



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) 
2-0002117

(51)⁷ **C12N 1/02, 1/26**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00304

(22) 09.10.2017

(45) 25.09.2019 378

(43) 27.11.2017 356

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN (VN)**

334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) **Bùi Thị Việt Hà (VN), Hoàng Thị Vui (VN), Hoàng Hương Diễm (VN), Phạm Đức Ngọc (VN), Trần Mỹ Hạnh (VN), Ngô Anh Tiến (VN)**

(54) **CHỦNG VI KHUẨN CLOSTRIDIUM BUTYRICUM ST5 VÀ QUY TRÌNH LÊN
MEN SẢN XUẤT HYDRO SINH HỌC BỞI CHỦNG NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men sinh tổng hợp hydro và quy trình lên men sản xuất hydro sinh học nhờ chủng vi khuẩn này. Chủng *Clostridium butyricum* ST5 theo sáng chế được phân lập từ dạ dày bò, có khả năng lên men sản xuất hydro từ sinh khối từ nhiều nguồn cacbon khác nhau. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình lên men sản xuất hydro sinh học nhờ chủng này, theo đó quy trình theo giải pháp hữu ích có khả năng sản xuất hydro sinh học, đóng vai trò như một nguồn năng lượng tái tạo.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và vi sinh vật ứng dụng, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn lên men sản xuất hydro sinh học và quy trình sản xuất hydro sinh học để tạo nguồn năng lượng tái tạo.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện nay nền kinh tế thế giới đang bị phụ thuộc vào nguồn nhiên liệu hóa thạch. Ngoài các lợi thế của mình, nguồn nguyên liệu hóa thạch cũng gây ra nhiều vấn đề như ô nhiễm không khí, ô nhiễm môi trường. Đồng thời, đây là nguồn nhiên liệu không thể tái chế và đang dần cạn kiệt nên cần tìm ra nguồn năng lượng thay thế cho nhiên liệu hóa thạch và có thể tái tạo đang là vấn đề cấp thiết.

Một xu hướng đang được nghiên cứu trên nền công nghệ xanh đó là sử dụng nguồn năng lượng hydro tái tạo, cụ thể là sử dụng nguồn hydro tái tạo từ các nguồn nguyên liệu là phế liệu của ngành nông nghiệp và một số ngành công nghiệp khác nhau. Đã có nhiều nghiên cứu nhằm tạo ra nguồn hydro với hiệu suất chuyển đổi lớn, chiếm 60-80% từ sinh khối (Chong M.L. và cộng sự; 2009, Kotay S.M. và Das D.; 2008, Winter C.J.; 2009). Do đó, đây được coi là ngành công nghệ xử lý đầy hứa hẹn đối với các chất thải và phế thải hữu cơ. Ngoài ra, nhiên liệu hydro cũng dễ dàng tạo ra điện thông qua hệ thống pin nhiên liệu, điều này đặc biệt thu hút các chương trình nghiên cứu nhằm ứng dụng nhiên liệu hydro trong các phương tiện giao thông như ô tô, máy bay, xe máy, xe buýt và nhiều lĩnh vực công nghiệp khác.

Hiện nay, khoảng 95% hydro thương mại được sản xuất bằng phương pháp hóa nhiệt và điện phân nước. Tuy nhiên, phương pháp hóa nhiệt yêu cầu nhiệt độ và áp suất cao rất tốn kém năng lượng, đồng thời lại gây ô nhiễm môi trường. Phương pháp điện phân nước thì để tạo hydro thì khá dễ dàng, nhưng hệ thống thiết bị lại rất đắt (Elam C.C. và cộng sự; 2003). Ngoài hai phương pháp trên, phương pháp sinh học đang được quan tâm và chú ý hiện nay. Hydro được tạo thành từ quá trình lên men của vi sinh vật từ các hợp chất hữu cơ ở điều kiện nhiệt độ và áp suất thông thường. Vi tảo và vi khuẩn là 2 đối tượng quan trọng trong quá trình sản xuất hydro sinh học nhờ quá trình quang phân ly nước và lên men kỵ khí.

Một vấn đề ưu tiên hàng đầu trong việc phát triển nguồn hydro tái tạo từ nguồn nguyên liệu tái tạo là phải có được chủng vi sinh có khả năng lên men chuyển hóa sinh khối thành hydro với hiệu suất đủ để thu hồi hydro. Đã có nhiều chủng vi sinh vật được ứng dụng để lên men sản xuất hydro như *Clostridium* sp. no 2, *C. paraputrificum* M-21, *Clostridium* sp. *C. beijerinckii* YA001, *Thermotoga maritima*, *T. elfi*, *Caldicellulosiruptor*, *Saccharolyticus*, *Thermoanaerobacteriumthermosaccharolyticum* W16, *Enterobacter aerogenes* E.2005, *E. cloacae* IIT-BT 08 wt, *E. aerogenes* HU-101 mAY-2, *Citrobacter* sp. CMC-1 v.v., tuy nhiên, các chủng này cho hiệu suất chuyển hóa hydro chưa cao, từ 1-3 molH₂/mol cơ chất. Chủng có hiệu suất chuyển hóa cao nhất cũng chỉ đạt khoảng 4 molH₂/mol cơ chất (*Thermotoga maritima*). Ngoài ra, các chủng vi sinh này rất khó kiểm soát trong quá trình lên men và không có hiệu quả kinh tế khi lên men sản xuất hydro. Trong đó, các loài thuộc chi *Clostridium* đang được ưu tiên nghiên cứu do chúng có khả năng phát triển mạnh, dễ nuôi cấy, nhưng có nhược điểm là hiệu suất chuyển hóa tạo hydro không cao.

Các chủng loài thuộc chi *Clostridium* đã được nghiên cứu, bao gồm *C. paraputrificum*, *C. lentocellum*, *C. thermosuccinogenes*, *C. bifermentans*, *C. thermolacticum*, *C. butyricum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. acetobutylicum*, và *C. pasteurianum*. Sản lượng hydro tối ưu được theo dõi với mỗi loài, thay đổi từ 1,1 mol H₂/mol hexoza đến 2,6 mol H₂/mol hexoza, tùy thuộc vào bản chất của sinh vật cũng như điều kiện môi trường.

Bảng 1: Sản lượng hydro của một số loài thuộc chi *Clostridium*

Cơ chất	Vi sinh vật	Sản lượng H ₂
Tinh bột sắn	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	2,41 mol H ₂ /mol glucoza
Tinh bột ngô	<i>Clostridium pasteurianum</i>	194 mL H ₂ /g tinh bột
Tinh bột khoai tây	<i>Clostridium butyricum</i>	2,4 mol H ₂ /mol glucoza
Tinh bột	<i>Clostridium butyricum</i>	1,9 mol H ₂ /mol glucoza
Tinh bột ngô	<i>Clostridium butyricum</i>	390 mL H ₂ /g tinh bột
Tinh bột	<i>Clostridium amygdalinum</i> C9	2,6 mol H ₂ /mol glucoza
Tinh bột mì	<i>Clostridium beijerinckii</i>	90 L H ₂ /g tinh bột

Theo Leena B và cộng sự, chủng *Clostridium* sp. DMHC-10 cho sản lượng hydro 3,35 mol H₂/mol glucoza tại điều kiện nhiệt độ 37⁰ C, pH 7 (Kamalaskar L.B. và cộng

sự; 2010). Vi khuẩn kỵ khí bắt buộc như *Clostridium beijerincki* AM21B có thể tạo ra hydro với hàm lượng 1,8 đến 2,0 mol H₂/mol glucoza (Taguchi F. và cộng sự; 1992). Theo Dan An và cộng sự *Clostridium beijerinckii* YA001 cũng là chủng đã được chứng tỏ có khả năng sinh ra hydro với sản lượng cao, đạt 2,31 mol/mol xyloza tại điều kiện pH 8,0, nhiệt độ 40°C (An D. và cộng sự; 2014). Hiện đã phân lập được chủng *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 có hiệu suất sản sinh hydro vượt trội, cụ thể là trong điều kiện nuôi cấy theo mẻ có thể cho sản lượng hydro cao nhất đạt 4.628 tới 7.627 mL H₂/L với cơ chất là rác thải nông nghiệp đã qua xử lý, bao gồm cám gạo, cám gạo loại đầu, tinh bột cây cọ và chất thải từ nhà máy sản xuất dầu cọ (Vendruscolo F.; 2015), chủng này đang được chú ý là ứng viên trong việc lên men sản xuất hydro. *Clostridium acetobutylicum* cho sản lượng 2,41 mol H₂/mol glucoza khi sử dụng nguồn cơ chất là tinh bột sắn (Vendruscolo F.; 2015). Kết quả này cho thấy các chủng *Clostridium* sp. có thể được ứng dụng để sản xuất hydro trên nguồn cơ chất xenluloza và hemixenluloza có nhiều trong sinh khối cũng như rác thải nông nghiệp (Vendruscolo F.; 2015).

Tuy nhiên, với sản lượng hydro thu được này vẫn chưa đủ để lên men sản xuất hydro trên cơ sở nguồn sinh khối khác nhau với hiệu quả thu hồi hydro vượt trội. Do đó, cần có các chủng vi sinh vật có khả năng sản sinh ra hydro với hiệu suất cao cũng như quy trình lên men sản xuất hydro đơn giản, có khả năng ứng dụng để lên men thu hydro từ các nguồn sinh khối nông nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết vấn đề nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men sinh tổng hợp hydro và quy trình lên men sản xuất hydro sinh học bằng chủng vi khuẩn này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5, trong đó chủng vi khuẩn này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1 và được lưu giữ tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội với số lưu giữ ST5.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình lên men sản xuất hydrosinh học, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men bằng cách cấy chủng vi khuẩn gốc có số lưu giữ ST5 tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên vào môi trường PY đã được sục khí N₂ để loại bỏ không khí và tiến hành nuôi cấy ở 37°C, trong điều kiện tối, kỵ khí, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ, thu được chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 hoạt hóa;

b) chuẩn bị môi trường sản xuất bằng cách pha loãng môi trường chứa bột bã sắn với nước cất theo tỷ lệ ¼ (w/w), sau đó xử lý nhiệt 90°C trong 15 phút, hoặc môi trường bông rượu được chỉnh về pH về khoảng 6,5-7 bằng NaOH 10M, sau đó hấp khử trùng ở 120°C trong 15 phút, sau khi để nguội, sục khí N₂ để loại bỏ oxy, thu được môi trường sản xuất; và

c) lên men sản xuất và thu hồi hydro bằng cách cấy chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 hoạt hóa thu được ở bước a) vào bình kín chứa môi trường sản xuất thu được ở bước b) theo tỷ lệ từ 10 đến 20% thể tích ở 37°C, trong điều kiện tối, kỵ khí, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ, khí sinh ra trong quá trình sản xuất được thu hồi và chuyển qua thiết bị tách thu hồi hydro.

Theo một phương án ưu tiên của quy trình, trong đó chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 được sử dụng để lên men là chủng vi khuẩn có số lưu giữ ST5 tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1.

Theo một phương án ưu tiên khác, trong đó chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 được cấy vào môi trường hoạt hóa và môi trường sản xuất trong điều kiện dùng khí N₂ để tạo môi trường kỵ khí.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là đặc điểm hình thái tế bào của chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5, trong đó (A) là ảnh chụp khuẩn lạc trên bề mặt môi trường thạch (B) là ảnh nhuộm Gram, và (C) là ảnh chụp qua kính hiển vi điện tử (SEM) với độ phóng đại 15.000 lần.

Hình 2 là kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra gen 16S của chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 trên gel agarosa.

Hình 3 là kết quả thử nghiệm về khả năng sinh trưởng và sản sinh khí hydro của chủng *Clostridium butyricum* ST5 trên một số nguồn cơ chất.

Hình 4 là kết quả thực nghiệm đánh giá về khả năng sản sinh hydro của chủng *Clostridium butyricum* ST5 so với chủng đối chứng *Clostridium beijerinckii* NBRC trên nền cơ chất là bột bã sắn và bồng rệu.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo giải pháp hữu ích, môi trường PY được sử dụng chỉ môi trường bao gồm pepton (10 g/l), bột chiết nấm men (10 g/l), glucoza (10 g/l), reazurin (1mg/l), dung dịch muối (40 mL/l) và nước đủ 1 lít.

Trong đó dung dịch muối bao gồm KH_2PO_4 (1 g/l), K_2HPO_4 (1 g/l), NaHCO_3 (10 g/l), NaCl (2 g/l), CaCl_2 (0,2 g/l), MgSO_4 (0,2 g/l).

Ngoài ra, để tạo môi trường thạch, môi trường PYA được bổ sung agar để tạo môi trường rắn dùng trong nuôi cấy, phân lập. Các môi trường này là đã biết và được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, tùy vào điều kiện, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn có thể bổ sung thêm các thành phần cacbon, nitơ v.v., để tạo ra các môi trường tối ưu để nuôi cấy, phân lập chủng vi khuẩn theo giải pháp hữu ích.

Điều kiện kỵ khí theo giải pháp hữu ích chỉ điều kiện không có mặt của oxy, cụ thể trong điều kiện nuôi cấy kỵ khí, khi đó lượng oxy trong môi trường nuôi cấy được loại bỏ và quá trình nuôi cấy không cung cấp oxy. Điều kiện này tốt nhất được thực hiện trong môi trường kín và thường sử dụng khí nitơ để loại bỏ oxy có trong môi trường.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men sinh tổng hợp hydro và quy trình lên men sản xuất hydro sinh học bằng chủng vi khuẩn này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5, chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 này được phân lập từ dạ dày bò như sau:

Mẫu thức ăn thu được từ dạ dày bò được pha loãng trong nước cất, tiền xử lý mẫu bằng cách gia nhiệt đến 80°C trong 30 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng, sau đó cấy vào môi trường PY trong điều kiện sục khí nitơ. Thời gian nuôi cấy trong 48 giờ, nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc. Quá trình nuôi cấy này được lặp lại 3 lần. Sau đó cấy trải trên môi trường PYG, chọn các khuẩn lạc lớn, hình sò điệp, kích thước từ 0,2-0,7 mm, màu trắng đục.

Các khuẩn lạc này được tiến hành sàng lọc, tuyển chọn về khả năng sản sinh ra hydro trong môi trường nuôi cấy chuẩn, kết quả cuối cùng tuyển chọn được chủng vi khuẩn (đặt tên là ST5) có khả năng sinh trưởng và sản sinh ra hydro tối ưu.

Chủng vi khuẩn ST5 này được tiến hành xác định hình thái, đặc tính sinh trưởng, định danh theo khóa phân loại Bergey và xác định loài dựa trên việc giải trình tự 16S và so sánh với cây phân loại trên ngân hàng gen theo kết quả BLAST. Kết quả xác định được chủng vi khuẩn ST5 là chủng mới thuộc loài *Clostridium butyricum*. Hiện chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 được lưu giữ tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội với số lưu giữ ST5. Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình lên men sản xuất hydrosinh học, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men; b) chuẩn bị môi trường sản xuất; và c) lên men sản xuất và thu hồi hydro.

Trong bước chuẩn bị chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men, tiến hành bằng cách cấy chủng vi khuẩn gốc có số lưu giữ ST5 tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên vào môi trường PY đã được sục khí N₂ để loại bỏ không khí và tiến hành nuôi cấy ở 37°C, trong điều kiện tối, kỵ khí, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ, thu được chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 hoạt hóa.

Trong bước chuẩn bị môi trường sản xuất, tiến hành pha loãng nguyên liệu đến nồng độ thích hợp. Nguyên liệu dùng để tạo môi trường lên men sản xuất là phụ phẩm

của ngành chế biến nông sản, thực phẩm. Theo giải pháp hữu ích, nguyên liệu dùng để chuẩn bị môi trường sản xuất là bột bã sắn, là phụ phẩm của quá trình sản xuất tinh bột sắn, hoặc bã rượu, là phụ phẩm của quá trình sản xuất rượu.

Đối với nguyên liệu là bột bã sắn, bột bã sắn được hòa với nước theo tỷ lệ $\frac{1}{4}$ (w/w), tốt nhất là nhiệt độ của nước nằm trong khoảng từ 60-70°C. Trong quá trình hòa nguyên liệu với nước, có khuấy trộn, tiếp đến gia nhiệt đến 90°C trong 15 phút để tinh bột có trong nguyên liệu chuyển thành dạng hồ, thích hợp để vi khuẩn sử dụng lên men.

Đối với nguyên liệu là bã rượu, do bã rượu có pH axit nên không tối ưu cho chủng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển. Do đó, bã rượu được chỉnh về pH khoảng 6,5-7 bằng NaOH 10M. Tiếp đến, hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút thu được môi trường sản xuất.

Môi trường sau khi chuẩn bị được chuyển vào bình lên men, sục khí N₂ để loại bỏ oxy và làm nguội, thu được môi trường sản xuất.

Trong bước lên men sản xuất và thu hồi hydro, bổ sung chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 đã được hoạt hóa ở trên vào bình lên men chứa môi trường sản xuất thu được ở trên theo tỷ lệ từ 10 đến 20% thể tích ở 37°C. Trong quá trình bổ sung, sử dụng khí N₂ để tạo môi trường kỵ khí. Tiếp đó, bình lên men được giữ trong điều kiện tối, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Trong quá trình lên men, khí sinh ra trong quá trình sản xuất được thu hồi và chuyển qua thiết bị tách để thu hồi hydro. Quá trình lên men kết thúc khi không còn khí sản sinh.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân lập, xác định hình thái, đặc tính và định danh chủng vi khuẩn được phân lập

Mẫu để phân lập vi khuẩn sản sinh hydro là mẫu thu được từ dạ dày bò ngay sau khi mổ, mẫu này được pha loãng trong nước cất theo tỷ lệ 1/5 và được gia nhiệt ở 80°C trong 30 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng. Tiếp đó bổ sung 8ml môi trường PY vào bình kín 15 ml có nắp cao su và nắp nhôm bảo vệ. Tiếp đó sục khí N₂ để loại bỏ oxy để tạo môi trường kỵ khí đến khi môi trường trở nên trong suốt và cấy 0,8 ml môi

trường đã được xử lý nhiệt trong khí sục khí N_2 và nuôi cấy ở $37^\circ C$, tốc độ lắc 200 vòng/phút.

Sau 48 giờ, lấy mẫu cấy trên bề mặt môi trường PYA và nuôi trong tủ cấy kỵ khí. Tiếp đó sàng lọc và thu các khuẩn lạc có dạng hình sò, kích thước từ 0,2 đến 0,7 mm, màu trắng. Chọn lọc các khuẩn lạc có đường kính lớn nhất. Kết quả thu được 01 khuẩn lạc có đường kính 7mm, ký hiệu là ST5 (Hình 1.a).

Để xác định đặc tính sinh lý, sinh hóa và hình thái, tiến hành xác định khả năng sinh bào tử, nhuộm Gram, thử hoạt tính catalaza, khả năng di động, khả năng sinh indol, hoạt tính lecithinase, urease, khả năng sử dụng xitrat, oxidase v.v. theo khóa phân loại Bergey.

Xác định khả năng sinh bào tử bằng phương pháp sốc nhiệt, trong đó chủng ST5 được nuôi trong môi trường PY 2 ngày, sau đó dịch nuôi cấy được ủ trong bể ổn nhiệt ở $85^\circ C$ trong 15 phút, sau đó được đưa nuôi cấy trên môi trường PY. Kết quả cho thấy, chủng ST5 có khả năng sinh bào tử do có khả năng phát triển trở lại trên môi trường PY sau khi sốc nhiệt.

Tiến hành nhuộm Gram chủng ST5, kết quả được thể hiện trên Hình 1.b cho thấy chủng ST5 thuộc nhóm Gram dương.

Thử hoạt tính catalaza bằng cách lấy khuẩn lạc đã được nuôi trong 24 giờ đặt lên lam kính sạch và nhỏ 2 giọt H_2O_2 30% phủ lên vi khuẩn và quan sát tạo thành bọt khí. Kết quả cho thấy chủng ST5 âm tính với catalaza.

Thử nghiệm khả năng di động bằng cách cấy khuẩn lạc vào trong môi trường thạch mềm (0,5% agar) trong ống nghiệm với khoảng 2/3 độ dài thạch. Ủ ở $37^\circ C$ trong 24 giờ. Kết quả cho thấy chủng ST5 làm cho môi trường thạch bị đục, sinh trưởng lan ra khỏi vết cấy. Điều này có thể kết luận rằng chủng ST5 có khả năng di động.

Thử nghiệm khả năng sinh indol trên nền thuốc thử Kovac, do vi khuẩn sản sinh enzym tryptophanase thì có khả năng thủy phân axit amin tryptophan sinh indol, axit pyruvic và NH_3^+ . Indol sinh ra sẽ kết hợp với nhóm (CHO)- của p-dimethylaminobenzaldehyd có trong thuốc thử Kovac hình thành nên phức hợp màu đỏ. Kết quả cho thấy rằng chủng ST5 không có khả năng sản sinh ra indol.

Thử nghiệm hoạt tính lecithinaza bằng cách trộn lòng trắng trứng với cùng trọng lượng nước muối sinh lý tạo thành dịch huyền phù. Lấy 10ml dịch huyền phù trên hòa tan vào môi trường thạch-pepton đã khử trùng và đổ vào đĩa petri. Cấy vi khuẩn thành điểm trên đĩa thạch đặt ở 37°C. Kết quả cho thấy chủng ST5 âm tính với lecithinaza.

Thử nghiệm ureaza trên cơ sở ure là diamit của axit carbonic dễ bị thủy phân bởi enzyme ureaza tạo thành amoniac và cacbon dioxit, chất chỉ thị pH là phenol đỏ. Kết quả cho thấy chủng ST5 âm tính với ureaza.

Thử nghiệm khả năng đồng hóa xitrat trên cơ sở vi sinh vật sử dụng xitrat sinh CO₂ làm kiềm môi trường. Vi sinh vật sử dụng muối amonium là nguồn đạm duy nhất tạo ra NH₃ làm kiềm hóa môi trường. Kết quả cho thấy chủng ST5 âm tính với khả năng đồng hóa xitrat.

Thử nghiệm oxidaza trên cơ sở thuốc thử tetramethyl p-phenylenediamin dihydrochlorit. Kết quả cho thấy chủng ST5 âm tính với oxidaza.

Thử nghiệm VP là thử nghiệm nhằm phát hiện vi sinh vật tạo sản phẩm trung tính (axetoin) trong quá trình lên men glucoza. Axetoin được tạo ra trong điều kiện kỵ khí hoàn toàn. Kết quả cho thấy chủng ST5 âm tính với thử nghiệm VP.

Kết quả được dùng để định danh chủng ST5 theo khóa phân loại Bergey. Kết quả cho thấy chủng ST5 thuộc chi *Clostridium*.

Để định danh chủng ST5 thuộc chi *Clostridium*, tiến hành giải trình tự đoạn gen 16S ADN.

ADN của chủng ST5 được chiết và tinh sạch bằng kit “Magpure Bacteria DNA Kit” của ANABIO Research & Development. PCR chuẩn để khuếch đại đoạn 16S ADN với cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 đặc trưng cho *Clostridium* sau:

27F 5'-AGAGTTTGATAMTGGCTCAG-3' SEQ ID. NO.2

1527R 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3' SEQ ID NO.3

Sản phẩm sau PCR được điện di kiểm tra bằng gel agaroza 1%, so sánh với thang ADN chuẩn 1kb, được nhuộm bởi EtBr và được quan sát bằng ánh sáng UV. Kết quả được thể hiện trên Hình 2.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit “Anapure PCR product” của ANABIO Research & Development theo hướng dẫn của nhà sản xuất để giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động. Kết quả được so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen của NCBI (GenBank). Kết quả cho thấy chủng ST5 thuộc loài *Clostridium butyricum*.

Trình tự ADN của chủng *Clostridium butyricum* ST5 được đăng ký trên geneBank với mã số MF125285 ngày 19/05/2017.

Chủng *Clostridium butyricum* ST5 được lưu giữ tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội với số lưu giữ ST5 trong môi trường chuẩn trong nitơ lỏng, nhiệt độ -30°C.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng lên men bởi chủng *Clostridium butyricum* ST5

Chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 được lấy từ chủng gốc được bảo quản trong ống nghiệm được hoạt hóa bằng cách cấy vào môi trường PY đã được sục khí N₂ để loại bỏ không khí và tiến hành nuôi cấy ở 37°C, trong điều kiện tối, kỵ khí, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ, thu được chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 hoạt hóa.

Lấy 80 ml từng loại môi trường chứa 10% nguồn cacbon (glucoza, sucroza, lactoza, xyloza và ri đường) cho vào bình 150 ml có nút kín, sau đó sục khí N₂ để loại bỏ hết oxy có trong môi trường nhằm tạo môi trường kỵ khí, khi môi trường trở nên trong suốt, tiến hành cấy 8ml môi trường PY chứa chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 hoạt hóa ở trên, tiếp đó chuyển sang bể lắc ổn nhiệt và nuôi cấy ở 37°C trong 48 giờ trong điều kiện tối. Tổng lượng khí sinh ra được xác định theo phương pháp thay thế nước (water displacement method). Thành phần khí được xác định trên máy sắc ký GC-8A (SHIMADZU) và lượng khí hydro sinh ra được xác định theo công thức:

$$Y_{H_2} = A.V \text{ (mL/L)}$$

(với A là phần trăm khí hydro, V là tổng thể tích khí sinh ra)

Xác định khả năng sinh trưởng của vi khuẩn bằng đo mật độ quang tế bào bằng phương pháp quang phổ bước sóng (optical density –OD₆₀₀) đo bằng máy đo OD.

Kết quả được thể hiện trên Hình 3, theo đó cho thấy glucoza, sucroza và lactoza là 3 nguồn cơ phù hợp cho quá trình lên men sản xuất hydro đối với chủng *C. butyricum* ST5. Trong đó sucroza là nguồn cơ chất phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và sinh khí hydro với sản lượng hydro đạt $606,4 \pm 2,08$ mL/L, giá trị OD600 đạt $1,094 \pm 0,034$. Rỉ đường cho thấy khả năng sinh trưởng và sinh khí hydro thấp nhất, sản lượng hydro chỉ đạt $13,4 \pm 2,68$ mL/L, giá trị OD là $0,42 \pm 0,013$, vì vậy rỉ đường không phải là nguồn cơ chất phù hợp cho quá trình lên men sản xuất hydro bởi chủng *Clostridium butyricum* ST5.

Ví dụ 3: So sánh hiệu suất lên men sản xuất hydro sinh học bởi chủng *Clostridium butyricum* ST5 và chủng thương mại *Clostridium beijerinckii* NBRC 109359.

Để so sánh hiệu quả lên men sản xuất hydro trên nền cơ chất bột bã sắn và bồng rệu, tiến hành thử nghiệm so sánh với chủng thương mại *Clostridium beijerinckii* NBRC 109359, là chủng có hiệu suất sản sinh hydro cao.

Nguyên liệu là bột bã sắn, bột bã sắn được hòa với nước theo tỷ lệ $\frac{1}{4}$ (w/w) ở nhiệt độ 60°C . Trong quá trình hòa nguyên liệu với nước, có khuấy trộn, tiếp đến gia nhiệt đến 90°C trong 15 phút.

Nguyên liệu bồng rệu được chỉnh pH=7 bằng NaOH 10M. Tiếp đến, hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

Chủng *Clostridium beijerinckii* NBRC 109359 là chủng thương mại được mua từ ngân hàng gen NITE của Nhật Bản, được hoạt hóa theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Chủng *Clostridium butyricum* ST5 được hoạt hóa như nêu trong Ví dụ 2.

Nguyên liệu sau khi được xử lý sơ bộ, được sục khí N_2 và tiến hành nuôi cấy với các điều kiện như nêu trong Ví dụ 2 đối với từng chủng và từng loại môi trường. Các thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Trong bước lên men sản xuất và thu hồi hydro, bổ sung chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 đã được hoạt hóa ở trên vào bình lên men chứa môi trường sản xuất thu được ở trên theo tỷ lệ từ 10 đến 20% thể tích ở 37°C . Trong quá trình bổ sung, sử dụng khí N_2 để tạo môi trường kỵ khí. Tiếp đó, bình lên men được giữ trong điều kiện tối, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ. Trong quá trình lên men, khí

sinh ra trong quá trình sản xuất được thu hồi và chuyển qua thiết bị tách để thu hồi hydro. Quá trình lên men kết thúc khi không còn khí sản sinh.

Kết quả được thể hiện trên Hình 4. Theo đó cho thấy sản lượng hydro thu được từ chủng *Clostridium butyricum* ST5 ở cả hai nguồn cơ chất là bột bã sắn và bã rượu đều cao, đạt tới $895,2 \pm 5,6$ mL/L đối với bột bã sắn và $636,98 \pm 5,64$ mL/L đối với bã rượu. Kết quả này cao hơn hẳn so với kết quả thu được từ chủng *Clostridium butyricum beijerinckii* NBRC 109359. Điều này cho thấy rằng chủng *Clostridium butyricum* ST5 theo giải pháp hữu ích có ý nghĩa về mặt khoa học và cả lợi ích về mặt kinh tế có thể ứng dụng để lên men sản xuất hydro từ nguồn cơ chất rẻ tiền và dễ kiếm như một số phế phẩm nông nghiệp.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

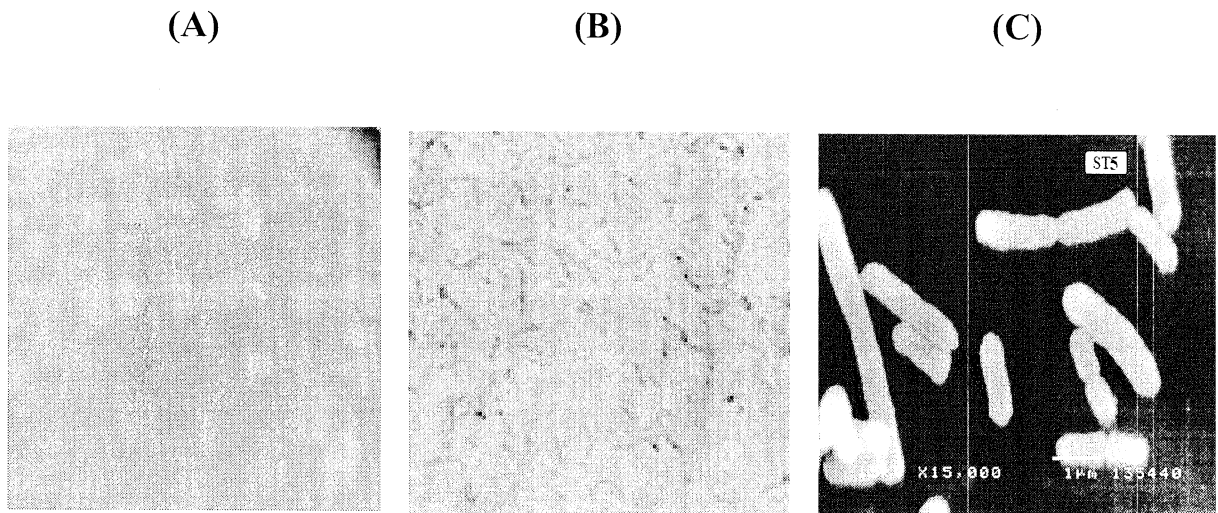
Chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 theo giải pháp hữu ích được phân lập từ dạ dày bò có khả năng lên men sản xuất hydro với nhiều nguồn cơ chất khác nhau như sucroza, glucoza, lactoza với hiệu suất sản sinh ra khí hydro cao. Đặc biệt, chủng vi khuẩn này có thể lên men đối với nguồn cơ chất như bột bã sắn, bã rượu để sản xuất ra hydro vừa giúp xử lý nguồn phế thải vừa giúp tăng hiệu quả thu hồi hydro làm nguồn năng lượng tái tạo.

Quy trình lên men sản xuất hydro đơn giản, cho phép lên men nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau và có thể lên men khép kín trên quy mô lớn. Ngoài ra, quy trình sử dụng chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 giúp hiệu suất lên men được cải thiện, mở ra một hướng mới, cho phép phát triển ngành công nghiệp xanh, tạo ra năng lượng tái tạo giúp giảm ô nhiễm môi trường.

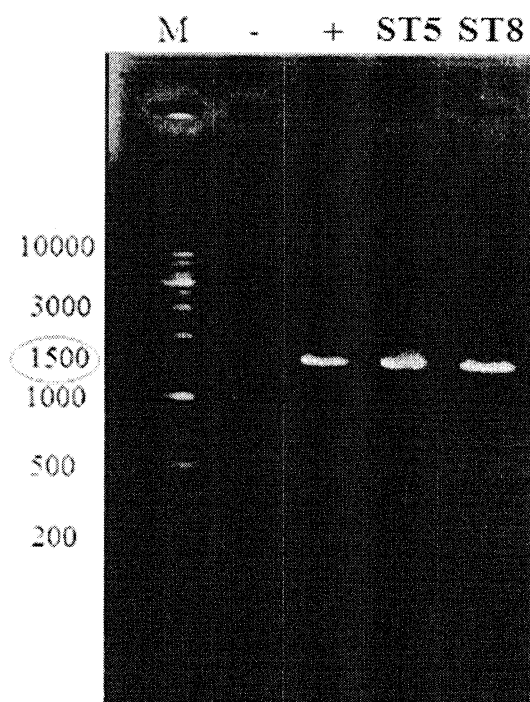
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men sinh tổng hợp hydro trong điều kiện tối, trong đó chủng vi khuẩn này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1 và có số lưu giữ ST5 tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
2. Quy trình lên men sản xuất hydro sinh học, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - a) chuẩn bị chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 lên men bằng cách cấy chủng vi khuẩn gốc có số lưu giữ ST5 tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên vào môi trường PY đã được sục khí N₂ để loại bỏ không khí và tiến hành nuôi cấy ở 37°C, trong điều kiện tối, kỵ khí, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ, thu được chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 hoạt hóa;
 - b) chuẩn bị môi trường sản xuất bằng cách pha loãng môi trường chứa bột bã sắn với nước cất theo tỷ lệ ¼ (w/w), sau đó xử lý nhiệt 90°C trong 15 phút, hoặc môi trường bồng rụu được chỉnh về pH về khoảng 6,5-7 bằng NaOH 10M, sau đó hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút, sau khi để nguội, sục khí N₂ để loại bỏ oxy, thu được môi trường sản xuất; và
 - c) lên men sản xuất và thu hồi hydro bằng cách cấy chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 hoạt hóa thu được ở bước a) vào bình kín chứa môi trường sản xuất thu được ở bước b) theo tỷ lệ từ 10 đến 20% thể tích ở 37°C, trong điều kiện tối, kỵ khí, lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 48 giờ, khí sinh ra trong quá trình sản xuất được thu hồi và chuyển qua thiết bị tách thu hồi hydro.
3. Quy trình theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 được sử dụng để lên men là chủng vi khuẩn có số lưu giữ ST5 tại Bảo tàng vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.1.
4. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 được cấy vào môi trường hoạt hóa và môi trường sản xuất trong điều kiện dùng khí N₂ để tạo môi trường kỵ khí.

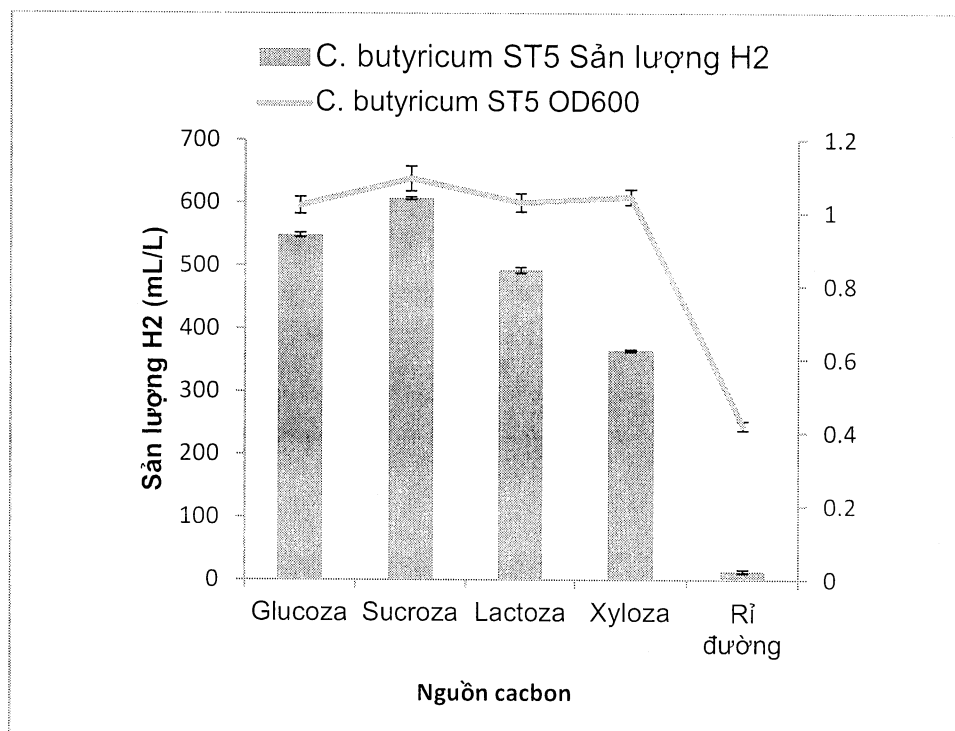
HÌNH 1



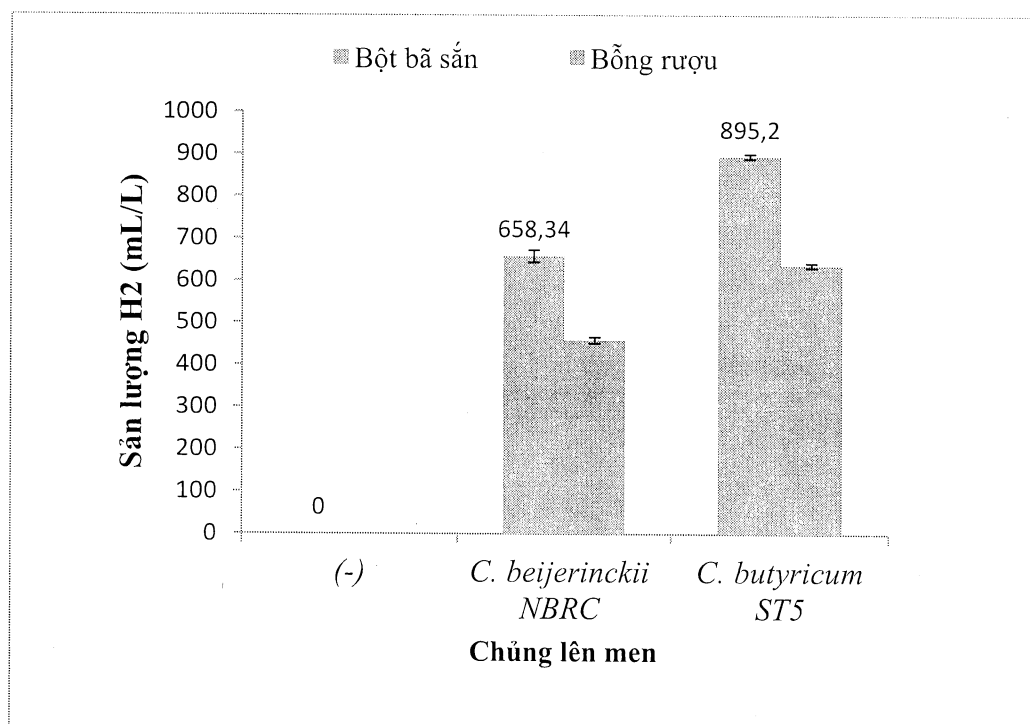
HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
- <120> Chủng vi khuẩn *Clostridium butyricum* ST5 và quy trình lên men
sản xuất hydro sinh học bởi chủng này
- <130>
- <160> 3
- <170>
- <210> 1
- <211> 917
- <212> ADN
- <213> *Clostridium butyricum* ST5
- <220>
- <223> 16S
- <220>
- <400> 1
- | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| TTAAATGCAG | TCGAGCGATG | AAGCTCCTTC | GGGAGTGGAT | TAGCGGCGGA | CGGGTGAGTA | 60 |
| ACACGTGGGT | AACCTGCCTC | ATAGAGGGGA | ATAGCCTTTC | GAAAGGAAGA | TTAATACCGC | 120 |
| ATAAGATTGT | AGTACCGCAT | GGTACAGCAA | TTAAAGGAGT | AATCCGCTAT | GAGATGGACC | 180 |
| CGCGTCGCAT | TAGCTAGTTG | GTGAGGTAAC | GGCTCACCAA | GGCGACGATG | CGTAGCCGAC | 240 |
| CTGAGAGGGT | GATCGGCCAC | ATTGGGACTG | AGACACGGCC | CAGACTCCTA | CGGGAGGCAG | 300 |
| CAGTGGGGAA | TATTGCACAA | TGGGGGAAAC | CCTGATGCAG | CAACGCCGCG | TGAGTGATGA | 360 |
| CGGCCTTCGG | ATTGTAAAAC | TCTGTCTTTG | GGGACGATAA | TGACGGTACC | CAAGGAGGAA | 420 |
| GCCACGGCTA | ACTACGTGCC | AGCAGCCGCG | GTAATACGTA | GGTGGCAAGC | GTTGTCCGGA | 480 |
| TTTACTGGGC | GTAAAGGGAG | CGTAGGTGGA | TATTTAAGTG | GGATGTGAAA | TACTCGGGCT | 540 |
| TAACCTGGGT | GCTGCATTCC | AAACTGGATA | TCTAGAGTGC | AGGAGAGGAA | AGGAGAATTC | 600 |
| CTAGTGTAGC | GGTGAAATGC | GTAGAGATTA | GGAAGAATAC | CAGTGGCGAA | GGCGCCTTTC | 660 |
| TGGACTGTAA | CTGACACTGA | GGCTCGAAAG | CGTGGGGAGC | AAACAGGATT | AGATACCCTG | 720 |
| GTAGTCCACG | CCGTAAACGA | TGAATACTAG | GTGTAGGGGT | TGTCATGACC | TCTGTGCCGC | 780 |
| CGCTAACGCA | TTAAGTATTC | CGCCTGGGGA | GTACGGTCGC | AAGATTAAAA | CTCAAAGGAA | 840 |
| TTGACGGGGG | CCCGCACAAG | CAGCGGAGCA | TGTGGTTTAA | TTCGAAGCAA | CGCGAAGAAC | 900 |
| CTTACCTAGA | CTTGACA | | | | | 917 |
- <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 2

AGAGTTTGATAMTGGCTCAG

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 3

AAAGGAGGTGATCCAGCC