái trung gian giữa rắn và lỏng, dạng khô được tạo thành bằng cách làm khô và các cách điển hình tương tự. Dạng khô có thể thu được bằng cách, chẳng hạn, đông khô các tế bào phát triển dưới điều kiện áp suất giảm, và các ví dụ về hình dạng đặc trưng này có thể bao gồm dạng bột, viên nén và viên nang.

Vi sinh vật tạo thành tác nhân phân hủy dầu và chất béo theo sáng chế có thể được cố định. Cụ thể là, vi sinh vật cố định trên giá thể có thể được sử dụng. Các ví dụ về vật liệu nền được sử dụng cho việc cố định có thể bao gồm sợi cacbon (dựa vào nhựa PAN, dựa vào nhựa thông, dựa vào nhựa phenol và tương tự), nhựa polyetylen, nhựa polypropylen, nhựa polyuretan, nhựa polystyren, nhựa polyvinyl clorit, nhựa polyvinyl axetat, nhựa polyvinyl alcohol, nhựa polyetylen glycol, nhựa acrylic, gelatin, natri alginat, carrageenan và dextrin, và tổ hợp của chúng. Để làm tăng tốc độ cố định vi sinh vật hoặc làm tăng hiệu quả hoạt động của vi sinh vật, tốt hơn là sử dụng giá thể xốp, hoặc giá thể có sợi. Hình dạng của giá thể giới hạn cụ thể. Các ví dụ về hình dạng giá thể là dạng hình lập phương, dạng hình hộp, dạng cột, dạng hình cầu, dạng hình đĩa, và dạng tấm. Đối với công nghệ cố định vi sinh vật, các cuốn “Treatment of Waste Water by Microorganism Immobilization Process” (được viết và biên tập bởi Ryuichi Sudo, The Industrial Water Institute), “Water Treatment by Microorganism Immobilization Process - Support Immobilization Process, Entrapping

Immobilization Process, Biological Active Carbon Process (Bộ sách New Water Treatment (1)) (được viết bởi Kazuhiro Mochizuki, Katsutoshi Hori và Hideki Tachimoto, NTS Inc.)” và các tài liệu tham khảo tương tự được sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Sàng lọc vi khuẩn phân hủy và đồng hóa axit béo

Để chọn các vi sinh vật đặc trưng cho sự phân hủy axit béo, tổng số 29 loại mẫu môi trường như mẫu dầu mỡ trong bể thu dầu mỡ, mẫu đất, bùn và nước hồ được thu lại, và mỗi mẫu được cho vào trong môi trường nuôi cấy thạch có chứa axit oleic đóng vai trò làm nguồn cacbon duy nhất, rồi thu lấy dòng đơn được tạo thành và cấy chuyển vào môi trường nuôi cấy tương tự; các hoạt động này được thực hiện nhiều lần, bằng cách đó thu được toàn bộ 12 chủng vi sinh vật phân hủy và đồng hóa axit béo. Mỗi chủng trong số 12 chủng vi sinh vật này được cho vào môi trường nuôi cấy lỏng có muối vô cơ chứa axit oleic đóng vai trò là nguồn cacbon chính, nuôi cấy lắc ở 28°C trong 24 giờ, sau đó so sánh sự phát triển của vi sinh vật và khả năng phân hủy axit oleic. Ngoài ra, khả năng tiết lipaza được xác định bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy thạch có muối vô cơ chứa triaxylglycerol để đánh giá hiệu quả của vi sinh vật tiết lipaza, môi trường nuôi cấy này đóng vai trò là nguồn cacbon chính. Vi sinh vật tiết lipaza tạo nên một vùng rõ ràng (vòng sáng) của dòng được tạo thành ở ngoại vi vùng rìa trên môi trường nuôi cấy thạch nói trên. Theo đó, vi sinh vật không tạo thành vòng sáng thì không có khả năng tiết lipaza. Các chủng là ứng cử viên cho việc phân hủy axit béo được biểu thị trong Bảng 1. Độ vẩn đục của dịch môi trường nuôi cấy đo được là khả năng phát triển, còn mật độ lượng phân tán các giọt dầu trên bề mặt dịch môi trường nuôi cấy đo được là khả năng phân hủy axit oleic, bằng cách đánh giá năm cấp nhờ qua sát trực quan, và vi sinh vật tiết lipaza là chủng *Burkholderia arboris* được sử dụng để so sánh. Ngoài ra, để nhận dạng các chủng ứng cử viên này, tiến hành đo độ tương đồng từ trình tự bazơ của ARN ribosom 16S hoặc 26S và định rõ tính chất. Kết quả là, nhiều chủng thuộc chi *Yarrowia* hoặc chi *Burkholderia* được chọn làm chủng ứng cử viên. Hạn chế hơn, thì chủng *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) thích hợp hơn làm chủng ứng cử viên. Chủng này không có khả năng tiết lipaza và không có khả năng phân hủy triaxylglycerol, nhưng có khả năng phân hủy axit oleic tốt và có khả năng phát triển cao.

Bảng 1

Số	Khả năng phát triển	Khả năng phân hủy	Sự hình thành vòng sáng	Loài vi khuẩn tương đồng
Đối chứng	3	3	+	<i>Burkholderia arboris</i>
1A1	4	4	–	<i>Yarrowia lipolytica</i>
8A1	5	5	–	<i>Yarrowia lipolytica</i>
8D1	4	4	–	<i>Yarrowia lipolytica</i>
19B1	3	2	+	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
19C1	3	2	+	<i>Burkholderia cepacia</i>
21A1	3	2	–	<i>Burkholderia nodosa</i>
22A1	3	2	–	<i>Burkholderia nodosa</i>
24B1	2	3	+	<i>Burkholderia ambifaria</i>
24B2	3	3	–	<i>Yarrowia lipolytica</i>
25A1	3	2	+	<i>Burkholderia cepacia</i>
25B1	3	2	+	<i>Burkholderia cepacia</i>
25C1	3	3	+	<i>Burkholderia cepacia</i>

2. Phân loại chủng 1A1

Khi quan sát hình thái, người ta phát hiện ra rằng chủng 1A1 là nấm men, và chủng 1A1 được xác định là *Y. lipolytica* nhờ phân tích phát sinh loài dựa trên trình tự 26S rADN và biểu thị tương đồng 100% với chủng tiêu chuẩn *Y. lipolytica* NRRL YB-423 (Fig.1).

3. So sánh chi tiết khả năng phân hủy axit oleic

Tiến hành tiên nuôi cấy từng chủng trong số 12 chủng được sàng lọc trước trong 24 giờ trong môi trường nuôi cấy có chứa muối vô cơ, bổ sung 10g/L axit oleic, sau đó thu lấy vi khuẩn rồi rửa sạch, mật độ quang học OD600 của huyền phù tế bào được điều chỉnh là 0,01, cấy vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy lỏng có chứa muối vô cơ rồi bổ sung 2g/L axit oleic. Kiểm soát quá trình nuôi cấy ở 28°C trong 48 giờ bằng cách sử dụng một bình chia độ 100mL, sau đó đo nồng độ của axit béo còn lại trong môi trường nuôi cấy bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC). Với mục đích so sánh, chủng *B. arboris* SL1B1, là chủng có

khả năng phân hủy triaxylglyxerol cao, được cho thử nghiệm. Kết quả là, người ta phát hiện ra rằng chủng *Y. lipolytica* 1A1 có khả năng phân hủy axit oleic rất cao so với các chủng khác có chứa chủng *B. arboris* SL1B1 (Fig.2).

4. Khả năng đồng hóa axit béo tự do và triaxylglyxerol

Đã xác minh được khả năng phát triển của *Y. lipolytica* 1A1 nhờ sự đồng hóa triaxylglyxerol và axit oleic. Sự phát triển này quan sát được trên môi trường nuôi cấy thạch khi bổ sung tuần tự 10g/L (1%) dầu chiết xuất từ cây cải dầu và 10g/L (1%) axit oleic làm nguồn cacbon (Fig.3). Chủng *B. arboris* SL1B1 được sử dụng làm vi sinh vật so sánh. *B. arboris* có thể phát triển trên cả hai môi trường nuôi cấy này. Tuy nhiên, chủng *Y. lipolytica* 1A1 chỉ có thể phát triển trên môi trường nuôi cấy axit oleic, mà không thể phát triển trên môi trường có chứa dầu chiết xuất từ cây cải dầu. Theo đó chủng *Y. lipolytica* 1A1 có khả năng đồng hóa axit oleic, là sản phẩm thủy phân của triaxylglyxerol, nhưng không thể tiết lipaza, vì vậy không thể thủy phân triaxylglyxerol, và do đó không thể phát triển trên môi trường có chứa triaxylglyxerol.

5. Thử nghiệm phân hủy dầu và chất béo 1

Cho 10g/L dầu chiết xuất từ cây cải dầu vào 3L môi trường nuôi cấy có chứa muối vô cơ, rồi nuôi cấy tinh khiết chủng *B. arboris* SL1B1 hoặc nuôi cấy hỗn hợp chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 ở điều kiện pH 6,0 và nhiệt độ 28°C trong một thiết bị lên men, rồi phân tích hoạt động phân hủy dầu. Việc lấy mẫu được thực hiện sau mỗi 6 giờ, rồi kiểm tra nồng độ axit béo và nồng độ vi sinh vật. Nồng độ vi sinh vật được xác định bằng cách đếm khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy LB (Luria-Bertani), và phân tích lượng axit béo bằng phương pháp sắc ký khí, phân tích chất lượng axit béo bằng phương pháp sắc ký khí lớp mỏng. Kết quả là, 10g/L triaxylglyxerol đã phân hủy và biến mất hoàn toàn trong 30 giờ cả trong trường hợp nuôi cấy tinh khiết và nuôi cấy hỗn hợp (Fig.4). Trong nuôi cấy tinh khiết, nồng độ tế bào của *B. arboris* là 10^{10} tế bào/mL. Trong nuôi cấy hỗn hợp, cả chủng *B. arboris* và chủng *Y. lipolytica* 1A1 đều có nồng độ tế bào là 10^7 - 10^8 tế bào/mL. Thử nghiệm này cho thấy cả hai loại vi sinh vật này đều có thể nuôi cấy kết hợp. Tuy nhiên, ở nồng độ dầu và nhiệt độ này, thì khả năng phân hủy dầu và chất béo của *B. arboris* có tác dụng đầy đủ, và có thể không quan sát được ảnh hưởng khi trộn lẫn với chủng *Y. lipolytica* 1A1.

6. Thử nghiệm phân hủy dầu và chất béo 2

Cho 10g/L dầu chiết xuất từ cây cải dầu vào 3L môi trường nuôi cấy có chứa muối

vô cơ, rồi nuôi cấy tinh khiết chủng *B. arboris* SL1B1 hoặc nuôi cấy hỗn hợp với chủng *Y. lipolytica* 1A1 ở điều kiện pH 6,0 và nhiệt độ 22°C nhờ sử dụng một thiết bị lên men, sau đó phân tích hoạt động phân hủy dầu. Việc lấy mẫu được thực hiện sau mỗi 6 giờ, rồi kiểm tra nồng độ axit béo và nồng độ vi sinh vật. Sử dụng phương pháp phân tích tương tự như trong Thử nghiệm 5. Kết quả là, mất 42 giờ hoặc nhiều hơn để hoàn thành việc phân hủy và biến mất hoàn toàn triaxylglycerol trong nuôi cấy tinh khiết *B. arboris*, trong khi tốc độ thủy phân triaxylglycerol và tốc độ tiêu thụ axit béo tiến triển nhanh hơn trong nuôi cấy hỗn hợp, và triaxylglycerol và axit béo từ 10g/L dầu chiết xuất từ cây cải dầu, hầu hết là bị phân hủy và biến mất trong 30 giờ (Fig.5). Ngoài ra, mật độ vi khuẩn *B. arboris* là 10^8 tế bào/mL trong nuôi cấy tinh khiết, và *B. arboris* và *Y. lipolytica* 1A1 có nồng độ tế bào tương ứng là 10^9 tế bào/mL và 10^6 tế bào/mL, trong nuôi cấy hỗn hợp. Ở nhiệt độ thấp là 22°C, thì tốc độ đồng hóa axit béo của *B. arboris* chậm, và axit béo tự do vẫn tồn tại thậm chí là sau 42 giờ. Bằng cách bổ sung chủng *Y. lipolytica* 1A1, chủng này là một loại vi khuẩn đồng hóa axit oleic, đã thu được hiệu quả thúc đẩy sự phân hủy và đồng hóa axit béo tự do, và không phát hiện còn axit béo sau 36 giờ thậm chí là bằng phương pháp TLC.

7. Thử nghiệm phân hủy dầu và chất béo 3

Cho 30g/L dầu chiết xuất từ cây cải dầu vào 3L môi trường nuôi cấy có chứa muối vô cơ, rồi nuôi cấy tinh khiết chủng *B. arboris* SL1B1 hoặc nuôi cấy hỗn hợp cùng chủng *Y. lipolytica* 1A1 ở điều kiện pH 6,0 và nhiệt độ 22°C nhờ sử dụng một thiết bị lên men, rồi phân tích hoạt động phân hủy dầu. Việc lấy mẫu được thực hiện sau mỗi 12 giờ, rồi kiểm tra nồng độ axit béo và nồng độ vi sinh vật. Sử dụng phương pháp phân tích tương tự như trong Thử nghiệm 5. Kết quả là, mất 144 giờ để hoàn thành việc phân hủy axit béo trong nuôi cấy tinh khiết chủng *B. arboris* SL1B1, trong khi tốc độ phân hủy triaxylglycerol và axit béo tăng lên đột ngột trong quá trình nuôi cấy hỗn hợp với chủng *Y. lipolytica* 1A1, và axit béo biến mất hoàn toàn sau 48 giờ (Fig.6). Ngoài ra, *B. arboris* đạt mật độ tế bào là 10^8 tế bào/mL trong nuôi cấy tinh khiết, trong khi cả chủng *B. arboris* và chủng *Y. lipolytica* 1A1 đều tăng trưởng xa hơn là 10^8 tế bào/mL trong nuôi cấy hỗn hợp. Trong điều kiện nhiệt độ thấp và có sự có mặt của một lượng lớn dầu và chất béo, thì sự tích lũy một lượng axit béo tự do là cao, và sự phân hủy và đồng hóa các axit béo tự do được thúc đẩy đáng kể nhờ cùng tồn tại của chủng *Y. lipolytica* 1A1.

8. Ví dụ sử dụng nước thải thực tế

Hỗn hợp vi sinh vật bao gồm chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1

được nhiễm vào nước thải có chứa dầu (khoảng 300mg/L giá trị hexan trung bình) từ một nhà máy chế biến thực phẩm nào đó, kiểm tra sự phân hủy dầu và chất béo bằng cách nuôi cấy sục khí và lắng, kiểm soát nhiệt độ ở 30°C và pH 7. Đo giá trị hexan trung bình sau 12 giờ và 18 giờ. Số tế bào phát triển được đã nhiễm (CFU) được biểu thị là trục nằm ngang trong đồ thị, và giá trị hexan trung bình giảm sau 12 giờ và 18 giờ được biểu thị là trục thẳng đứng (Fig.7). Giá trị hexan trung bình giảm cao hơn số lượng lớn tế bào phát triển được đã nhiễm, và trong trường hợp mà số tế bào phát triển được đã nhiễm là 10^6 tế bào/mL hoặc nhiều hơn, thì chất được chiết xuất bởi hexan thông thường trong nước hầu hết biến mất sau 18 giờ (khoảng 300 mg/L giá trị giảm của hexan trung bình). Ngoài ra, sự thay đổi về số tế bào phát triển được sau 12 giờ và sau 18 giờ của tế bào phát triển được đã nhiễm được biểu thị trong Fig.8. Người ta đã xác định được rằng số tế bào phát triển được tăng lên theo thời gian. Bằng cách này, cũng chứng minh được rằng hỗn hợp vi sinh vật gồm chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 cũng có hiệu quả đối với sự phân hủy dầu và chất béo trong nước thải thực tế.

9. Kiểm tra xác minh trong thiết bị thu dầu mỡ

Thực hiện thử nghiệm nhiễm hỗn hợp vi sinh vật gồm hai loại: chủng *B. arboris* SL1B1 và chủng *Candida cylindracea* SL1B2 hoặc hỗn hợp vi sinh vật gồm 3 loại: chủng *B. arboris* SL1B1, chủng *C. cylindracea* SL1B2 và chủng *Y. lipolytica* 1A1 vào thiết bị thu dầu mỡ trong một nhà hàng nào đó. Từ khi thiết lập thiết bị thu dầu mỡ tương tự với các thiết bị thu dầu mỡ đã biết thông thường, thì các giải thích chi tiết được bỏ qua, và phác thảo được quy định như sau. Thiết bị thu dầu mỡ được thiết lập bởi 3 bể, được phân chia bởi những tấm ván, và các bể tương ứng được kết nối ở phần dưới cùng. Nước thải chảy vào bể thứ nhất, tiếp tục chảy vào bể thứ hai và bể thứ ba thông qua phần mở ở phía dưới cùng của các bể này, cuối cùng chảy ra khỏi bể thứ ba. Sức chứa của các bể này là 200 L, và thời gian lưu trữ trung bình là 12 phút. Để thúc đẩy việc lưu trữ vi sinh vật, tiến hành đặt than vào phía đáy thiết bị thu dầu mỡ để cố định vi sinh vật vào đó. Hỗn hợp vi sinh vật được cung cấp ngay khi dừng hoạt động chảy vào và chảy ra của nước thải từ nhà bếp của nhà hàng vào ban đêm, và việc thu thập nước để đo giá trị hexan trung bình được thực hiện trong quá trình hoạt động vào ban ngày. Nhiễm 400mL hỗn hợp vi sinh vật vào bể thứ nhất mỗi đêm. Kết quả là, hiệu quả phân hủy dầu và chất béo đã được xác nhận khi bổ sung hỗn hợp 2 loại vi sinh vật, nhưng hiệu quả phân hủy dầu và chất béo tăng lên theo cấp số nhân khi bổ sung hỗn hợp 3 loại vi sinh vật chứa chủng *Y. lipolytica* 1A1, và sau 3 tuần kể từ khi tiến hành bổ sung hỗn hợp vi sinh vật, thì giá trị hexan trung bình thấp hơn 30 mg/L, là giá trị hexan trung

bình tiêu chuẩn, và sau đó duy trì giá trị thấp này (Fig.9).

Tóm tắt

(1) Đã thành công thu được chủng *Y. lipolytica* 1A1 có khả năng đồng hóa axit béo tự do cao. Không giống như chủng *Yarrowia lipolytica* đã biết, chủng 1A1 này không tiết lipaza. Chủng *Y. lipolytica* 8A1, chủng 8D1 và chủng 24B2 cũng có đặc tính tương tự.

(2) Chủng *Y. lipolytica* 1A1 có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *B. arboris* SL1B1.

(3) Sử dụng kết hợp chủng *Y. lipolytica* 1A1 và chủng *B. arboris* SL1B1 tạo ra khả năng phân hủy triaxylglyxerol vô cùng mạnh, và cũng thích hợp cho việc xử lý nước thải thực tế. Ảnh hưởng của việc sử dụng kết hợp này là đặc biệt đáng kể trong điều kiện nhiệt độ thấp hoặc có sự có mặt của một lượng lớn dầu và chất béo.

(4) Khi chủng *C. cylindracea* SL1B2 được sử dụng kết hợp thêm vào với chủng *Y. lipolytica* 1A1 và chủng *B. arboris* SL1B1, thì hiệu quả phân hủy còn tăng nữa, và sự kết hợp này cũng thích hợp cho việc làm sạch thiết bị thu dầu mỡ.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo của sáng chế, thì sự giảm tốc độ thủy phân do sự tích lũy của sản phẩm dầu và chất béo đã phân hủy có thể được ngăn chặn bởi hoạt động của *Yarrowia lipolytica* là một chủng đồng hóa axit béo tự do, và theo đó thu được hiệu quả phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo. Sáng chế có thể được ứng dụng để xử lý nước thải chứa dầu và chất béo, và làm sạch thiết bị thu dầu mỡ. Ngoài ra, theo sáng chế, cũng có thể phân hủy và loại bỏ axit béo tự do có trong sản phẩm thủy phân dầu và chất béo, và sáng chế cũng có thể được ứng dụng để xử lý dầu và chất béo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo bao gồm cho chủng *Yarrowia lipolytica* là chủng vi sinh vật đồng hóa axit béo tự do tiếp xúc với axit béo, là sản phẩm thủy phân của triaxylglyxerol, hoặc với axit béo và glyxerol được thủy phân từ triaxylglyxerol, trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* không tiết lipaza và là chủng có số đăng ký là NITE BP-1167.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* là chủng có số đăng ký là NITE BP-1167 có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris*.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó có sự có mặt của lipaza trong quá trình thủy phân của triaxylglyxerol thành axit béo và glyxerol.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó có sự có mặt của vi sinh vật có khả năng tiết lipaza trong quá trình thủy phân của triaxylglyxerol thành axit béo và glyxerol.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó vi sinh vật này là chủng *Burkholderia arboris*, tốt hơn là trong đó chủng *Burkholderia arboris* là chủng có số đăng ký là NITE P-724.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó còn có vi sinh vật đồng hóa glyxerol được sử dụng kết hợp.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó vi sinh vật đồng hóa glyxerol này là chủng *Candida cylindracea*, tốt hơn là trong đó chủng *Candida cylindracea* là chủng có số đăng ký là NITE P-714.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó dầu và chất béo là dầu và chất béo trong nước thải hoặc thiết bị thu dầu mỡ.

9. Phương pháp xử lý nước thải, bao gồm bước phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo trong nước thải bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

10. Phương pháp làm sạch thiết bị thu dầu mỡ, bao gồm bước phân hủy và loại bỏ dầu và chất béo trong thiết bị thu dầu mỡ bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

11. Chủng *Yarrowia lipolytica* có các đặc tính sau:

- (1) chủng *Yarrowia lipolytica* đồng hóa axit béo tự do;
- (2) chủng *Yarrowia lipolytica* không tiết lipaza; và

(3) chủng *Yarrowia lipolytica* có thể phát triển cộng sinh cùng với chủng *Burkholderia arboris*, trong đó chủng *Yarrowia lipolytica* là chủng có số đăng ký là NITE BP-1167.

12. Tác nhân phân hủy dầu và chất béo có chứa chủng *Yarrowia lipolytica* theo điểm 11 làm tác nhân có hoạt tính.

13. Tác nhân theo điểm 12, trong đó tác nhân này còn bao gồm thành phần thủy phân triaxylglyxerol thành axit béo và kết hợp với glyxerol.

Fig.1

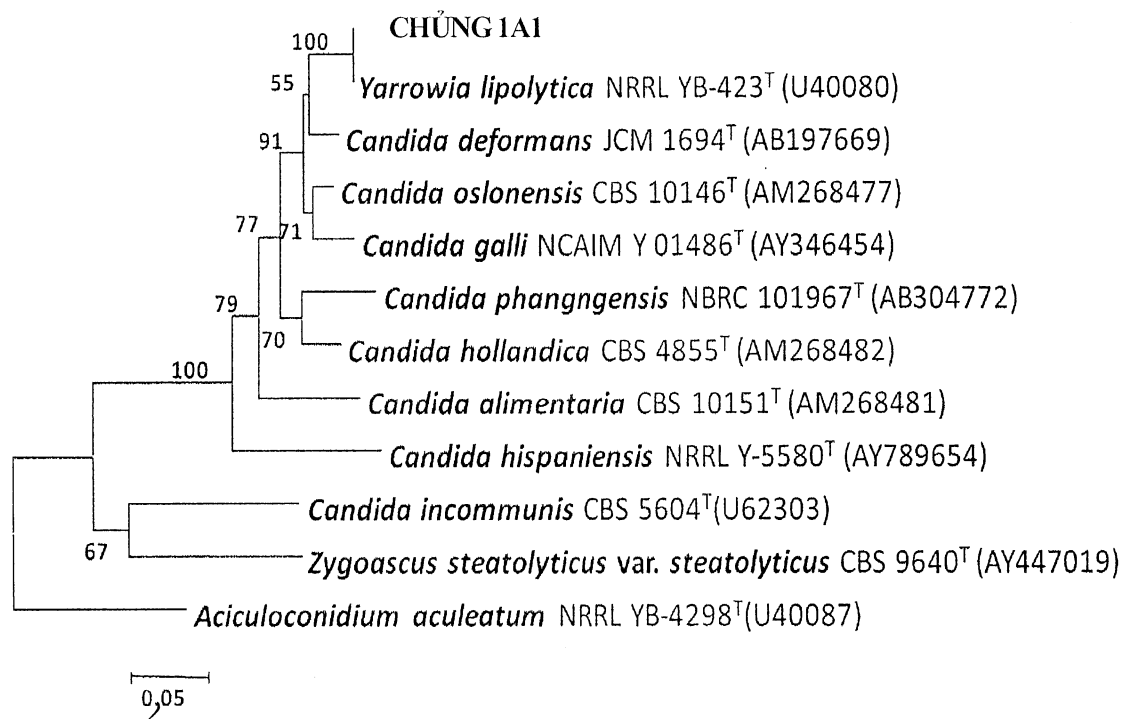


Fig.2

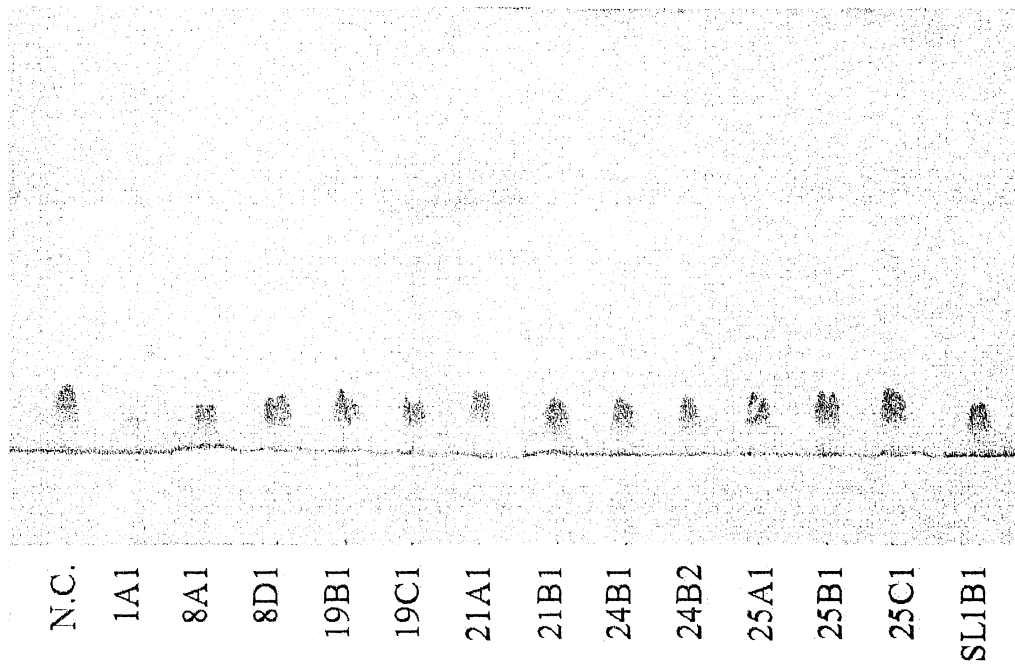
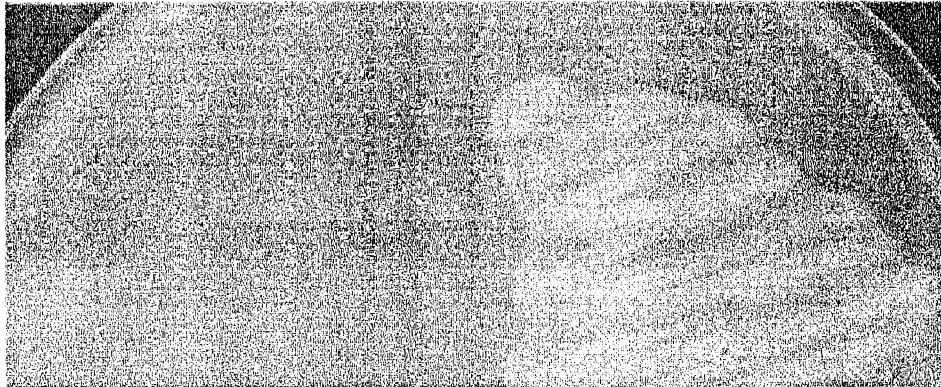


Fig.3

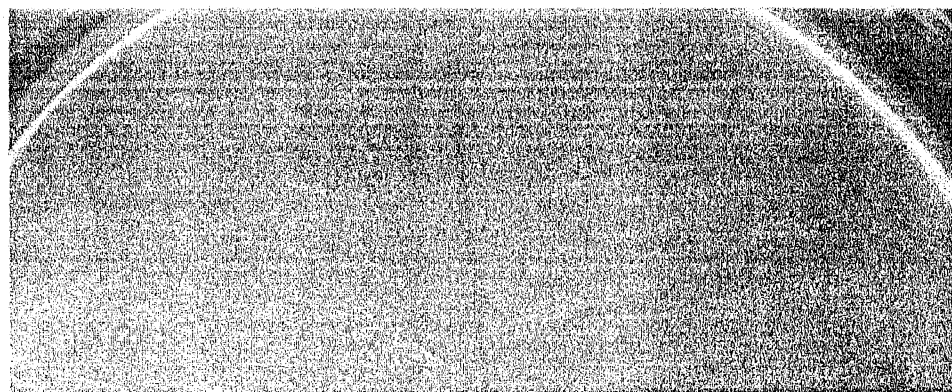
NGUỒN CACBON: 1% DẦU CANOLA



1A1

SL1B1

NGUỒN CACBON: 1% AXIT OLEIC



1A1

SL1B1

Fig.4

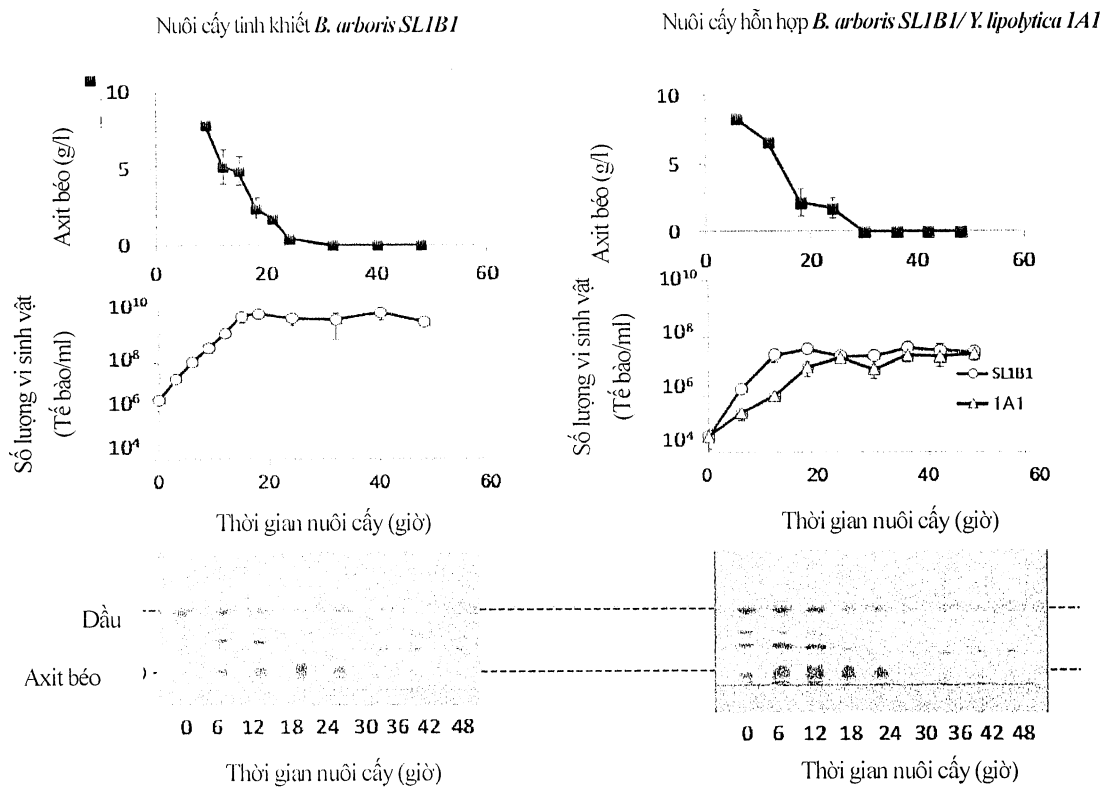


Fig.5

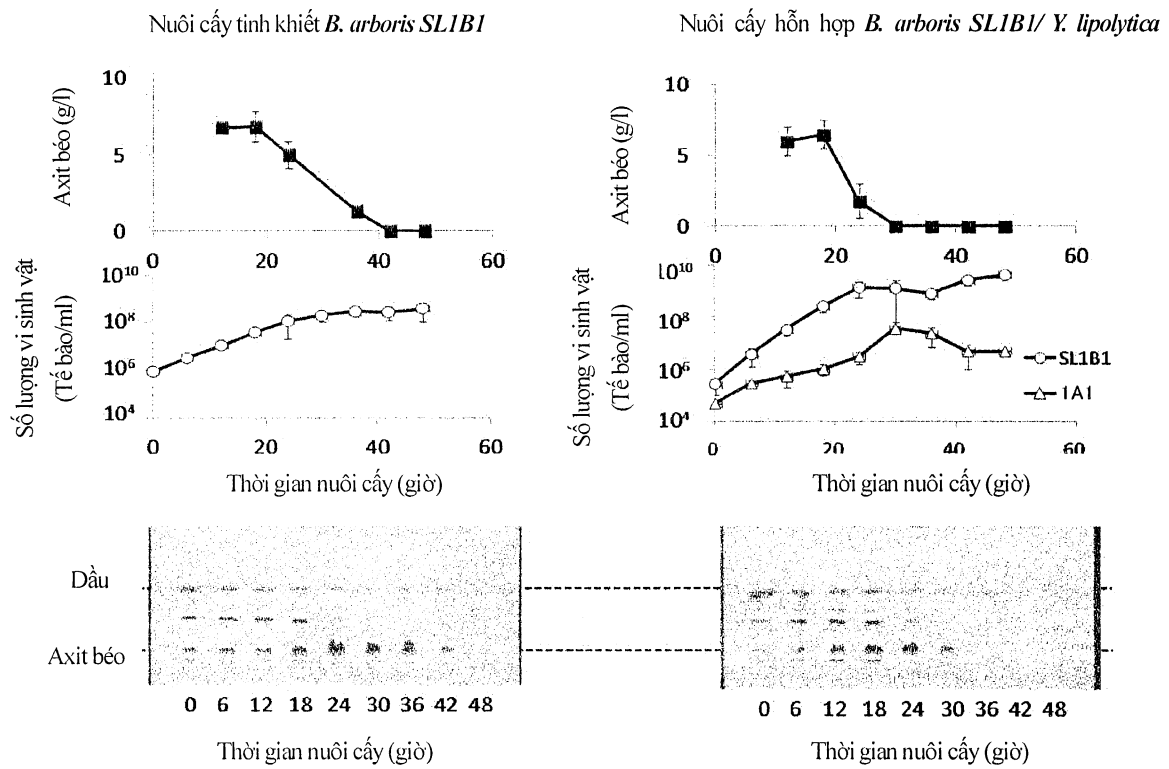


Fig.6

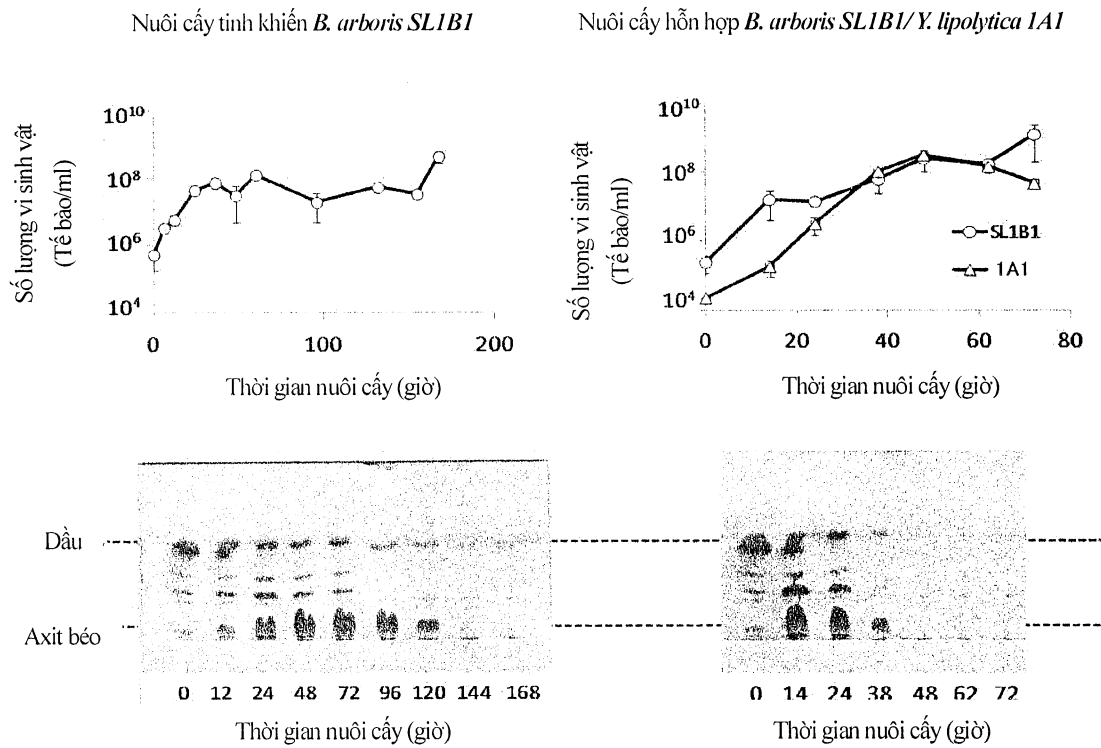


Fig.7

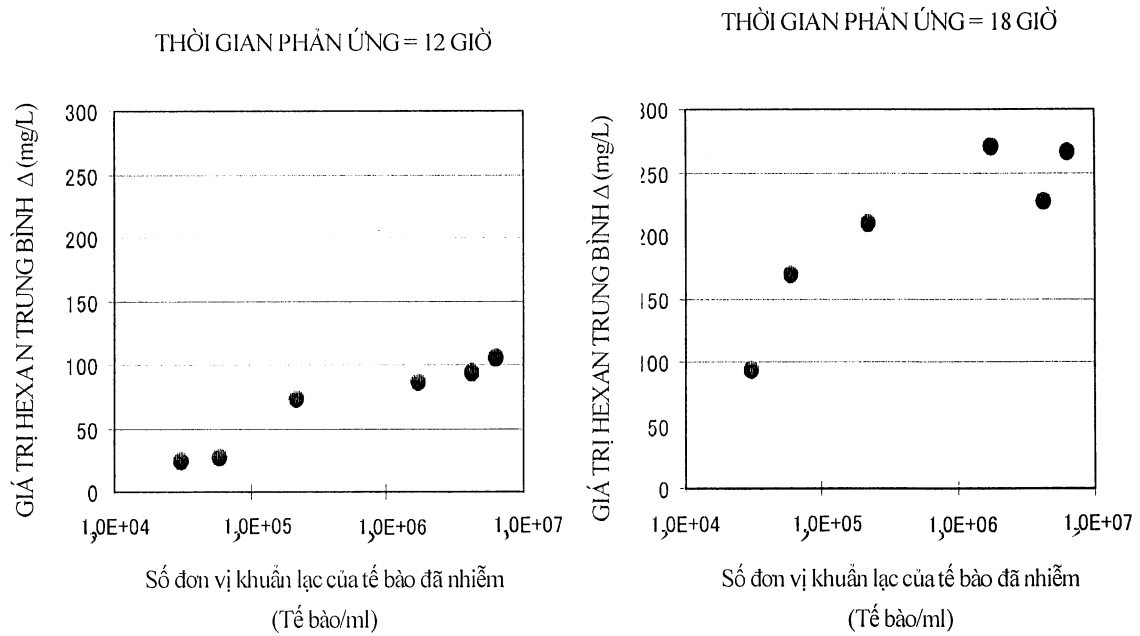


Fig.8

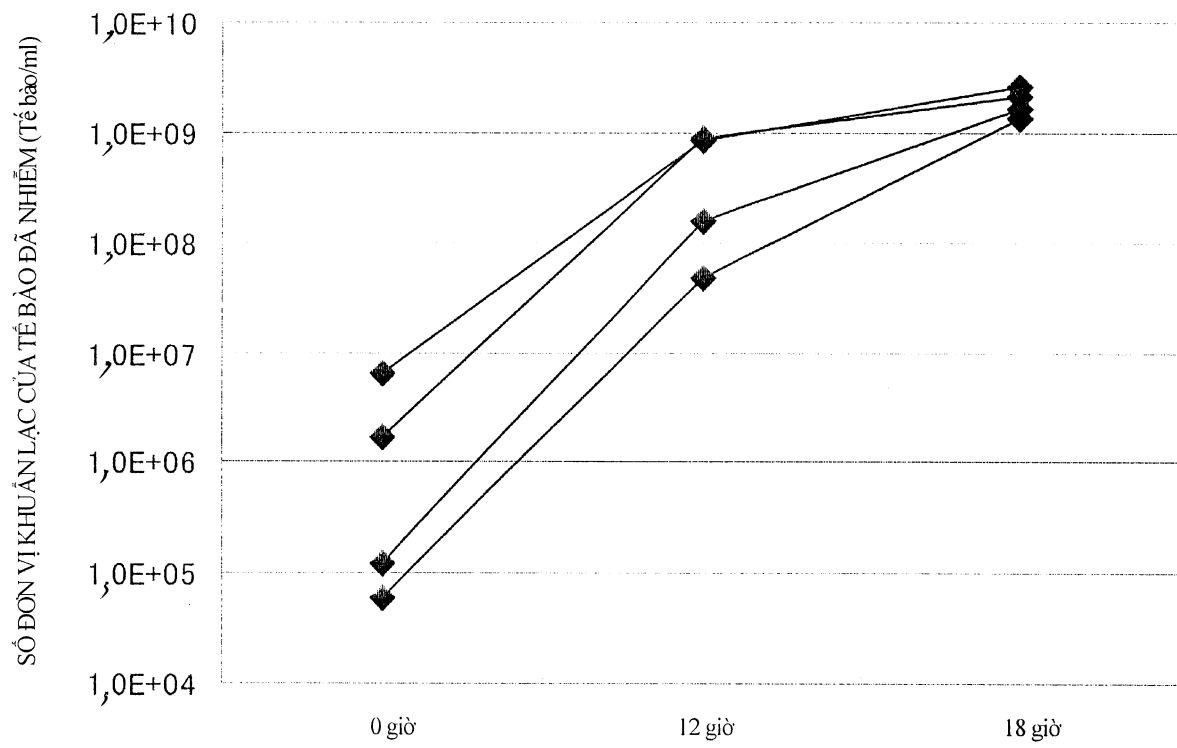


Fig.9

(VÍ DỤ SO SÁNH 1) KHÔNG CÓ HỖN HỢP VI SINH VẬT

Số ngày sau khi nhiễm	0	2	7	14	21	28
Giá trị hexan trung bình (mg/L)	4800	4500	6800	3400	3900	4700

(VÍ DỤ SO SÁNH 2) *B. arboris* SL1B1 + *Candida cylindracea* SL1B2

Số ngày sau khi nhiễm	0	2	7	14	21	28
Giá trị hexan trung bình (mg/L)	5200	1500	850	250	110	120

(VÍ DỤ) *B. arboris* SL1B1 + *Candida cylindracea* SL1B2 + *Y. lipolytica* 1A1

Số ngày sau khi nhiễm	0	2	7	14	21	28
Giá trị hexan trung bình (mg/L)	4900	970	280	54	22	27