

# NÂNG CAO HIỆU QUẢ SẢN XUẤT NHỰA SINH HỌC POLYHYDROXYBUTYRATE TỪ GLYCEROL THÔ BẰNG CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* PHB-08

Tạ Doãn Thành<sup>1,4</sup>, Chiang Chung Jen<sup>2</sup>, Lưu Nguyễn Luận<sup>1</sup>, Đoàn Thị Trâm<sup>1,4</sup>, Chao Yun Peng<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Kỹ thuật Hóa học, Đại học Phùng Giáp, Đài Trung, Đài Loan (Trung Quốc)

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Xét nghiệm Y học và Công nghệ Sinh học, Đại học Y Trung Hoa, Đài Trung, Đài Loan (Trung Quốc)

<sup>3</sup>Khoa Nghiên cứu Y học, Bệnh viện Đại học Y khoa Trung Quốc, Đài Trung, Đài Loan (Trung Quốc)

<sup>4</sup>Ban Công nghệ Sinh học, Công ty AVATAACK, Tập đoàn Four Pillar, Đài Loan (Trung Quốc)

## TÓM TẮT

Nhựa có nguồn gốc từ dầu mỏ rất khó phân hủy và có khả năng gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến nền kinh tế biển Việt Nam nếu như không được kiểm soát hợp lý. Polyhydroxybutyrate (PHB) là một dạng nhựa sinh học có thể bị phân hủy bởi vi sinh vật và có tính năng tương đồng với các loại nhựa có nguồn gốc dầu mỏ. Chi phí sản xuất PHB đa phần được chi cho nguồn carbon đầu vào. Để tăng tính cạnh tranh của PHB trên thị trường nhựa, chủng *Escherichia coli* PHB-08 đã được phát triển với tính năng chuyển hóa glycerol thô – phụ phẩm chính của quá trình sản xuất dầu diesel sinh học – thành PHB. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men và ion magiê ( $Mg^{2+}$ ) lên quá trình lên men của chủng PHB-08 đã được khảo sát. Nồng độ tối ưu của cao nấm men và  $Mg^{2+}$  đã được sử dụng trong lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng (fed-batch), từ đó cải thiện tốc độ sản xuất PHB lên 25% (1,5 g/L.h). Trong 25 h lên men, khối lượng tế bào khô đạt được là  $48,4 \pm 2,8$  g/L, trong đó có chứa  $73,8 \pm 1,7\%$  (w/w) là PHB với năng suất là 0,33g PHB /g glycerol tiêu thụ. Kết quả của nghiên cứu cho thấy chủng *Escherichia coli* PHB-08 có tiềm năng hứa hẹn để phát triển nền tảng công nghệ sản xuất nhựa sinh học PHB từ glycerol thô quy mô công nghiệp.

*Từ khóa:* *Escherichia coli*, fed-batch, glycerol thô, nhựa sinh học, polyhydroxybutyrate.

## MỞ ĐẦU

Nhựa là vật liệu được sử dụng rộng rãi trong hoạt động sản xuất và đời sống hiện đại. Đa số các sản phẩm nhựa trên thị trường được sản xuất từ nguyên liệu hóa thạch. Tuy nhiên, nhựa có nguồn gốc từ nguyên liệu hóa thạch rất khó phân hủy, dễ dàng tích tụ trong chuỗi thức ăn gây ảnh hưởng xấu đến môi trường, đặc biệt đối với hệ sinh thái biển. Nền kinh tế Việt Nam với hơn 40% GDP đến từ biển sẽ chịu ảnh hưởng nghiêm trọng nếu ô nhiễm nhựa không được kiểm soát một cách hợp lý (Vũ Tuấn Hưng và Nguyễn Danh Nam, 2021).

Polyhydroxyalkanoate (PHA) là một dạng nhựa sinh học có khả năng phân hủy bởi vi sinh vật trong môi trường tự nhiên (đất và nước biển), tạo thành các phân tử cơ bản (nước và  $CO_2$ ). PHA có tiềm năng được sử dụng trong công nghiệp đóng gói nhờ đặc tính vật liệu tương tự như các loại nhựa truyền thống trên thị trường (polyethylene, polypropylene...) (Keskin *et al.*, 2017). Với xu hướng phát triển bền vững, các phân tích thị trường cho thấy thị phần nhựa sinh học trên thị trường nhựa được dự đoán sẽ đạt ngưỡng 40% vào năm 2030 (khoảng 324 tỷ USD) (Zhao *et al.*, 2020).

Polyhydroxybutyrate (PHB) là một dạng PHA phổ biến. Chi phí cho nguồn carbon đầu vào chiếm hơn 40% tổng chi phí sản xuất PHB (Kim, 2000). Do đó, việc lựa chọn nguồn carbon đầu vào rất quan trọng để PHB có thể cạnh tranh với các sản phẩm nhựa truyền thống. Với nồng độ carbon cao, glycerol thô – phụ phẩm chính của quá trình transester hóa trong sản xuất dầu diesel sinh học từ dầu thực vật, mỡ cá, mỡ động vật – rất thích hợp để làm nguồn nguyên liệu cho quá trình lên men sản xuất nhựa sinh học PHB. Việc tận dụng glycerol thô vừa làm tăng giá trị kinh tế của nhựa sinh học PHB, vừa làm tăng tính phát triển bền vững của công nghiệp sản xuất dầu diesel sinh học.

Dưới sự hợp tác của Tập đoàn Four Pillars và Đại học Phùng Giáp, Đài Loan (Trung Quốc), chúng tôi đã phát triển thành công chủng vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) PHB-08 để sản xuất PHB từ glycerol thô (Ta *et al.*, 2023). Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng PHB-08 trong lên men 29 h đã đạt tốc độ sản xuất trung bình là  $1,2 \pm 0,1$  g/L.h, tạo ra hàm lượng tế bào khô (CDW) là  $53,8 \pm 4,1$  g/L với PHB chiếm  $66,5 \pm 2,8\%$  (w/w) và đã tiêu thụ đến  $95,6 \pm 0,9\%$  lượng glycerol thô đầu vào.

Để tiếp tục nâng cao hiệu suất của quá trình sản xuất PHB từ glycerol thô, nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của thành phần cao nấm men và ion magiê ( $Mg^{2+}$ ) trong chất dinh dưỡng đối với quá trình lên men chủng PHB-08. Sau đó, kết quả tối ưu sẽ được sử dụng cho quá trình lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng (fed-batch).

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *E. coli* PHB-08 được Tập đoàn Four Pillars phát triển cùng với Đại học Phùng Giáp, Đài Loan (Trung Quốc) và hiện đang được lưu trữ tại bộ sưu tập chủng giống của Trung tâm Nghiên cứu và Sưu tập Tài nguyên Sinh học Đài Loan, Trung Quốc (BCRC) với mã số BCRC911222. Chủng PHB-08 này được nghiên cứu dựa trên chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp N31 (*P<sub>trc</sub>-gfp*,  $\lambda$ <sub>P<sub>R</sub></sub>-*gldA*,  $\lambda$ <sub>P<sub>R</sub></sub>-*dhak*) được tăng cường biểu hiện gen vận chuyển và hấp thụ glycerol thô (Chiang *et al.*, 2020). Các thay đổi ở kiểu gen của chủng PHB-08 so với N31 bao gồm:  $\lambda$ <sub>P<sub>R</sub></sub>-*zwf*,  $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*pgl*,  $\Phi$ 80:: $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*phaCAB*,  $\Delta$ *pta*,  $\lambda$ :: $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*phaCAB*, *lacO-gltA*, *P<sub>trc</sub>-pntAB*,  $\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*aceEF*,  $\text{HK}::\lambda$ <sub>P<sub>L</sub></sub>-*phaCAB* (Ta *et al.*, 2023).

### Môi trường dinh dưỡng

Glycerol thô trong nghiên cứu này được thu thập từ Công ty sản xuất dầu thực vật Yeow Hwa, Đài Loan. Hàm lượng glycerol trong glycerol thô là 60%. Môi trường lên men chủng PHB-08 được thay đổi dựa trên công thức môi trường muối tối giản M9, bao gồm: glycerol (20 g/L), cao nấm men (1 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (3 g/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,04 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g/L), NaCl (0,5 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,24 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,022 g/L), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (8 mg/L), Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·16H<sub>2</sub>O (1,31 mg/L), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,2 mg/L), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,1 mg/L), NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,2 mg/L), MnCl<sub>2</sub> (0,74 mg/L), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,07 mg/L), và H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (0,05 mg/L) (Yang *et al.*, 2019).

### Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần cao nấm men và ion Mg<sup>2+</sup>

Chủng *E. coli* PHB-08 được tiền nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB (5 mL) trong bình Erlenmeyer 125 mL ở 37°C và lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Dịch tiền nuôi cấy qua đêm sau đó được cấy chuyển vào các bình Erlenmeyer 125 mL chứa 20mL môi trường lên men với mật độ tế bào ban đầu tính theo OD<sub>550</sub> là 0,2. Cao nấm men được thêm vào môi trường dinh dưỡng để đạt các giá trị nồng độ cuối cùng khác nhau, bao gồm (g/L): 0, 0,5, 1, 1,5 và 2. Chủng *E. coli* PHB-08 được giữ trong tủ nuôi cấy ở 37°C và lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Giá trị OD<sub>550</sub> được đo vào các mốc thời gian 2, 4, 6, 8 và 24 h. Sau 24 h, dịch nuôi cấy được thu lại để xác định hàm lượng PHB và CDW. Việc khảo sát ảnh hưởng của ion Mg<sup>2+</sup> được thực hiện theo phương pháp tương tự. Nồng độ của Mg<sup>2+</sup> sẽ được điều chỉnh ở các giá trị khác nhau trong môi trường dinh dưỡng, bao gồm (mM): 1, 2 và 3. Nồng độ cao nấm men và Mg<sup>2+</sup> tối ưu sau khi được xác định sẽ được sử dụng trong công thức môi trường muối tối giản M9 cho phần thí nghiệm lên men fed-batch.

### Lên men fed-batch

Quá trình lên men 1L fed-batch được thực hiện ở trong thiết bị lên men 2L BioFlo®-120 và được điều khiển bởi hệ thống điều khiển BioFlo-120 (Eppendorf, Đức). Đầu dò hàm lượng oxy hòa tan (DO) và pH được mua từ Mettler Toledo, Mỹ. Điều kiện lên men được duy trì ở nhiệt độ 37°C và pH 7 sử dụng chất trung hòa 28% (v/v) NH<sub>4</sub>OH. Hàm lượng DO được duy trì tự động ở 10% và được điều khiển bởi tốc độ xoay của cánh khuấy. Lưu lượng không khí được bơm vào là 1vvm. Mật độ tế bào ban đầu đo ở OD<sub>550</sub> là 0,2. Tế bào sẽ được nuôi ở chế độ batch trong môi trường chứa công thức muối tối giản M9 với nồng độ cao nấm men và Mg<sup>2+</sup> tối ưu trong 10 h trước khi được cấp bổ sung dịch dinh dưỡng chứa 550 g/L glycerol thô. Công thức tính tốc độ cấp chất dinh dưỡng được dựa theo báo cáo trước đó (Yee, Blanch, 1992).

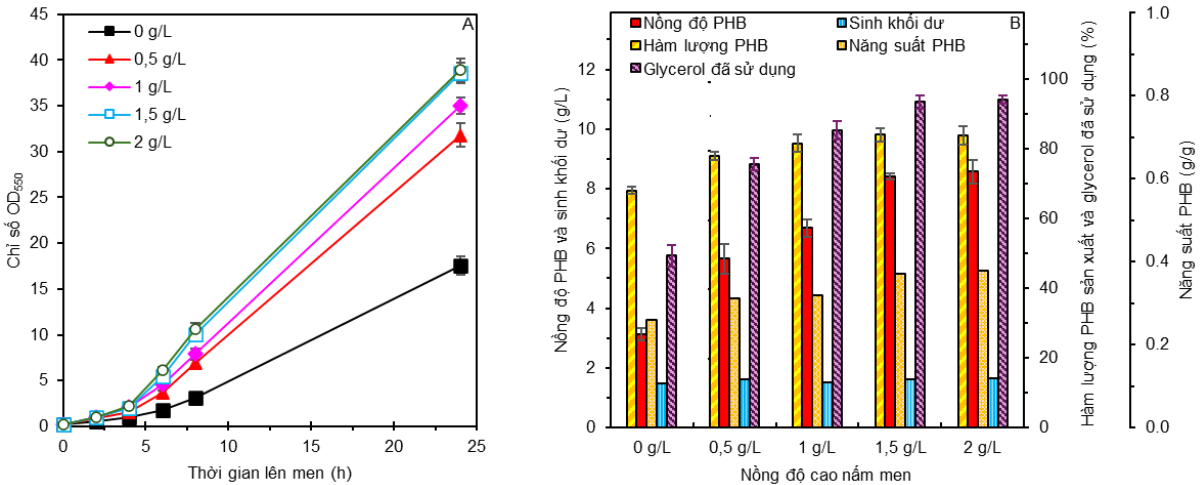
### Phương pháp xác định dư lượng glycerol, CDW, sinh khối dư, nồng độ PHB và năng suất PHB

Phương pháp xác định dư lượng glycerol, CDW và sinh khối dư được thay đổi dựa theo báo cáo trước đó (Cavalheiro *et al.*, 2009). Dư lượng glycerol (g/L) trong dịch lên men được đo bằng thiết bị Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột ICsep ICE-ION-300 (Transgenomic, Mỹ) và đầu đọc chỉ số khúc xạ. Nồng độ glycerol đã tiêu thụ được tính bằng hiệu nồng độ glycerol ban đầu (g/L) và dư lượng glycerol (g/L). Sinh khối sau thí nghiệm được ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi loại bỏ phần chất lỏng, sinh khối tế bào được rửa với nước cất. Quá trình trên được thực hiện ba lần, sau đó sinh khối tế bào được làm khô qua đêm ở nhiệt độ 60°C và được cân để xác định hàm lượng CDW (g/L) tính theo g trong một L dịch lên men. Sinh khối dư (g/L) được định nghĩa là lượng sinh khối tế bào khô không chứa PHB, tính bằng hiệu CDW (g/L) và nồng độ PHB (g/L). Nồng độ PHB (g/L) có trong tế bào được xác định sau khi được chuyển hóa thành axit crotonic, sử dụng thiết bị HPLC, cột loại trừ ion Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Mỹ) và đầu đọc cực tím (210 nm) (Ta *et al.*, 2023). Năng suất PHB (g/g) được tính bằng thương của nồng độ PHB (g/L) và nồng độ glycerol đã tiêu thụ (g/L).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB

Cao nấm men chứa nhiều axit amin, vitamin và khoáng chất quan trọng trong quá trình lên men vi sinh vật. Hình 1 biểu thị ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *E. coli* PHB-08.

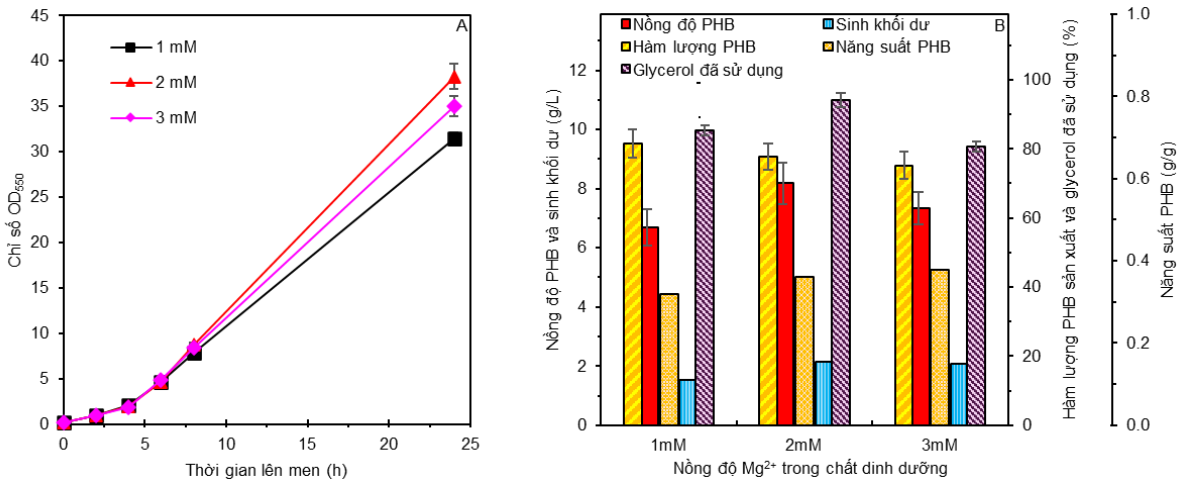


**Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men đến (A) đường cong sinh trưởng và (B) hiệu quả sản xuất PHB của chủng *E. coli* PHB-08 khi nuôi cấy trong bình Erlenmeyer 125mL có chứa 20 g/L glycerol**

Kết quả từ Hình 1 cho thấy cao nấm men giúp tăng cường khả năng hấp thụ glycerol của chủng PHB-08, từ 49,3±3,1% khi không sử dụng cao nấm men lên 94,1±1,2% khi sử dụng 2 g/L cao nấm men. Điều này đã giúp tăng đáng kể tốc độ sinh trưởng (Hình 1A) và khả năng tích lũy PHB trong tế bào (Hình 1B). Kết quả này có thể được giải thích bởi cao nấm men có khả năng tăng cường sức chịu đựng của vi sinh vật trong điều kiện môi trường dinh dưỡng có chứa thành phần gây ức chế sinh trưởng như ở trường hợp sử dụng glycerol thô (Huynh *et al.*, 2020). Bên cạnh đó trong thành phần của cao nấm men còn chứa nhiều axit amin, từ đó giảm đi lượng NADPH cần cho quá trình tổng hợp axit amin (Chen *et al.*, 2018). Lượng NADPH tiết kiệm được trong quá trình tổng hợp axit amin này có thể được sử dụng cho quá trình tổng hợp PHB, vốn là một quá trình phụ thuộc rất lớn vào trữ lượng NADPH nội bào. Kết quả cho thấy nồng độ PHB đã tăng từ 3,1±0,2 g/L khi không sử dụng cao nấm men lên 8,6±0,4 g/L khi sử dụng 2 g/L cao nấm men (Hình 1B). Trong nghiên cứu này, hiệu quả sản xuất PHB đạt mức bão hòa ở nồng độ cao nấm men 1,5 g/L. Kết quả thu được sau 24 h nuôi cấy là nồng độ PHB 8,4±0,6 g/L với hàm lượng PHB 84±1,2% và năng suất 0,44 g/g.

**Ảnh hưởng của nồng độ Mg<sup>2+</sup> đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB**

Việc tối ưu hóa nồng độ Mg<sup>2+</sup> trong môi trường nuôi cấy là cần thiết để đạt hiệu quả sản xuất PHB cao nhất. Hình 2 biểu thị ảnh hưởng của Mg<sup>2+</sup> đến sự sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *E. coli* PHB-08.



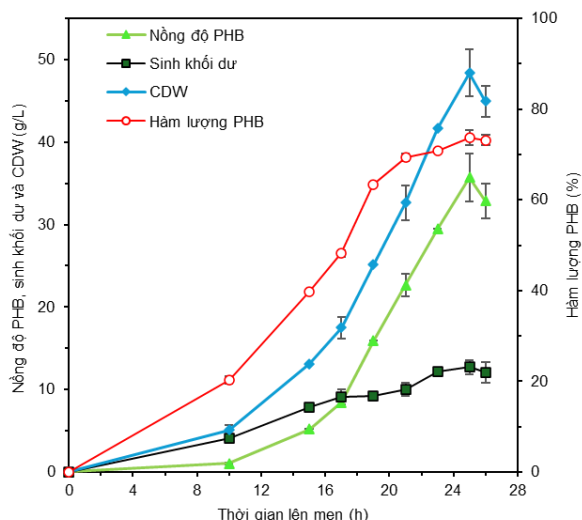
**Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ Mg<sup>2+</sup> đến (A) đường cong sinh trưởng và (B) hiệu quả sản xuất PHB của chủng *E. coli* PHB-08 khi nuôi cấy trong bình Erlenmeyer 125mL có chứa 20 g/L glycerol**

Trong sản xuất PHB, một chiến thuật lên men thường được sử dụng đó là hạn chế nguồn dinh dưỡng Mg<sup>2+</sup> để kích hoạt và tăng cường cho sự tích lũy PHB. Từ kết quả Hình 2 ta có thể thấy hàm lượng PHB đạt giá trị cao nhất (81,5±4,1%) tại nồng độ Mg<sup>2+</sup> thấp nhất (1 mM) trong khảo sát này. Tuy nhiên, Mg cũng là một nguyên tố vi lượng quan trọng trong sinh lý tế bào và chiếm khoảng 0,79% khối lượng tế bào khô của vi khuẩn *E. coli* (Moncany and Kellenberger, 1981). Điều này có nghĩa là nồng độ Mg<sup>2+</sup> trong chất dinh dưỡng sẽ quyết định số

lượng tế bào có thể đạt được trong quá trình lên men, từ đó nâng cao nồng độ PHB. Từ đường cong sinh trưởng (Hình 2A) ta có thể thấy nồng độ  $Mg^{2+}$  không ảnh hưởng đến tốc độ tăng sinh ban đầu nhưng lại ảnh hưởng đến sinh khối dư sau 24 h (Hình 2B). Lượng sinh khối dư đã tăng thêm 41% khi tăng nồng độ  $Mg^{2+}$  từ 1 mM lên 2 mM. Tuy nhiên khi tăng nồng độ  $Mg^{2+}$  từ 2 mM lên 3 mM, lượng sinh khối dư không có sự thay đổi đáng kể. Trong khảo sát này, nồng độ PHB cao nhất đã đạt được là  $8,2 \pm 0,7$  g/L sau khi nuôi cấy 24 h ở nồng độ  $Mg^{2+}$  2 mM với hàm lượng PHB đạt  $77,8 \pm 3,7\%$  và năng suất  $0,43$  g/g.

### Kết quả lên men fed-batch

Trong sản xuất PHB, lên men fed-batch thường được sử dụng để đạt hiệu quả sản xuất cao. Ở giai đoạn đầu (pha batch), chất dinh dưỡng được cung cấp với nồng độ cố định để vi khuẩn thích nghi và phát triển. Việc tối ưu hóa pha batch giúp tạo ra lượng sinh khối ban đầu ổn định về mặt số lượng cũng như về mặt sinh lý tế bào, tạo tiền đề cho giai đoạn tăng trưởng tiếp theo (pha feed). Ở pha feed, chất dinh dưỡng được bổ sung liên tục để duy trì nồng độ dinh dưỡng tối ưu cho vi khuẩn, giúp vi khuẩn tăng sinh khối theo hàm số lũy thừa dựa trên lượng sinh khối đã đạt được từ pha batch.



Hình 3. Kết quả quá trình lên men fed-batch của chủng PHB-08 sử dụng nồng độ cao nấm men và  $Mg^{2+}$  tối ưu

Hình 3 mô tả quá trình sản xuất PHB của chủng PHB-08 theo thời gian khi sử dụng môi trường với nồng độ cao nấm men và ion  $Mg^{2+}$  tối ưu (lần lượt là 1,5 g/L và 2 mM). Việc tối ưu hóa nồng độ cao nấm men và ion  $Mg^{2+}$  trong chất dinh dưỡng đã giúp tăng đáng kể tốc độ sinh trưởng và lượng sinh khối đạt được sau pha batch so với kết quả nghiên cứu trước đó (sử dụng 1 g/L cao nấm men và 1 mM  $Mg^{2+}$ ). CDW sau pha batch đã đạt  $5,07 \pm 0,6$  g/L, cao hơn khoảng 44,8% so với kết quả nghiên cứu trước đó dựa trên chủng PHB-08 (CDW  $3,5 \pm 0,5$  g/L). Ở pha feed, hiệu quả sản xuất PHB cao nhất đã đạt được sau 25 h lên men, với lượng CDW đạt  $48,4 \pm 2,8$  g/L trong đó có chứa  $73,8 \pm 1,7\%$  (w/w) là PHB và năng suất PHB là 0,33 g/g. So với kết quả đã công bố dựa trên chủng PHB-08, hàm lượng PHB và năng suất PHB đã tăng thêm khoảng 10%. Đặc biệt, tốc độ sản xuất PHB trung bình trong nghiên cứu này đã đạt 1,5 g/L.h, cao hơn 25% so với kết quả đã công bố trước đó (1,2 g/L.h) (Ta *et al.*, 2023). Tất cả những cải thiện này đã giúp nâng cao một cách tổng thể hiệu suất của quy trình sản xuất PHB. Cụ thể, việc tăng hàm lượng PHB giúp nâng cao hiệu quả và giảm lượng chất thải trong quá trình tách chiết PHB. Năng suất PHB tăng sẽ làm giảm chi phí nguyên liệu đầu vào, khi 1 g glycerol thô có thể tạo ra nhiều g PHB hơn. Tốc độ sản xuất trung bình được cải thiện đồng nghĩa với việc thời gian để sản xuất cùng một lượng PHB sẽ được giảm đi, kéo theo đó là lợi ích giảm thời gian vận hành máy móc và thời gian nhân công lao động.

### KẾT LUẬN

Từ việc tối ưu hóa môi trường lên men, chúng tôi đã cải thiện đáng kể quy trình sản xuất PHB sử dụng chủng *E. coli* tái tổ hợp PHB-08. Toàn bộ quá trình lên men được thực hiện trong 25 h với hàm lượng và năng suất PHB tăng 10% cùng với tốc độ sản xuất trung bình tăng 25% so với công bố trước đó. Nền tảng công nghệ từ việc phát triển chủng PHB-08 có thể được ứng dụng để tạo ra các dòng *E. coli* tái tổ hợp dùng trong sản xuất các loại nhựa PHA khác nhau. Bên cạnh đó, việc sử dụng các nguồn cơ chất giá rẻ khác cũng có thể được nghiên cứu và phát triển để đa dạng hóa nguồn nguyên liệu đầu vào nhằm đảm bảo tính bền vững của công nghệ sản xuất nhựa sinh học.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện tại Đại học Phùng Giáp, với sự hỗ trợ kinh phí bởi Hội đồng Khoa học và Công nghệ Quốc gia Đài Loan (Trung Quốc) (NSTC 112-2622-E-035-004), Đại học Y Trung Hoa Đài Loan (Trung Quốc) (CMU111-MF-79) và Tập đoàn Four Pillars Đài Loan (Trung Quốc).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cavalheiro JM, de Almeida MCM, Grandfils C, Da Fonseca M (2009). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process biochemistry*, 44(5), 509-515.
- Chen J, Li W, Zhang ZZ, Tan TW, Li ZJ (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of polyhydroxyalkanoates using acetate as a main carbon source. *Microb Cell Fact*, 17, 1-12.
- Chiang CJ, Ho YJ, Hu MC, Chao YP (2020). Rewiring of glycerol metabolism in *Escherichia coli* for effective production of recombinant proteins. *Biotechnol biofuels*, 13, 1-9.
- Vũ Tuấn Hưng và Nguyễn Danh Nam (2021). Định hướng và giải pháp phát triển bền vững kinh tế biển Việt Nam. *Tạp chí Khoa học xã hội Thành phố Hồ Chí Minh*(9 (277)), 13-29.
- Huynh D, Kaschabek SR, Schlömann M (2020). Effect of inoculum history, growth substrates and yeast extract addition on inhibition of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* by NaCl. *Res Microbiol*, 171(7), 252-259.
- Keskin G, Kızıl G, Bechelany M, Pochat-Bohatier C, Öner, M (2017). Potential of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers family as substitutes of petroleum based polymers for packaging applications and solutions brought by their composites to form barrier materials. *Pure Appl Chem*, 89(12), 1841-1848.
- Kim BS (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol*, 27(10), 774-777.
- Moncany M, Kellenberger E (1981). High magnesium content of *Escherichia coli* B. *Cell Mol Life Sci*, 37(8), 846-847.
- Ta DT, Chiang CJ, Huang ZX, Luu NL, Chao YP (2023). High production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* using crude glycerol. *Bioresour Technol*, 384, 129315.
- Yang H, Huang B, Lai N, Gu Y, Li Z, Ye Q, Wu H (2019). Metabolic engineering of *Escherichia coli* carrying the hybrid acetone-biosynthesis pathway for efficient acetone biosynthesis from acetate. *Microb Cell Fact*, 18, 1-9.
- Yee L, Blanch H (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol*, 10(12), 1550-1556.
- Zhao X, Cornish K, Vodovotz Y (2020). Narrowing the gap for bioplastic use in food packaging: an update. *Environ Sci Tech*, 54(8), 4712-4732.

## IMPROVING THE EFFICIENCY OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION FROM CRUDE GLYCEROL USING THE *ESCHERICHIA COLI* STRAIN PHB-08

Doan Thanh Ta<sup>1,4</sup>, Chung Jen Chiang<sup>2</sup>, Nguyen Luan Luu<sup>1</sup>, Thi Tram Doan<sup>1,4</sup>, Yun Peng Chao<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Feng Chia University, Taichung, Chinese Taipei

<sup>2</sup>Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, China Medical University, Taichung, Chinese Taipei

<sup>3</sup>Department of Medical Research, China Medical University Hospital, Taichung, Chinese Taipei

<sup>4</sup>Department of Biotechnology, AVATAACK Co., Ltd, Four Pillars Group, Chinese Taipei

### SUMMARY

Fossil-based plastics are non-biodegradable and could negatively affect the marine economy of Vietnam if not regulated properly. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable bioplastic and has similar characteristics to traditional fossil-based plastics. The production cost of PHB mainly comes from the carbon source. To increase the competitiveness of PHB in the plastic market, the *Escherichia coli* PHB-08 having the capability to convert crude glycerol – a main byproduct of biodiesel production – into PHB was developed. In this study, the effects of yeast extract and magnesium ( $Mg^{2+}$ ) on the fermentation of PHB-08 were investigated. The optimal concentration of yeast extract and  $Mg^{2+}$  was used to improve fed-batch fermentation, increasing PHB production rate by 25 % (1.5 g/L.h). In a 25 h fermentation, the obtained cell dried weight was 48.4 g/L, which contains 73.8 % (w/w) PHB with the yield of 0.33g PHB/g consumed glycerol. The outcomes of this study show a promising potential of the strain PHB-08 in the bioplastic industry.

**Keywords:** *Escherichia coli*, fed-batch, crude glycerol, bioplastic, polyhydroxybutyrate.

\* Author for correspondence: TEL: 886-4-24517250 ext. 3677; Fax: 886-4-24510890; E-mail: ypchao@fcu.edu.tw