



(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) 
1-0021302

(51)⁷ **C12N 1/14**

(13) **B**

(21) 1-2017-03048

(22) 09.08.2017

(45) 25.07.2019 376

(43) 25.09.2017 354

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)**

Nhà A10, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Đặng Thị Cẩm Hà (VN), Nguyễn Đăng Thắng (VN), Thái Hoàng (VN), Trần Thị Thu Hiền (VN), Nguyễn Thúy Chinh (VN), Trần Xuân Bách (VN)**

(54) **CHỨNG XẠ KHUẨN ƯA NHIỆT STREPTOMYCES SP. XKBD2.4 VÀ CHẾ PHẨM XỬ LÝ RÁC THẢI MÀNG POLYME CÓ NGUỒN GỐC TỪ DẦU MỎ VÀ CHẤT DÈO PHÂN HỦY SINH HỌC CHỨA CHỨNG XẠ KHUẨN ƯA NHIỆT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces sp. XKBD2.4* thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza ở nhiệt độ 37°C và sinh tổng hợp enzym lipaza ở nhiệt độ 55°C bằng phương pháp nuôi cấy dạng lỏng và rắn. Dịch nuôi cấy hay chế phẩm dạng rắn có khả năng phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và polyme phân huỷ sinh học với cấu trúc hóa học khác nhau có khả năng phân huỷ sinh học hay thân thiện môi trường. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập tới chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học dạng lỏng và rắn chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ quá trình ủ compost rác thải sinh hoạt thành phố có lẫn túi nilon có khả năng phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học như túi nilon, chất dẻo (plastic), nhựa PE, nhựa PE đã được xúc tiến oxy hóa (oxo-biodegradable plastic) và polyme có khả năng phân hủy sinh học. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học chứa dịch nuôi cấy lỏng và rắn thu được từ môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp.XKBD2.4 nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ, còn được gọi tắt là nhựa, chất dẻo (plastic) như túi nilon, nhựa PE, v.v., được sử dụng từ giữa thế kỷ trước và nhu cầu sử dụng không ngừng tăng nhất là giai đoạn hiện nay. Như đã biết, polyme có trọng lượng phân tử cao như polyetylen rất khó để vi sinh vật tấn công. Loại polyme này là sản phẩm tạo ra hàng hóa thương phẩm với số lượng lên tới 80 triệu tấn. Trong 3 thập kỷ vừa qua, các loại nhựa được sử dụng ngày càng tăng trong giao thông, thực phẩm, may mặc, xây dựng, sản xuất công nghiệp (máy bay, tàu chiến, máy tính, ô tô, v.v.), y tế, giải trí. Theo tính toán gần đây nhất (2014), thì lượng nhựa được tiêu thụ tới hơn 300 triệu tấn/năm. Lượng sử dụng bình quân đầu người năm 2015 ở các khu vực trên thế giới rất khác nhau, mức tiêu thụ trung bình trên đầu người gần 79 kg/năm. Tiêu thụ chất dẻo nhiều nhất là người Mỹ (155 kg/người) và ít hơn cả là người châu Á, tiêu thụ hơn 48 kg/người. Còn ở Việt Nam, mức tiêu thụ là hơn 40

kg/người. Polyetylen được tiêu thụ nhiều nhất, chiếm tới 38%, tương đương với 76 triệu tấn/năm. Ở Việt Nam hiện đang sử dụng các loại nhựa sau đây: Polyetylen (LDPE,HDPE), Polyetylen Terephthalat (PET), Polybutylen nilon, Polypropylen (PP), Polystyren (PS), Polyvinyl chlorid (PVC), và các loại khác.

Lượng rác thải nhựa được thải vào môi trường rất cao, tính đến 2012, ở Mỹ và châu Âu đã thải lần lượt 29 và 25,2 triệu tấn. Theo Liên Hiệp Quốc, thì loại rác thải này chủ yếu mới xử lý được từ 22 đến 43% bằng chôn lấp, còn 35% được đổ vào đại dương. Rác thải nhựa không ngừng tăng trên toàn thế giới. Nếu ước tính theo thể tích thì loại phế thải này nằm trong các hố chôn lấp chiếm 20–30% rác thải sinh hoạt trên phạm vi toàn cầu. Lượng chất thải rắn của Việt Nam phát sinh trung bình hàng năm tăng khoảng 200% và tiếp tục tăng lên khoảng 44 triệu tấn/năm. Năm 2015, Việt Nam là nước có lượng rác nhựa đổ ra biển đứng thứ 4 trên thế giới. Trung bình 0,73 triệu tấn/năm, chiếm 6% toàn thế giới. Trong sách xuất bản gần đây của Ellen MacArthur Foundation and McKinsey & Company *Kinh tế chất dẻo mới –Nghĩ lại, tương lai của chất dẻo* là công trình của 180 chuyên gia và phân tích 200 báo cáo liên quan đến chất dẻo, những thông tin từ tư liệu này cho thấy một cách nhìn nhận mới về sự lãng phí ghê gớm về kinh tế từ chất dẻo và rác thải từ chất dẻo. Năm 2013 công nghiệp đã đưa vào thị trường chất dẻo bao gói 78 triệu tấn với giá trị lên tới 260 tỷ USD và ước tính đến năm 2050 sẽ lên 318 triệu tấn. Tuy nhiên, sau 40 năm sử dụng trên toàn thế giới thì chỉ có 15% chất dẻo bao gói được quay vòng tái sử dụng. Đã có đến 95% tương đương với 80-120 tỷ USD chất dẻo bao gói bị mất sau thời gian ngắn sử dụng. Nếu tính cả thiệt hại do hiệu ứng nhà kính trong quá trình sản xuất và các hệ lụy xã hội, theo UNEP ước tính lên tới 40 tỷ USD.

Theo kết quả điều tra hàng năm ở các thành phố lớn của Việt Nam thải ra gần 200.000 tấn nhựa phế thải các loại, trong đó túi nilon và các loại bao bì bằng nhựa LDPE chiếm 75% (khoảng 150.000 tấn). Theo Hiệp hội Nhựa Việt Nam, tổng

doanh thu toàn ngành nhựa năm 2015 đạt 13.238 tỷ đồng, tăng 16%; lợi nhuận toàn ngành đạt 1.340 tỷ đồng, tăng 30% so với 2014. Theo các công ty sản xuất, thị trường bao bì nhựa có tốc độ tăng trưởng ấn tượng khoảng 15 – 20%, sức tiêu thụ của các loại bao bì nhựa tăng theo tính tiện dụng đã cho thấy mức tiêu thụ nhựa bình quân đầu người của Việt Nam năm 1994 là 3,5 kg/người/năm; năm 2003 là 15 kg/người/năm (Theo báo cáo của Trung tâm thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia và Cơ sở dữ liệu Tạp chí Công thương, năm 2011) và có xu hướng tăng cao trong 10 năm qua. Năm 2008, mức tiêu thụ nhựa bình quân đầu người đạt 22 kg/người/năm; năm 2010 là 33 kg/người/năm thì hiện nay con số này đạt trên 41 kg/người/năm, dự kiến đến năm 2020 con số này tăng lên 45 kg/người.

Ngoài những loại chất dẻo truyền thống thì chất dẻo sinh học và chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học do thay đổi tính chất hóa học của chất dẻo có nguồn gốc dầu mỏ được sử dụng do được cải biến tính an toàn. Tuy nhiên, do giá cả cao nên ở Việt Nam vẫn chưa được sử dụng rộng rãi và đôi lúc loại chất dẻo này còn bị quảng cáo bán hàng sai bản chất để tăng tính hấp dẫn với người tiêu dùng và trốn thuế môi trường. Trước khi đi sâu vào mô tả sáng chế, các khái niệm và các quy chuẩn đánh giá khả năng phân hủy sinh học thì các khái niệm sau đây cần phải quan tâm để hiểu rõ. Đó là chất dẻo phân hủy sinh học oxo (oxo-biodegradable plastic) được đánh giá thế nào và làm rõ các loại chất dẻo khô có chung nguồn gốc.

Loại chất dẻo tạo nên nền sinh khối (crop-based hydro-biodegradable plastic), cũng rất gần với chất dẻo trên nền sinh học (bio-based plastic) hay chất dẻo sinh học (bioplastic), hay chất dẻo có khả năng ủ phân hủy (compostable plastic), được đánh giá thông qua tiêu chuẩn EU số EN 13432 hay của Mỹ số ASTM D6400 về phân hủy sinh học trong điều kiện đặc biệt ở quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, một số loại chất dẻo được cải biến nhờ đưa các phụ gia xúc tiến oxy hóa (đa số là sử dụng hỗn hợp một số kim loại) không được công nhận xét theo quy chuẩn là “phân hủy sinh học”. Năm 2017,

chất dẻo phân hủy sinh học oxo (oxo-biodegradable plastic) được công bố là có khoảng 60% bị phân hủy sau 2 năm và 40% bị tích lại trong môi trường (tháng 3/2017 <http://www.symphonyenvironmental.com/more-misinformation/>). Còn ở Việt Nam, đã có loại túi gói hàng từ HDPE được cấp chứng chỉ là “thân thiện môi trường”, nhưng người sản xuất lại khuyến cáo ở nhãn hàng là “tự phân hủy sinh học”. Ngoài ra, sản phẩm này còn cung cấp thêm thông tin trên nhãn sản phẩm là “các phụ gia tạo nên sản phẩm này phân hủy sinh học”. Ở đây có sự không rõ ràng, làm cho người tiêu dùng Việt Nam bị nhầm lẫn.

Chất dẻo do con người tạo ra và thành phần bao gồm carbon, hydrogen, silicon, oxy, clorua và nito. Dầu thô, than đá và khí tự nhiên đã là nguồn nguyên liệu cơ bản cho chiết xuất tạo nên chất dẻo. Các loại chất dẻo rất bền vững theo thời gian. Chủ yếu, chất dẻo hiện đang sử dụng là polyetylen (LDPE, MDPE, HDPE and LLDPE), Poly Ethylen Terephthalat (PET), Polybutylen Terephthalat (PBT), nilon, Poly-Propylen (PP), Polystyren (PS), Polyvinyl Chlorid (PVC), và Polyurethan (PUR). Còn chất dẻo tạo ra từ sinh khối hay nguồn nguyên liệu tái tạo như poly(hydroxybutyrat) (PHB), poly(lactid) (PLA) và tinh bột hỗn hợp được vi sinh vật hay enzyme của chúng sinh ra dễ dàng phân hủy sinh học có tên gọi là chất dẻo sinh học (bioplastic). Chất dẻo cũng có thể được phân hủy sinh học bằng cách cải thiện mức độ thủy phân hay độ dài của chuỗi polyme có thể được giảm bằng sự oxy hóa nhờ sự sinh trưởng của vi sinh vật. Loại chất dẻo này có tên là chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học oxo (oxo-biodegradable) và được tạo ra trên cơ sở polyetyl (LDPE, MDPE, HDPE và LLDPE) kết hợp với các phụ gia xúc tiến oxy hóa và chúng thường là các ion kim loại chuyển tiếp được đưa vào ở dạng stearat hay phức chất với các phối tử hữu cơ khác. Các kim loại chuyển tiếp được sử dụng làm phụ gia xúc tiến oxy hóa gồm Ti, V, Cr, Mn, Fe, 2 Co, Ni, Cu, Zn, Ca, v.v., trong đó hiệu quả nhất phải kể đến phức stearat của Co, Mn và Fe. Dưới tác động của tia cực tím (UV), nhiệt độ hoặc các tác động cơ học, các phụ gia thúc đẩy phản

ứng oxy hóa mạch polym tạo thành các nhóm chức như cacbonyl, cacboxyl, hydroxit, v.v., tạo điều kiện cho vi sinh vật dễ dàng tiếp cận để phân hủy tiếp các mạch monome, dionome, oligome v.v.. Nhờ các chất xúc tiến oxy hóa, thời gian phân hủy chất dẻo từ hàng trăm năm giảm xuống còn vài năm thậm chí là vài tuần hay vài tháng đối với chất dẻo đã được cải biến này.

Như đã đề cập, chất dẻo cũng có cấu trúc gần giống lignin cho nên cách tác động của enzym laccaza cũng thường xảy ra tương tự. Các bước vi sinh vật phân hủy chất dẻo xảy ra như sau: vi sinh vật (ở dạng đơn lẻ hay tổ hợp, tuy nhiên trong tự nhiên là tổ hợp vi sinh vật) sinh trưởng và tạo nên các enzym ngoại bào; các enzym ngoại bào do vi sinh vật tiết ra bám lên bề mặt của chất dẻo; Chúng cắt chuỗi polyme và gây ra sự xói mòn bề mặt chất dẻo, phân hủy sinh học chất dẻo xảy ra với tốc độ khác nhau do rất nhiều yếu tố tác động, sản phẩm cuối cùng của quá trình phân hủy chất dẻo là CO_2 , H_2O và CH_4 .

Trong tự nhiên, quá trình này xảy ra rất chậm, nhưng nhiều công trình gần đây đã chứng minh rằng có thể khoáng hóa được chất dẻo. Có những nghiên cứu cơ bản chứng minh được một số chủng vi sinh vật đơn lẻ có thể tham gia phân hủy được chất dẻo, nhưng một chủng đơn lẻ không thể khoáng hóa được chất dẻo bởi cấu trúc bền vững tạo nên chất dẻo đều có nguồn gốc dầu mỏ. Trừ loại có khả năng phân hủy sinh học nhanh và hoàn toàn có xuất xứ từ sinh khối, thì loại polyme tạo ra từ quá trình xúc tiến oxy hóa nhờ một số kim loại Fe, Co, Ni, Cu, Ti, V, Cr, Mn, Zn, Ca, v.v., đang được sử dụng tại một số quốc gia đã được thương mại hóa. Nếu được tác động trước (tiền xử lý) bởi các tác nhân hóa học, lý học và như tia cực tím (UV), các phụ gia, nhiệt độ hoặc các tác động cơ học khác nhau thì quá trình oxy hóa mạch polyme được thúc đẩy để các phản ứng tạo thành các nhóm chức như cacbonyl, cacboxyl, hydroxit, v.v., được hình thành nhanh hơn và đây là điều kiện cho vi sinh vật dễ dàng tiếp cận để phân hủy tiếp. Quá trình phân hủy loại polyme này cũng gần giống như đối với lignoxenluloza (lignin, hemixenluloza, xenluloza),

chỉ khác là nguồn gốc và quá trình tạo ra các chất dẻo khác hoàn toàn với polyme tái tạo có nguồn gốc thiên nhiên. Tổ hợp chuỗi các phản ứng sinh hóa xảy ra cũng tương tự và tuân thủ theo các cơ chế mà ở đó các enzym ngoại bào, nội bào đều hoạt động.

Vậy sử dụng cùng một lúc tổ hợp của các chủng sinh các enzym như lipaza, esteraza, ligninaza, v.v., để phân hủy polyme có điểm nào khác với quy luật chung hay không? Và khác ở chỗ nào? Câu trả lời là không khác với quy luật mà chỉ khác ở chỗ chúng đóng vai trò là chất xúc tác mạnh hay tham gia vào chuỗi phản ứng để cắt ngắn cấu trúc của chuỗi polyme của chất dẻo. Cuối cùng, tất cả mọi quy trình sinh học cũng đi vào chu trình Creb để khoáng hóa thành các axit béo, sinh khối vi sinh vật, CO₂ và nước.

Cho đến nay chưa có giải pháp nào mang tính khả thi cao cho các nước phát triển và đang phát triển về xử lý loại ô nhiễm rác thải chất dẻo, đặc biệt là chất dẻo sản xuất từ nguyên liệu hóa thạch và nhiều nhất là dầu mỏ. Còn rác thải từ chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học (bioplast) đã không còn là vấn đề rất khó với quá trình phân hủy sinh học nhờ có giải pháp hữu hiệu xử lý bằng các công nghệ khác nhau, trong đó có xử lý bằng hệ enzym hay ủ phân hủy với nhiệt độ cao được kiểm soát. Hiện nay số lượng rác thải là nhựa có thể phân hủy sinh học chiếm một thị phần rất khiêm tốn vì chúng được sản xuất với kinh phí rất cao. Bốn thế kỷ qua các nghiên cứu phân hủy sinh học không ngừng tìm kiếm các con đường để xử lý rác thải là chất dẻo (sản phẩm nhựa, túi nilon, bao bì sử dụng trong công nghiệp, y tế, nông nghiệp và trong đời sống hàng ngày). Rác thải nhựa chủ yếu vẫn đang được chôn lấp. Hệ lụy của việc này không chỉ tổn thất kinh tế mà còn gây nên ô nhiễm môi trường nước ngầm, cũng như giảm chất lượng cuộc sống của cộng đồng sống quanh vùng chôn rác. Một trong các con đường để giảm tác động của rác thải nhựa là sử dụng tổ hợp vi sinh vật sống cùng với tạo điều kiện môi trường phù hợp để cho quá trình phân hủy sinh học nhựa có hiệu quả cao nhất có thể. Một con đường

nữa là sử dụng hệ enzym từ xạ khuẩn, xạ khuẩn sợi, xạ khuẩn và vi khuẩn sinh tổng hợp để xử lý. Cách này cần thêm các chuỗi kỹ thuật khác để sao cho enzym tạo ra bền, tiêu hao thấp nhất và hoạt động được trong các điều kiện môi trường sinh thái khác nhau. Hơn thế nữa, có thể kết hợp với nhiệt độ và các tác nhân vật lý, cơ học khác nhằm tạo điều kiện thuận lợi để vi sinh vật có thể sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất với chất dẻo để cuối cùng khoáng hóa được chất dẻo mà sản phẩm ở điều kiện hiếu khí là CO_2 , H_2O , còn ở điều kiện kỵ khí là CO_2 , H_2O và CH_4 . Các quá trình phân hủy, chuyển hóa dẫn đến khoáng hóa hoàn toàn rất phức tạp và rất dài, tuy nhiên ở mỗi điều kiện môi trường và mỗi quần xã vi sinh vật hay mỗi nhóm enzym không hoạt động giống nhau, nhưng chúng lại bổ trợ cho nhau, nên các nhà khoa học công nghệ cần chọn được con đường phân hủy hiệu quả nhất đối với từng loại chất dẻo. Các nghiên cứu đã sử dụng lên men trực tiếp các vi sinh vật sống với các loại chất dẻo, nhưng cũng có thể sử dụng hỗn hợp enzym do chúng sinh tổng hợp trên môi trường rắn hoặc lỏng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của chúng, kể cả chất dẻo khó phân hủy và chất dẻo đã được cải biến là chất dẻo phân hủy sinh học oxo (oxo-biodegradable) và chất dẻo sinh học. Tuy nhiên, để dễ đánh giá hiệu quả cho công bố quốc gia và quốc tế thì chọn 1 hay 2 enzym để khảo sát theo thời gian với các tiêu chí chuẩn để đánh giá khả năng phân hủy, chuyển hóa các loại chất dẻo có nguồn gốc và cách sản xuất khác nhau thường được lựa chọn đầu tiên. Cách này khó có thể làm cơ sở khoa học đủ mạnh để dẫn đến công nghệ khả thi, nếu xét cả về mặt kỹ nghệ, kinh tế và bảo vệ môi trường.

Loại bỏ rác thải nhựa bằng cách phân hủy sinh học tập trung vào các polyme được tiêu thụ chủ yếu như polyetylen, polypropylen, polyurethan and polystyren. Rất đáng tiếc, các polyme trên cũng là các loại rất bền vững. Một trong các phương pháp thành công nhất có thể làm chủ được là phân hủy nhờ enzym và cần phải tăng cường tốc độ phân hủy chúng. Vậy các cơ sở khoa học có liên quan nằm ở đâu? Và tại sao sử dụng enzym đã trở thành một trong các giải pháp chìa khóa. Nhóm enzym

nào cần nhất và quan trọng trong việc chuyển hóa phân hủy chất dẻo. Các nhóm enzym đó thuộc họ enzym tham gia và quá trình chuyển hóa lignoxenluloza và các enzym hoạt động giống như các chất xúc tác oxy hóa các hợp chất phenol và không phải phenol.

Địa điểm tốt nhất để lấy mẫu phân lập và lựa chọn các vi sinh vật sinh tổng hợp các enzym tham gia phân hủy chất dẻo là chỗ chôn lấp rác thải sinh hoạt, công nghiệp lẫn nhựa, túi nilon hay từ quá trình ủ phân hủy (compost) mà nguyên liệu là lignoxenluloza, v.v.. Khả năng chuyển hóa, phân hủy trong quá trình ủ cũng là một tiêu chí quan trọng của ASTM để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của chất dẻo. Trong hàng loạt enzym tiềm năng cao để phân hủy chất dẻo thì các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn ưa nhiệt mang lại hiệu quả phân hủy sinh học rác chất dẻo nhanh. Lý do là chúng sinh trưởng nhanh và tạo được cả hệ enzym hoạt động ở nhiệt độ cao và bản thân chúng cũng có thể sử dụng để ủ phân hủy chất dẻo. Hơn thế nữa, nhiệt độ cao trên 45 °C kéo dài cũng là tác nhân làm tăng tốc quá trình phân hủy rác chất dẻo. Nếu kết hợp được những ưu thế này thì nghiên cứu để tạo ra một công nghệ xanh cho xử lý rác chất dẻo sẽ có tính khả thi cao hơn. Trong bài toán khó với lượng rác nhựa tăng dần mỗi năm trên toàn hành tinh của chúng ta và ở từng nước khác nhau, Việt Nam cũng không phải là ngoại lệ, nay phải đối diện với tìm giải pháp, công nghệ cho xử lý loại rác bền vững này mà không gây ô nhiễm thứ cấp và cũng có thể tái sử dụng đang được hết sức quan tâm.

Cho đến nay đã có tới hơn 90 chi vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng phân hủy chất dẻo đã được công bố (Mahdiyah D, Mukti BH. 2013). Trong những năm gần đây, đã có nhiều bài tổng quan, nghiên cứu chi tiết đề cập một cách chi tiết đến danh sách hàng loạt vi sinh vật đã được chứng minh phân hủy được chất dẻo được tạo ra theo cách khác nhau và không chung nguồn gốc (Vinay Mohan Pathak and Navneet. 2017) và các chất chúng tạo ra trong quá trình sinh trưởng và tác động qua lại với cơ chất là chất dẻo (Himani Bhardwaj et al. 2013). Các công bố cũng chỉ ra

chúng có khả năng phân hủy sinh học loại chất dẻo nào, tốc độ và tính khả thi, v.v., và đặc biệt là đưa ra các bằng chứng rất cơ bản về sự thay đổi các đặc tính của chất dẻo dưới tác động của các tác nhân sinh học riêng lẻ và đồng thời với các tác nhân khác. Thông qua sự giảm khối lượng, sự thay đổi cấu trúc hóa học, cấu trúc mặt, độ bền kéo đứt, sản phẩm trao đổi chất của các phản ứng sinh hóa do vi sinh vật tác động lên chất dẻo sinh ra, v.v., đã cung cấp cơ sở để tìm con đường xử lý rác chất dẻo. Vấn đề này được cả thế giới quan tâm, tuy nhiên không phải là một bài toán có ngay đáp số. Trong bài tổng quan của mình các tác giả đã cho thấy các đại diện của xạ khuẩn đã được thông báo có khả năng phân hủy chất dẻo phân hủy sinh học và khó phân hủy sinh học. Ví dụ như xạ khuẩn và chủng *Amycolatopsis* sp. phân hủy làm giảm 100 mg màng film PLA (khoảng 60%) sau 14 ngày nuôi cấy ở môi trường lỏng ở 30°C. Các xạ khuẩn khác cũng phân hủy được PLA, PLC và PBC. Các đại diện khác của xạ khuẩn có khả năng phân hủy chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học bao gồm *Amycolatopsis* sp. 3118, *Amycolatopsis* sp. HT-6, *Saccharothrix* JMC9114, *Kibdelosporangium aridum* JMC7912 [58], *Actinomadura keratinilytica* T16-1 (Sukkhum et al., 2011), *Amycolatopsis thailandensis* PLA07, *Streptomyces bangladeshensis* 77T-4, *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* 76T-2 (Raziyafathima et al. 2016). Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được xác định đã phá trùng hợp polyme của polyetylen. Hai trong số vi khuẩn là loài *Pseudomonas aeruginosa* và chủng *Bacillus* sp., còn lại là xạ khuẩn, nấm sợi loài *Fusarium graminearum*. Quá trình giải trùng hợp polyme thông qua các enzyme amylaza, lignin/mangan peroxidaza, laccaza và sau đó là các enzyme khác laccaza. Các chủng này có thể sử dụng để tái tạo môi trường bị ô nhiễm bởi polyetylen (Ganesh et al. 2017). So khả năng của xạ khuẩn và vi khuẩn thấy quá trình phân hủy chất dẻo polyetylen terephthalat đã được các nhà khoa học Nhật Bản công bố năm 2016. Các sản phẩm tạo thành của quá trình phân hủy sinh học bởi vi khuẩn đã được phân tích chính xác. Họ đã phân lập và phân loại được loài vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* 201-F6 có thể phân hủy poly(ethylen terephthalat) (PET) ở

30°C từ 250 mẫu của màng film PET. Sau 6 tuần vi khuẩn này sử dụng PET là nguồn cacbon và năng lượng chính duy nhất. Khi sinh trưởng trên PET, chủng này đã sinh tổng hợp 2 enzym có khả năng thủy phân PET và chất trung gian axit mono(2-hydroxyethyl) terephthalic. Cả hai enzym đều cần cho sự chuyển hóa PET nhờ enzym hiệu quả đối với PET và axit (2-hydroxyethyl) terephthalic, đầu tiên thành sản phẩm thân thiện môi trường là các monome, axit terephthalic và etylen glycol (Yoshida et al. 2016). Xạ khuẩn *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* 76T-2 phân lập từ đất ở Đài Loan đã được chứng minh khả năng phân hủy được poly(ϵ -caprolacton) (PCL). Đã xác định được enzym PCL depolymeraza và tách chiết, làm sạch, nghiên cứu đặc tính của chitinaza. Chủng này vừa có khả năng phân hủy hoàn toàn PCL sau 6 giờ ở 45°C và phân hủy cả chitin (Chua et al. 2013). LDPE và các chất dẻo khác, sau 4 tuần, chủng xạ khuẩn *Streptomyces coelicoflavus* này loại bỏ 30% trọng lượng màng chất dẻo. Xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces bangladeshensis* 77T-4 phân lập từ đất Đài Loan có thể phân hủy poly(β -hydroxybutyrate) (PHB). Chủng xạ khuẩn này ở 45 °C đã làm mất trọng lượng của màng film PHB tới 50% sau 14 giờ ủ và 95% sau 18 giờ ủ. Cấu trúc bề mặt của màng film đã thay đổi, dưới SEM quan sát thấy nhiều lỗ tạo thành và to dần và tăng mật độ của lỗ theo thời gian sau 14 giờ ủ, thấy rõ vòng phân giải trên đĩa chứa PHB chứng tỏ đã có khả năng giải trùng hợp của loại polyme này bởi enzym polymeraza. Enzym này cũng đã được tách chiết, làm sạch và nghiên cứu các đặc tính riêng hoạt động ở 45°C và 50°C. Chủng xạ khuẩn này có tiềm năng cao trong phân hủy màng chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học (Hsu et al. 2012). *Actinomyces* phân lập từ rừng ngập mặn Ấn Độ đã thể hiện khả năng phân hủy PE, mà các loại chất dẻo khác cũng bị chủng xạ khuẩn này phân hủy sinh học. Với tiềm năng cao như vậy thì xạ khuẩn nay có thể khai thác vào việc làm sạch các khu vực bị ô nhiễm PE (Midhun Kumar Duddu, Girijasankar Guntuku.2015). Xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. BCC23167 phân lập từ chỗ chôn lấp rác ở Thái Lan có khả năng phân hủy sinh học hiếu khí rất nhiều polyeste mạch thẳng như

polyhydroxyalkanoat co-polyme, poly(ϵ -caprolacton) and polybutylen succinat ở 50°C và pH trung tính. Chúng này còn phân hủy poly[(R)-3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat] (PHBHx) thương mại và bề mặt bị thay đổi có thể vì vậy mà trọng lượng phân tử của polyme bị giảm. Ở giai đoạn đầu của quá trình phân hủy thấy có tinh thể tăng nhẹ ở màng film và sau đó sự giảm xảy ra mãnh liệt. Bề mặt của màng film đã bị thay đổi cấu trúc. Chúng xạ khuẩn ưa nhiệt độ này có tiềm năng trong công nghệ ủ phân hủy đối với chất dẻo phân hủy sinh học (Phithakrotchanakoon et al. 2009). Xạ khuẩn ưa nhiệt mới được phân lập từ đất đã được định danh thuộc chi *Streptomyces* có khả năng phân hủy hoàn toàn poly(D-3-hydroxybutyrat) (poly(D-3-hydroxybutyrat) (PHB)) sau 6 và 3 lần nuôi cấy ở 50°C. Bề mặt của màng film poly(D-3-hydroxybutyrat) (PHB) đã bị thay đổi cấu trúc do vi sinh vật tạo khuẩn lạc. Kiểu phân hủy xảy ra bao gồm cả bị tấn công và hoạt động của enzym ngoại bào tiết ra. Chúng xạ khuẩn này cũng phân hủy được poly(ethylen succinat), poly (este carbonat), polycaprolacton và poly(butylen succinat) với hiệu suất kém hơn (Calabia BP, Tokiwa Y. 2004).

Ở đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số **2-2016-00183** với tên là “Chế phẩm xạ khuẩn *Streptomyces* để sản xuất phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi”, 8 chủng xạ khuẩn ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động là *Streptomyces* sp. ACBT11, *Streptomyces* sp. ACBT12, *Streptomyces* sp. ACBT15, *Streptomyces* sp. ACBT18, *Streptomyces* sp. ACBT19, *Streptomyces* sp. ACBT22, *Streptomyces* sp. ACBT24 và *Streptomyces* sp. đã được mô tả. Tuy nhiên, 8 chủng xạ khuẩn ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động này không trùng với chủng xạ khuẩn thuộc sáng chế này. Ngoài nguồn gốc phân lập khác thì trình tự gen mã hóa 16S rARN của cả 8 chủng đề cập ở đây có độ tương đồng cao so với các chủng cũng thuộc chi *Streptomyces* nhưng khác loài. Cụ thể là *Streptomyces werraensis*, *Streptomyces griseoflavus* BPM18, *Streptomyces griseoflavus* PTCC 1130, *Streptomyces cellulosa* HBUM175112, *Streptomyces thermocarboxydus* OS2C và AS13Y,

Streptomyces fradias S81, *Streptomyces tendae* M23, *Streptomyces thermocoprophilus* NBRC 100771.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 được phân lập, định danh và xác định các đặc tính sinh học, có khả năng phân hủy rác thải từ màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học như túi nilon, chất dẻo (plastic), nhựa PE, nhựa PE đã được xúc tiến oxy hóa (oxo-biodegradable plastic) và chất dẻo phân hủy sinh học. Chủng xạ khuẩn ưa nhiệt được phân lập từ ủ rác thải sinh hoạt thành phố đã được định danh thuộc xạ khuẩn chi *Streptomyces* và thể hiện khả năng phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học (trong sáng chế cũng sử dụng cụm từ túi nilon) và đã được cải biến để tăng khả năng phân hủy sinh học (oxo-biodegradable). Phân loại chủng xạ khuẩn XKBD2.4 và trình tự gen 16S rARN đã được đăng ký trên Genbank có mã số MF521436.1. Chủng xạ khuẩn này sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza với hoạt tính khác nhau ở nhiệt độ 37°C và ở nhiệt độ cao 55°C sinh tổng hợp enzym lipaza. Chủng xạ khuẩn phân lập có khả năng phân hủy màng polyme, chất dẻo khi ủ phân hủy (compostable). Đây là một tiêu chí bắt buộc đối với chất dẻo được công nhận là phân hủy sinh học.

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBD2.4 thuần khiết về sinh học và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam.

Môi trường sinh tổng hợp các enzym ngoại bào thể hiện khả năng phân hủy túi nilon được bán ở siêu thị trong và ngoài nước có cấu trúc hóa học khác nhau và khả năng phân hủy sinh học khác nhau. Đó là PE và chất dẻo có nguồn gốc dầu mỏ được trộn với phụ gia xúc tiến oxy hóa. Các loại polyme dạng túi nilon được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học được thu thập từ (1) Hà Lan, Đức (được cấp chứng chỉ có khả năng phân hủy sinh học của châu Âu), cộng hòa Sec,

(2) từ các siêu thị Việt Nam được cấp chứng chỉ “thân thiện môi trường” bởi Bộ Tài nguyên – Môi trường, chứ không được cấp chứng chỉ “có khả năng tự phân hủy sinh học” tức là sau 2 năm phân hủy 60 %; (3) chất dẻo phân hủy sinh học oxo (oxo-biodegradable plastic), sử dụng các phụ gia xúc tiến oxy hóa PE để tạo nên loại chất dẻo này bởi công trình nghiên cứu khoa học tại Việt Nam và chất dẻo có nguồn gốc nước ngoài có khả năng phân hủy sinh học .

Khả năng phân hủy sinh học của PE và chất dẻo phân hủy sinh học oxo bằng nuôi cấy trực tiếp các chủng nêu trên để chúng sinh tổng hợp các enzym nội, ngoại bào khác nhau. Tuy nhiên sáng chế chỉ xác định các enzym ngoại bào như là CMCaza, xylanaza, chitinaza, lipaza, proteinaza, amylaza.

Sử dụng các kỹ thuật chuẩn để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của các loại màng polyme có nguồn gốc dầu mỏ, chất dẻo và chất dẻo phân hủy sinh học (túi nilon) có bản chất hóa học khác nhau như: khả năng phân hủy bằng ủ hiếu khí - có mặt oxy (compostable, mất trọng lượng, khả năng kéo đứt, cấy trực bề mặt (SEM), so màu, thay đổi bản chất hóa học phân tích bởi phổ hồng ngoại FTIR).

Chủng xạ khuẩn trong sáng chế này là XKBD2.4 được phân lập từ đồng ủ phân hủy rác thải sinh hoạt từ tỉnh Bình Phước Việt Nam có trình tự gen mã hóa 16S rARN với độ dài là 1056 bp tương đồng 99% với *Streptomyces thermoviolaceus* NBRC 12382, *Streptomyces thermogriseus* NBRC 12383, *Streptomyces thermogriseus* AHK130, *Streptomyces thermogriseus* AHK108, *Streptomyces thermovulgaris* NRRL B-12517T, *Streptomyces* sp. BCC23167, *Streptomyces thermovulgaris* A-V, *Streptomyces thermovulgaris* KSI 659, *Streptomyces* sp. LZ-35, *Streptomyces thermogriseus* UICC B-49, *Streptomyces thermovulgaris* 54-2, *Streptomyces thermovulgaris* R10, *Streptomyces thermovulgaris* NBRC 1308, và độ tương đồng thấp hơn từ 98- 86 % so với *Streptomyces thermocarboxyodus* AHS1, *Streptomyces coelicolor* LCC-04, *Streptomyces coelicolor* LCC-01, *Streptomyces coelicolor* LCC-03, *Streptomyces*

sp. MUSC227, *Streptomyces laurentii* X13, *Actinomyces funkei* 604141/2010, *Actinomyces funkei* 606220/2008.

Tóm lại, chủng xạ khuẩn XKBD2.4 có quan hệ gần gũi nhất với các chủng xạ khuẩn ưa nhiệt thuộc loài *Streptomyces thermovulgaris* R10, NBRC 13989, 54-2, UICC B-49, *Streptomyces* sp LZ-35, *Streptomyces thermovulgaris* KSI 659, A-V, v.v., tất cả các chủng thuộc loài này đều chưa có các nghiên cứu và thông báo về khả năng phân hủy chất dẻo. Có quan hệ xa hơn với các đại diện khác cũng thuộc chi *Streptomyces*. Chỉ riêng chủng *Streptomyces* sp. BCC23167 được phân lập từ rác thải plastic trong đồng chôn lấp rác ở Thái Lan đã được biết đến khả năng phân hủy PBC.

Sau khi so sánh, chủng xạ khuẩn ưa nhiệt trong sáng chế này thuộc chi *Streptomyces*. Chủng XKBD2.4 được đặt lại tên là *Streptomyces* sp. XKBD2.4. Cây phát sinh chủng loại của chủng *Streptomyces* sp. XKBD2.4 này được thể hiện trên Hình 6.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học ở môi trường dạng lỏng và dạng rắn, chế phẩm này chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện cấu trúc bề mặt (bằng SEM) các loại nilon trước và sau 30 ngày xử lý bằng chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBD2.4; (A) và (B) túi nilon HL; (C) và (D) túi nilon VHL; (E) và (G) túi nilon VN1.

Hình 2 thể hiện phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của mẫu nilon HL ban đầu (A), sau 30 ngày xử lý (B) bằng chủng XKBD2.4.

Hình 3 thể hiện phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của mẫu nilon VHL ban đầu (A), sau 30 ngày xử lý (B) bằng chủng XKBD2.4.

Hình 4 thể hiện phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của mẫu nilon VN1 ban đầu (A), sau 30 ngày xử lý (B) bằng chủng XKBD2.4.

Hình 5 thể hiện hình thái chủng xạ khuẩn XKBD2.4.

Hình 6 thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng xạ khuẩn XKBD2.4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tiến hành phân lập các chủng xạ khuẩn từ đồng ủ phân hủy từ rác thải sinh hoạt thành phố tại tỉnh Bình Dương, Việt Nam. Môi trường Gause được dùng làm môi trường phân lập xạ khuẩn có thành phần như sau (g/l): Tinh bột tan 20; K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 1; NaCl 1; $FeSO_4$ 0,01; độ pH 6,8. Các mẫu thu được từ các đồng ủ phân hủy rác thải sinh hoạt thành phố từ tỉnh Bình Dương, Việt Nam đã được pha loãng và gọt lên môi trường Gause thạch (môi trường Gause có thêm thành phần aga với lượng 18g/l). Sau đó các đĩa thạch đã cấy mẫu được nuôi ở 55°C trong buồng nuôi cấy vô trùng. Chỉ sau 72-96 giờ, khuẩn lạc xạ khuẩn có hình thái khác nhau được hình thành trên các đĩa thạch được tách và làm sạch. Chủng thu được đã được đánh giá khả năng sinh trưởng ở các nhiệt độ khác nhau, được kí hiệu là XKBD2.4. Chủng xạ khuẩn có hình thái khác nhau sẽ cấy trên môi trường Gause thạch và được nuôi ở nhiệt độ 55 °C. Hình thái khuẩn lạc của chủng này được thể hiện trên Hình 5. Khả năng sinh trưởng của chủng trong sáng chế này ở các mức nhiệt độ khác nhau được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc tính nhiệt của chủng xạ khuẩn XKBD2.4

Tên chủng	Nhiệt độ 37°C	Nhiệt độ 55°C	Nhiệt độ 65°C
XKBD2.4	+	+	-

Chú thích: (+) *sinh trưởng*, (-) *không sinh trưởng*

Để xác định hoạt tính enzym chitinaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn, chủng được nuôi trên môi trường Gause bổ sung 5% cơ chất chitin, nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym chitinaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym CMCaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn, chủng được nuôi trên môi trường Gause bổ sung 5% cơ chất CMC (Carboxymethyl cellulose), nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym CMCaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym xylanaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn, chủng được nuôi trên môi trường Gause bổ sung 5% cơ chất xylan, nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym xylanaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym proteaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* trong sáng chế này, các chủng được nuôi trên môi trường Gause bổ sung 5% cơ chất casein, nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym proteaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym amylaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn, chủng được nuôi trên môi trường Gause bổ sung 5% cơ chất tinh bột, nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính amylaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính lipaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn, các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường Gause bổ sung 5% cơ chất tween 80, nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym lipaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Bảng 2: Khả năng sinh tổng hợp một số enzym ngoại bào của chủng xạ khuẩn XKBD2.4

Nhiệt độ	Chitinaza (mm)	CMCaza (mm)	Proteaza (mm)	Xylanaza (mm)	Amylaza (mm)	Lipaza (mm)
55 °C	-	-	-	-	-	+
37 °C	++	-	+++	++	-	++

Chú thích: (+) đường kính phân giải $d \leq 5\text{mm}$; (++) đường kính phân giải $5\text{mm} \leq d \leq 10\text{mm}$; (+++) đường kính phân giải $11\text{mm} \leq d \leq 15\text{mm}$

Để xác định chính xác hơn chủng xạ khuẩn phân lập được, tiến hành phân loại xạ khuẩn bằng cách xác định trình tự gen mã hóa 16S rARN và so sánh trình tự thu được với dữ liệu trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank).

ADN tổng số của chủng xạ khuẩn thu được được tách chiết theo các bước sau:

Thu sinh khối xạ khuẩn vào ống eppendorf bằng cách ly tâm 6000vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; Bổ sung dH₂O để rửa sinh khối, ly tâm 6000vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; Bổ sung 400µl dung dịch đệm phân giải, vortex đều; Bổ sung 50 µl lysozym 10 mg/ml, ủ ở 37°C trong 30-45 phút; Bổ sung 20 µl proteinaza K ủ ở 56°C trong 1 giờ; Bổ sung C:I (24:1) với tỷ lệ 1:1 (v:v), vortex, ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C; Hút phần dịch nổi phía trên sang ống eppendorf mới; Bổ sung isopropanol với tỉ lệ 1:1 về thể tích, ủ ở 4°C qua đêm; Ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa; Bổ sung etanol 100% tỷ lệ 1:1 (v:v); Ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa, rửa tiếp bằng etanol 70%; Làm khô tủa; Hòa trong TE, bảo quản ở 4°C.

Sau khi thu được ADN tổng số, thực hiện khuếch đại đoạn gen mã hoá 16S rARN bằng kỹ thuật PCR. Đoạn gen mã hóa 16S rARN được khuếch đại bằng cặp

mồi 27F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') và 1492R (5' – TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T– 3') (Baker *et al.*, 2003; Bourne *et al.*, 2005).

Thành phần phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3 - Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μ l)	Nồng độ cuối
Đệm Taq 10X	2,5	1X
dNTPs 2 mM	2,5	0,2 mM
MgSO ₄ 20 mM	2,5	2 mM
Mồi 27F 10 μ M	1	0,4 μ M
Mồi 1492R 10 μ M	1	0,4 μ M
Taq Polymeraza 5 U/	0,2	1 U/25 μ l
ADN khuôn	1	
ddH ₂ O	14,3	
Tổng thể tích	25 μ l	

Chu kỳ luân nhiệt của phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4 - Chu kì luân nhiệt của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	94°C/5 phút	1
Biến tính	94°C/1 phút	30
Gắn mồi	55°C/1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C /1 phút 30 giây	
Kéo dài chuỗi	72 °C /7 phút	1
	4 °C	Giữ ổn định

Quan hệ di truyền của chủng xạ khuẩn XKBD2.4 phân lập mới từ ủ phân hủy rác thải sinh hoạt trong sáng chế này được thể hiện ở cây phát sinh chủng loài trên Hình 6.

Trình tự gen 16S rARN của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBD2.4 đã được đăng ký trên Genbank có mã số MF521436.1. Chủng xạ khuẩn này sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza với hoạt tính khác nhau ở nhiệt độ 37°C và ở nhiệt độ cao 55°C sinh tổng hợp enzyme lipaza. Chủng xạ khuẩn phân lập có khả năng phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học khi ủ phân hủy (compostable).

Bào tử của chủng xạ khuẩn này được bảo quản và lưu giữ trong 50% glyxerol ở -80°C hoặc trong dầu khoáng ở nhiệt độ 25 - 30°C tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 được dùng để sản xuất chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học hay thân thiện môi trường. Trong đó, chế phẩm này có thể được sản xuất cả dưới dạng lỏng và rắn. Chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học hay thân thiện môi trường dạng lỏng chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 với mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/ml chế phẩm. Chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học hay thân thiện môi trường dạng rắn chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 với mật độ vi sinh vật đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/g chế phẩm, chất mang rắn bao gồm rơm nghiền, thân và lõi ngô nghiền và cám gạo với theo tỷ lệ rơm nghiền:thân và lõi ngô nghiền:cám gạo là 3:3:4 và nguồn khoáng chất, và đạt độ ẩm là 15-19%

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phân hủy sinh học các loại màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và polyme phân huỷ sinh học, chất dẻo (túi nilon) bởi chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 ở 55 °C.

Tác dụng phân hủy sinh học các loại màng polyme có nguồn gốc từ dầu và chất dẻo phân huỷ sinh học mở bởi chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học hay thân thiện môi trường chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 được xác định bằng phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), các tính chất cơ học (độ bền kéo và độ giãn dài khi đứt), sự thay đổi màu và phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM). Việc xác định tác dụng phân hủy sinh học các loại màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học bởi chế phẩm chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 cũng được xác định bằng cách xác định khả năng phân hủy này của bản thân chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4.

Chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 sau khi phân lập được lưu giữ trong 50% glycerol ở -80°C hoặc trong dầu khoáng ở nhiệt độ 25 - 30°C tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Trình tự gen 16S rARN của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBD2.4 đã được đăng ký trên Genbank có mã số: MF521436.1

Chủng giống của chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 (chủng XKBD2.1) được lấy từ mẫu lưu giữ tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các loại túi nilon có nguồn gốc khác nhau được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy bằng chế phẩm theo sáng chế. Trong đó, một loại túi nilon có nguồn gốc từ Hà Lan (loại polyme có khả năng phân hủy sinh học nhận chứng chỉ của

châu Âu), một loại túi nilon do Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam nghiên cứu nghiên cứu tạo ra, một loại túi nilon được bán thương mại trong siêu thị Metro ở Hà Nội được khuyến cáo thân thiện môi trường.

Giống xạ khuẩn XKBD2.4 để đánh giá khả năng phân hủy sinh học được nuôi cấy lỏng trên môi trường Gause có thành phần như sau (g/l): Tinh bột tan 20; K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 1; NaCl 1; $FeSO_4$ 0,01; pH 6,8. Sau 3 – 5 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở $55\text{ }^\circ\text{C}$, các chủng đã sinh trưởng mạnh, có mật độ tế bào $10^7 - 10^8$ MPN/ml. Thu dịch nuôi cấy để tiến hành xử lý màng polyme, chất dẻo (gọi là: túi nilon) theo sáng chế.

Các loại mẫu túi nilon có nguồn gốc khác nhau được cắt thành miếng có kích thước 2×10 cm, cho 1 g nilon mỗi loại riêng rẽ vào bình thủy tinh 250 ml chứa 150 ml môi trường nuôi cấy chủng XKBD2.4, thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ $55\text{ }^\circ\text{C}$. Xác định độ giảm hoạt tính enzym ngoại bào trong dịch nuôi theo thời gian. Sau 30 ngày nuôi cấy các chủng xạ khuẩn có mặt của mẫu túi nilon đã được đánh giá mức độ phân hủy bằng các thiết bị chuyên dụng với các chỉ tiêu bắt buộc trong đánh giá khả năng phân hủy sinh học (biodegradability) màng polyme, chất dẻo như: độ giảm khối lượng, độ bền kéo đứt, sự thay đổi màu, sự thay đổi cấu trúc hóa học bằng máy ghi phổ hồng ngoại biến đổi, sự thay đổi cấu trúc bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét. Kết quả được thể hiện dưới đây.

a) Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của các mẫu túi nilon được xác định bằng máy ghi phổ hồng ngoại biến đổi Fourier Nexus, thực hiện như sau: mẫu ở dạng màng mỏng hoặc màng vụn (màng vụn sẽ được ép thành viên với KBr) và quét phổ ở vùng $400\text{cm}^{-1} - 4000\text{cm}^{-1}$, độ phân giải 8cm^{-1} , số lần quét 32 lần. Phổ FTIR được ghi dưới dạng đường cong phụ thuộc phần trăm truyền qua vào số sóng

($1/\lambda$) hay bước sóng của bức xạ, sau khi đã bù trừ phổ nền của không khí (hoặc KBr).

Chỉ số cacbonyl (CI) được sử dụng để đánh giá sự thay đổi hàm lượng các nhóm cacbonyl hình thành do sự phân hủy oxy hóa quang màng polyme, chất dẻo.

Các giá trị CI được tính theo các công thức sau $CI = \frac{I_{C=O}}{I_{CH_3}}$. Trong đó, $I_{C=O}$ là cường độ dao động hóa trị của nhóm cacbonyl; I_{CH_3} là cường độ dao động biến dạng đối xứng của nhóm metyl.

b) Các tính chất cơ học

Các tính chất cơ học (độ bền kéo và độ dẫn dài khi đứt) của túi nylon được đo trên máy Zwick Z2.5 theo tiêu chuẩn ASTM D638, tốc độ kéo 50 mm/phút ở nhiệt độ phòng, mỗi loại mẫu được đo 3 lần để lấy giá trị trung bình. Mẫu sau khi cắt dùng thước đo chuyên dụng để xác định bề dày (d) đo và đánh dấu để xác định khoảng cách l_0 (khoảng cách ban đầu). Sau đó mẫu cần đo được kẹp lên máy và đo, xác định được các đại lượng: Độ bền kéo (MPa) và độ dẫn dài khi đứt (%).

Độ bền kéo đứt

Khi tác dụng một lực kéo F lên mẫu ở một thời điểm bất kỳ thì tạo ra một ứng suất tức thời ứng với lực F tại thời điểm đó.

Ứng suất ứng với lực F tại thời điểm mẫu bị đứt gọi là ứng suất khi đứt (σ_k), được xác định bằng công thức sau:

$$\sigma_k = \frac{F}{S}$$

Trong đó: F : lực kéo tác dụng lên mẫu (N).

S : tiết diện ngang ban đầu của mẫu (m^2).

Độ dẫn dài khi đứt

Độ dẫn dài khi đứt của vật liệu được xác định theo công thức sau:

$$\varepsilon = \frac{l_B - l_0}{l_0} \cdot 100\%$$

Trong đó: ε - % giãn dài của mẫu.

l_0 - chiều dài của mẫu trước khi kéo (cm).

l_B - chiều dài của mẫu tại thời điểm mẫu đứt (cm).

c) Sự thay đổi màu

Xác định sự thay đổi màu sắc của mẫu màng polyme, chất dẻo bằng số liệu hiển thị trên máy so màu. Bề mặt và màu sắc mẫu được xác định theo tiêu chuẩn ASTM D2244-89 trên máy ColorTec PCM (PSMTM, Mỹ) với L^* đo độ sáng và a^* , b^* là tọa độ màu. Trong đó: $+a^*$: là màu đỏ; $-a^*$: là màu xanh lá; $+b^*$: là màu vàng; $-b^*$: màu xanh dương; L^* thay đổi từ 100 (màu trắng) đến 0 (màu đen).

Các giá trị ΔE_n dùng để tính toán sự thay đổi màu sắc bề mặt mẫu. Nó như một hàm theo thời gian chiếu xạ tia cực tím với công thức:

$$\Delta E_n = \sqrt{(L^* - L_n)^2 + (a^* - a_n)^2 + (b^* - b_n)^2}$$

L^* , a^* , b^* là các giá trị màu tại thời điểm ban đầu.

L_n , a_n , b_n là các giá trị màu tại thời điểm n.

Nếu giá trị ΔE_n nhỏ tương ứng với ít thay đổi màu sắc của vật liệu. Nếu giá trị ΔE_n lớn thể hiện sự thay đổi màu sắc lớn, vật liệu chịu ảnh hưởng lớn của các tác nhân tác động.

d) Phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM)

Hình thái cấu trúc của các mẫu được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM- JSM-6510 LV, Jeol, Japan). Mẫu được phủ một lớp platin mỏng để dẫn điện và chụp trong môi trường khí nitơ.

Các kết quả được thể hiện dưới đây:

Bảng 5: Hoạt tính enzym ngoại bào theo thời gian xử lý

bằng *Streptomyces* sp. XKBD2.4

Enzym Thời gian	CMCaza (mm)	Proteaza (mm)	Chitinaza (mm)	Xylanaza (mm)	Amylaza (mm)	lipaza (mm)
Ban đầu	-	-	-	-	-	+
7 ngày	-	-	-	-	-	+
14 ngày	-	-	-	-	-	+
21 ngày	-	-	-	-	-	+
30 ngày	-	-	-	-	-	+

Chú thích -: không có hoạt tính; +: đường kính vòng phân giải từ 1-5mm

Bảng 6: Độ giảm khối lượng của các loại mẫu nylon sau 30 ngày

xử lý bằng chủng xạ khuẩn XKBD2.4

Tên mẫu	HL	VHL	VN1
Độ giảm khối lượng (%) khi xử lý bằng chủng <i>Streptomyces</i> sp. XKBD 2.4	31,77 - 34,27	10,00 - 10,72	1,20 - 2,00

Bảng 7: Khả năng phân hủy túi nylon sau 30 ngày xử lý bằng

chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBD 2.4

Tên mẫu Chỉ tiêu	Nylon ban đầu			Nylon sau 30 ngày xử lý		
	HL	VHL	VN1	HL	VHL	VN1
Độ bền kéo đứt	8,39	24,25	15,41	kxdd	kxdd	kxdd
Độ giãn dài khi đứt	0	0	0	kxdd	kxdd	kxdd
So màu (ΔE)	0	0	0	12,96	7,17	2,65
CI	5,51	0,01	0,01	0,46	0,00	0,02

Kxdd: không xác định được do mẫu bị nát vụn hoặc đứt gãy không thể đo được bằng máy chuyên dụng

Sự thay đổi cấu trúc hóa học của túi nilon sau xử lý bằng chủng XKBD2.4

Phổ FTIR của mẫu túi nilon HL sau xử lý với chủng XKBD2.4 được trình bày trên hình 2. Có thể thấy vị trí một số pic đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm OH liên kết hydro hoặc nhóm CONH hoặc NH hoặc C≡C-H, dao động hóa trị của nhóm CH no và C-O dịch chuyển từ 26-80 cm^{-1} . Đồng thời pic đặc trưng cho liên kết C=O gần như biến mất hoàn toàn mà chỉ còn vai phở ở vị trí 1716,45 cm^{-1} . Bên cạnh đó, quan sát thấy xuất hiện 1 pic mới ở số sóng 1640,82 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của các liên kết C=C liên hợp hoặc không liên hợp với nhân thơm hoặc vòng lactam ≥ 6 cạnh trong chất dẻo. Điều này cho thấy các nhóm C=O, CH và C-O trong chất dẻo đã bị chủng XKBD2.4 tác động và phân hủy tạo thành các hợp chất không no như lacton hay anken, v.v.

Phổ FTIR của mẫu túi nilon VHL sau xử lý với chủng XKBD2.4 được trình bày trên hình 3. Có thể thấy vị trí một số pic đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm OH tự do, dao động hóa trị của nhóm CH no và C-O dịch chuyển từ 3-42 cm^{-1} , trong đó vị trí nhóm C-O dịch chuyển nhiều nhất. Đồng thời, quan sát thấy xuất hiện 1 pic mới ở số sóng 1631,34 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của các liên kết C=C liên hợp hoặc không liên hợp với nhân thơm hoặc vòng lactam ≥ 6 cạnh trong chất dẻo. Minh chứng này cho thấy chủng XKBD2.4 đã tác động vào các nhóm C-O, CH và OH trong chất dẻo làm cho chất dẻo bị phân hủy tạo thành các hợp chất không no như lacton hay anken, v.v.

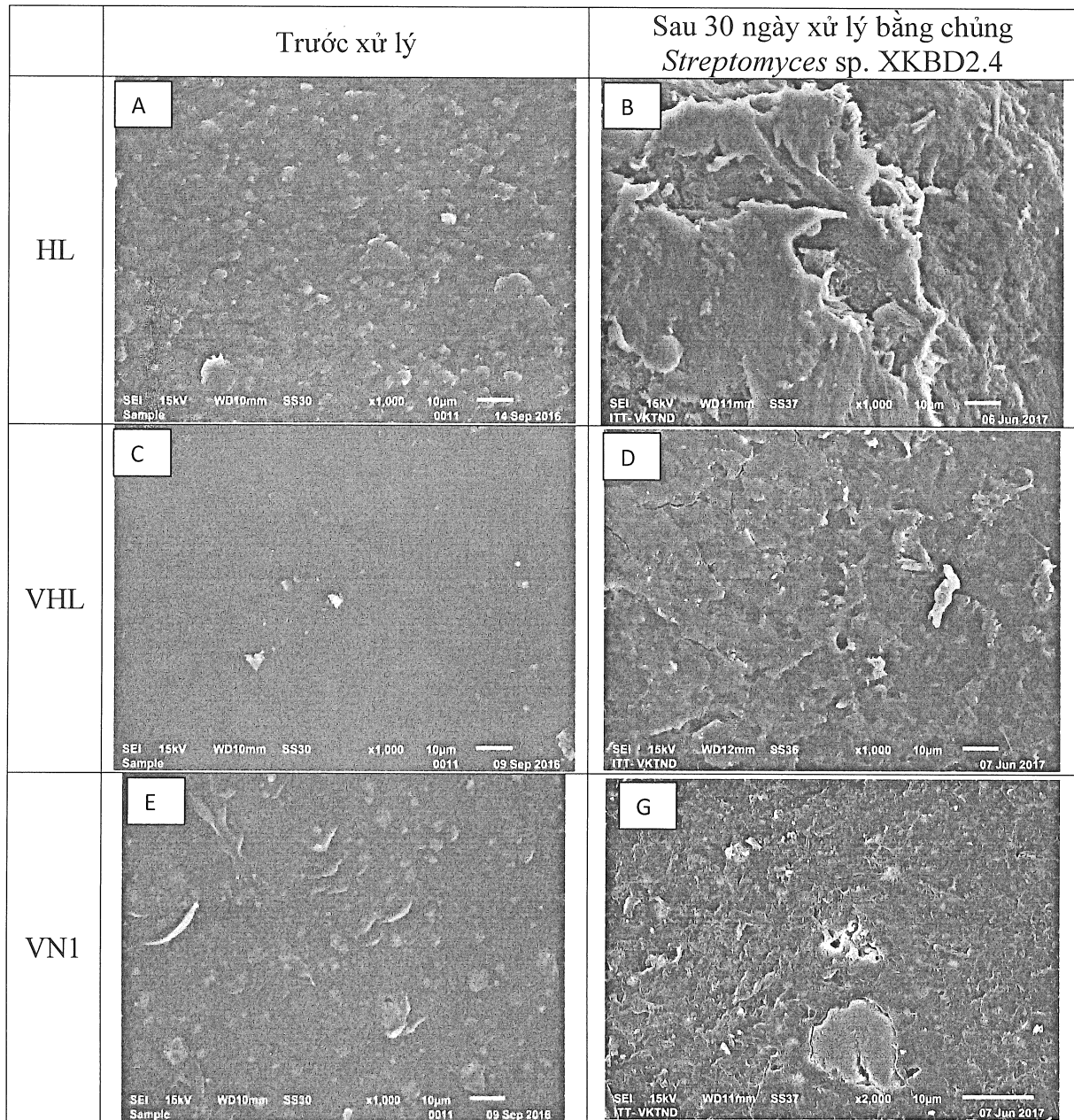
Phổ FTIR của mẫu túi nilon VHL sau xử lý với chủng XKBD2.4 được trình bày trên hình 4. Có thể thấy vị trí một số pic đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm OH tự do, dao động hóa trị của nhóm CH no và C-O dịch chuyển từ 3-53 cm^{-1} , trong đó vị trí nhóm OH tự do dịch chuyển nhiều nhất. Đồng thời, quan sát thấy xuất hiện 1 vai pic ở số sóng 1724,97 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của các liên kết C=O trong axit hoặc xeton. Kết quả này cho thấy XK2.4 đã tác động vào các nhóm OH tự do, C-O và CH trong plastic làm cho chất dẻo bị phân hủy tạo thành các hợp chất không no như xeton, axit hay este, v.v.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

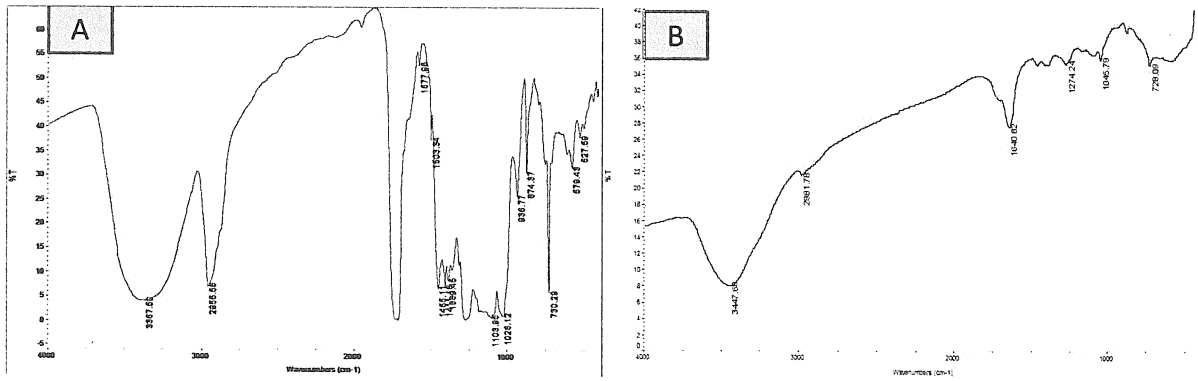
Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBD2.4 ưa nhiệt, được phân lập từ Bình Dương, Việt Nam, sinh tổng hợp lipaza, xylanaza, chitinaza, proteaza, 37 °C và ở 55 °C sinh tổng hợp lipaza có thể phân hủy các loại chất dẻo có cấu trúc hóa học không giống nhau. Bản thân chủng này có thể sử dụng tạo chế phẩm để ủ rác thải sinh hoạt chứa chất dẻo hay chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học đã được phân loại. Chủng này cũng có thể kết hợp với các chủng vi sinh vật ưa nhiệt khác để xử lý rác thải chất dẻo. Chế phẩm tạo ra từ xạ khuẩn này có thể cung cấp cho các quy trình công nghệ phân hủy, chuyển hóa rác thải là chất dẻo an toàn và đi theo con đường hoàn toàn sinh học (ủ phân hủy). Không những không gây hiệu ứng nhà kính do đốt hay chôn lấp làm lãng phí quỹ đất và giảm nghiêm trọng chất lượng cuộc sống như hiện nay. Hiệu quả của sáng chế là mang lại một cách tiếp cận có thể khai thác hiệu quả đa dạng vi sinh vật ở Việt Nam là nguồn nguyên liệu di truyền bản địa để xử lý rác thải nhựa. Sáng chế này là nền tảng nhằm tạo thêm các chuỗi công nghệ mới để xử lý rác thải nhựa với chi phí thấp và góp phần giảm thiểu ảnh hưởng của rác thải nhựa lên môi trường đất, nước và đời sống của động thực vật hoang dã.

YÊU CẦU BẢO HỘ

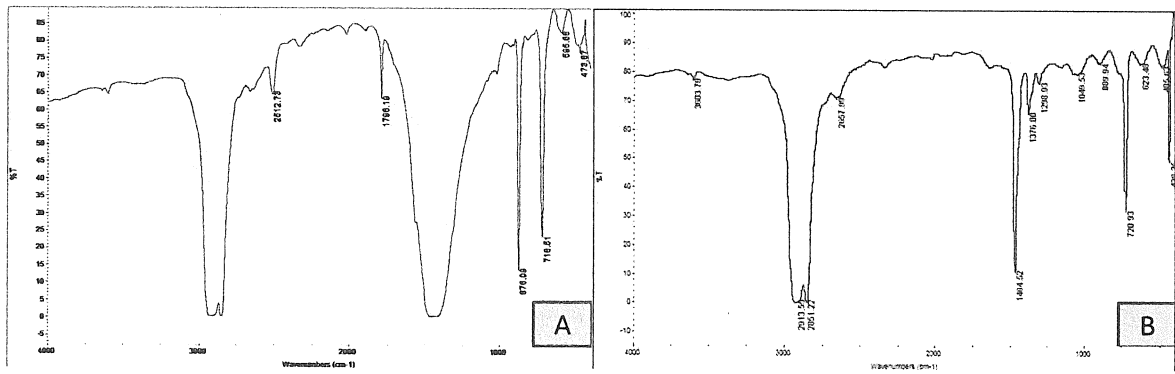
1. Chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza ở nhiệt độ 37 °C và sinh tổng hợp enzym lipaza ở nhiệt độ 55 °C bằng phương pháp nuôi cấy chìm và rắn, khác biệt ở chỗ, chủng xạ khuẩn này có khả năng phân hủy các loại màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học hay thân thiện môi trường, và có số đăng ký GenBank là MF521436.1.
2. Chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học hay thân thiện môi trường dạng lỏng, chế phẩm này chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 theo điểm 1 với mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/ml chế phẩm.
3. Chế phẩm xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học hay thân thiện môi trường dạng rắn, chế phẩm này chứa chủng xạ khuẩn ưa nhiệt *Streptomyces* sp. XKBD2.4 theo điểm 1 với mật độ vi sinh vật của mỗi chủng đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/g chế phẩm, chất mang rắn bao gồm rơm nghiền, thân và lõi ngô nghiền và cám gạo với theo tỷ lệ rơm nghiền:thân và lõi ngô nghiền:cám gạo là 3:3:4 và nguồn khoáng chất, và đạt độ ẩm là 15-19%.



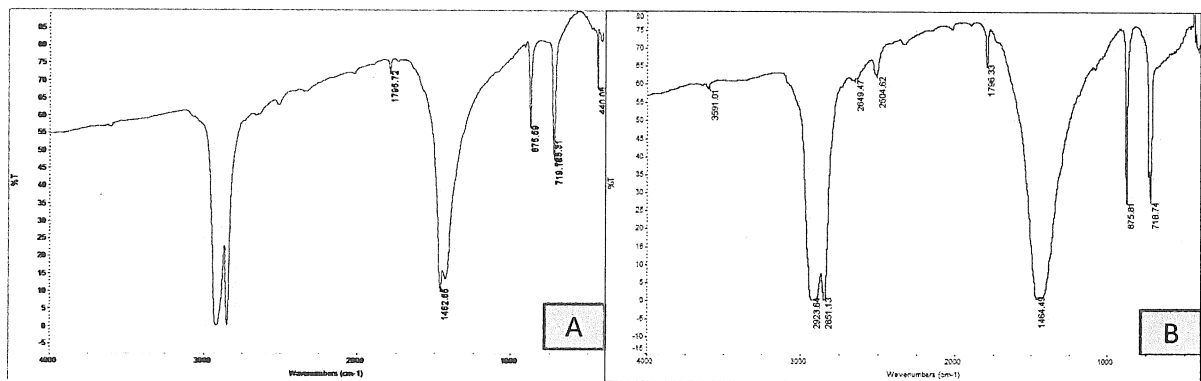
Hình 1



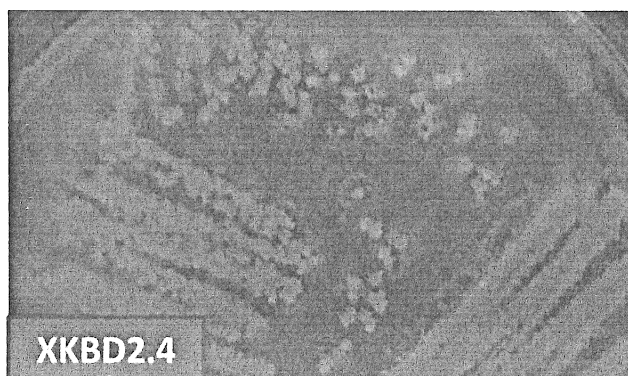
Hình 2



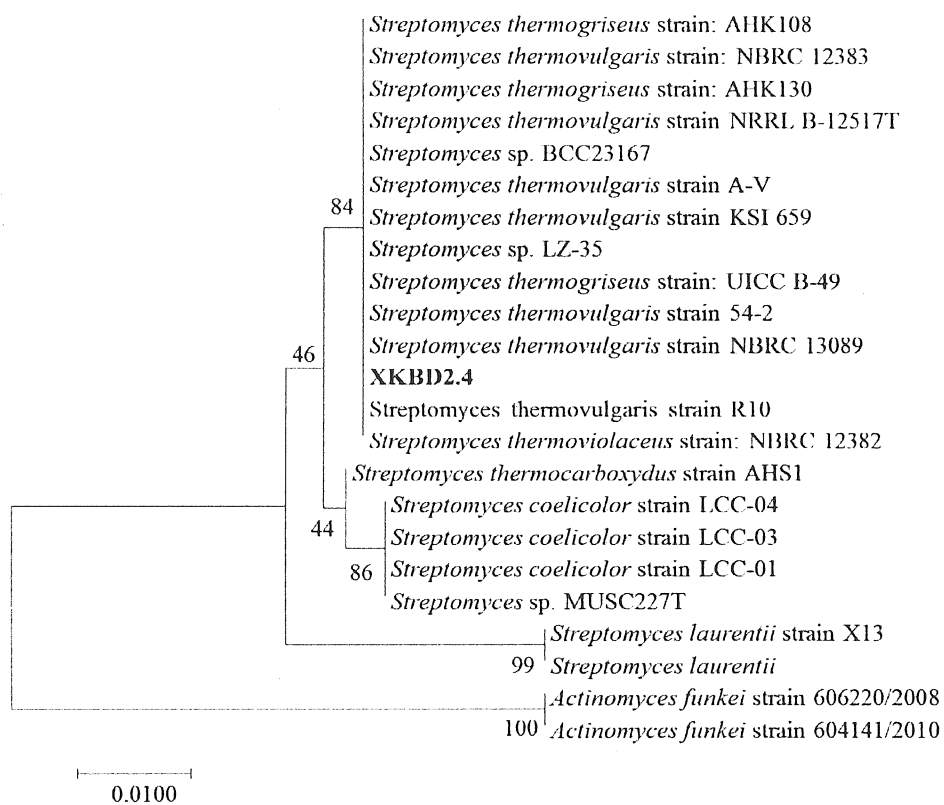
Hình 3



Hình 4



Hinh 5



Hinh 6