



(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)



1-0026156

(51)⁷ C12N 1/00; C12N 9/00

(13) B

(21) 1-2014-02169

(22) 02/07/2014

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/09/2014 318A

(73) Viện Công nghệ sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đặng Thị Cẩm Hà (VN); Đào Thị Ngọc Ánh (VN); Mai Diệu Quỳnh (VN); Nguyễn Hoàng Tùng (VN); Đặng Trần Quang (VN).

(54) CHỦNG NẤM CERRENA SP. FBV41 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC VÀ
CHẾ PHẨM VI SINH ĐỂ XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG CHỨA DỊCH NUÔI CẤY
CHỦNG NẤM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng nấm *Cerrena* sp. FBV41 thuần khiết về mặt sinh học. Chủng *Cerrena* sp. FBV41 là chủng nấm đảm trắng có khả năng sinh tổng hợp enzym tham gia vào quá hình phân huỷ lignin trong tự nhiên là laccaza (Lac) có nhiều ứng dụng trong thực tế. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường chứa dịch nuôi cấy chủng nấm nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng nấm đảm trắng có khả năng sinh tổng hợp enzym tham gia vào quá trình phân huỷ lignin trong tự nhiên là laccaza (Lac) có nhiều ứng dụng trong thực tế. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường chứa dịch nuôi cấy chủng nấm nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Laccaza là enzym thuộc nhóm ligninolytic có phổ cơ chất không đặc hiệu, nên ngoài khả năng phân huỷ lignin, các enzym này còn có khả năng chuyển hóa nhiều hợp chất hữu cơ khó phân huỷ khác, các hợp chất này có thể chứa hoặc không chứa phenol. Tính chất này rất có ý nghĩa trong việc ứng dụng laccaza vào xử lý ô nhiễm môi trường bởi các chất đa vòng thơm halogen hay không chứa halogen, loại bỏ các chất gây hỏng hệ nội tiết, tiền xử lý nguồn nguyên liệu giàu lignin, xenluloza, hemixenluloza như rơm rạ, lá và thân cây. Laccaza ứng dụng có hiệu quả trong y dược như chất chống oxi hóa và kháng khuẩn, là các chất xúc tác cho quá trình tổng hợp thuốc trong đó có thuốc điều trị ung thư và nhiều loại thuốc khác, sản xuất cảm biến sinh học, sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm. Ngoài ra laccaza được cố định lên các vật liệu mang phù hợp sẽ có hoạt tính ổn định và kéo dài chu trình hoạt động, đây là tiềm năng to lớn mà nhiều nhà khoa học và công nghệ quan tâm để tìm kiếm vi sinh vật sinh tổng hợp laccaza cao từ tự nhiên. Các loài vi sinh vật thuần khiết sinh tổng hợp laccaza có hoạt tính cao sẽ được giải trình tự bộ gen thông qua đó sẽ có các thông tin không chỉ là các trình tự mã cho các gen laccaza mà các cơ chế sinh tổng hợp laccaza giả định cũng được làm sáng tỏ. Đây là những định hướng rất rõ ràng mà các nghiên cứu hướng tới trong tìm kiếm nguồn nguyên liệu di truyền từ các chủng vi sinh vật có hoạt tính laccaza cao. Chính vì vậy mà tìm kiếm và nghiên cứu enzym Lac được quan tâm nhiều nhất (Pérez và các đồng tác giả, 2002).

Đã có nhiều nghiên cứu vi sinh vật sinh tổng hợp Lac, phần lớn các nghiên cứu này đều tập trung vào nấm đảm, đặc biệt là nấm mục trắng do đặc tính phân huỷ gỗ. *Cerrena* là chi nấm đảm có một số đại diện có khả năng sinh laccaza, tuy nhiên các nghiên cứu hiện nay trên thế giới chưa nhiều. Một số chủng thuộc 2 loài *Cerrena unicolor* và *Cerrena maxima* được phân lập và chứng minh khả năng sinh tổng hợp laccaza nhiều nhất. *Cerrena unicolor* đã được chứng minh là có khả năng phân huỷ 36 % lignin trong môi trường nghèo nitơ trong 24 giờ. Hoạt tính Lac ban đầu của các chủng này không cao, tuy nhiên khi nuôi cấy trên môi trường có chất cảm ứng và thành phần phù hợp hoạt tính cao nhất đến nay được ghi nhận là 450.000 U/L ở quy mô 50 ml với chủng *C. unicolor* C-139 và 202.000 U/l ở quy mô 5 lít với chủng *Cerrena* sp.WR1.

Với sự phát triển công nghiệp nhanh chóng, việc ô nhiễm môi trường đặc biệt ở các nước đang phát triển là hệ lụy khó tránh khỏi. Laccaza đã được sử dụng để thử nghiệm khả năng loại màu thuốc nhuộm được sử dụng trong ngành công nghiệp dệt nhuộm, ngoài ra nó còn có khả năng phân huỷ một số loại hợp chất khó phân huỷ thường có mặt trong nước thải công nghiệp như anthracen, pyren, anthraquinon và các chất ô nhiễm khác v.v. (Eibes và các đồng tác giả, 2007; Jaqueline và các đồng tác giả, 2010; Hsu và các đồng tác giả, 2012). Laccaza từ *Cerrena unicolor* 137 đã được sử dụng để loại màu một số thuốc nhuộm thuộc nhóm azo và anthraquinon như Acid Blue 62 và Direct Black 22, phần lớn đều cần sự có mặt của mediator tham gia vào quá trình loại màu. Cho đến nay các nghiên cứu về khả năng loại màu cũng như xử lý sinh học (bioremediation) của laccaza từ một số loài thuộc chi *Cerrena* chưa được công bố nhiều so với các chi nấm đảm sinh laccaza khác. .

Dựa vào khả năng phân huỷ lignin và các hợp chất vòng thơm mà laccaza gần đây được quan tâm ứng dụng rất nhiều trong việc tham gia vào quá trình tiền xử lý phụ phế liệu nông, lâm nghiệp. Trong tự nhiên, lignin có cấu trúc hết sức phức tạp. Cấu trúc phức tạp của nó, cùng với tính không hòa tan trong nước và khối lượng phân tử lớn khiến cho lignin được xếp vào một trong những hợp chất hữu cơ khó phân huỷ nhất. Nấm đảm là nhóm sinh vật chủ yếu có khả năng phân huỷ lignin do chúng có tiết ra những enzym oxy hóa không đặc hiệu, có thể tham gia vào các bước đầu tiên trong con đường phân huỷ lignin (Hammel và các đồng tác giả, 1986; Takayoshi 2004).

Laccaza tinh từ nấm đảm *Cerrena unicolor* CFC120 có khả năng phân hủy lignin và hoạt tính phân hủy tăng 4 lần khi có mặt ABTS như là chất trung gian.

Enzym thuần khiết của một số loài *Cerrena* đã được tách chiết và xác định một số đặc tính hóa sinh học (Sanchez và các đồng tác giả, 2001). Độ pH hoạt động tối ưu ở khoảng pH axit và nhiệt độ tối ưu trong khoảng 50 đến 70 °C tùy thuộc vào cơ chất phản ứng và loại đệm sử dụng. Số lượng isozym laccaza khác nhau giữa các chủng. Chủng *Cerrena* sp. WR1 và *C. unicolor* CFC120 có 1 isozym với trọng lượng phân tử tương ứng là 64,1 và 57,6 kDa, *C. unicolor* 137 có 2 isozym 57 và 64 kD trong khi *C. unicolor* C-139 có 4 isozym với trọng lượng phân tử 45, 47, 54, 62 kDa.

Cerrena đang nghiên cứu trên thế giới được phân lập từ nhiều vùng với các đặc điểm hệ sinh thái khác nhau như phân lập từ biển như *C. unicolor* MTCC 5159, phân lập từ khu vực trồng thuốc lá v.v. Mặc dù không được phân lập từ nguồn ô nhiễm các hợp chất hữu cơ khó phân hủy, nhưng nghiên cứu laccaza từ nấm FBV41 phân lập từ rừng quốc gia Ba Vì trong xử lý ô nhiễm các hợp chất hữu cơ khó phân hủy đã được triển khai. Enzym thô thu được sau khi nuôi cấy đã bắt đầu được ứng dụng trong việc xử lý các loại thuốc nhuộm khó phân hủy hiện nay.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng nấm *Cerrena* sp. FBV41 tinh khiết về mặt sinh học, phân lập từ gỗ mục có khả năng sinh tổng hợp enzym laccaza (Lac) với hoạt tính cao; enzym laccaza này có thể tham gia vào quá trình phân giải lignin trong tự nhiên với tiềm năng cao để ứng dụng trong khử độc môi trường, tinh chế sinh học, sinh tổng hợp thuốc chống ung thư, v.v.

Chủng nấm theo sáng chế được phân lập từ mẫu gỗ mục tại rừng Quốc gia Ba Vì, Hà Nội năm 2012.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường và tiền xử lý rơm rạ chứa dịch nuôi cấy chủng nấm nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Phân lập trên môi trường PDA có bổ sung chất chỉ thị guaiacol 0,02%

Hình 2. Khuẩn lạc chủng FBV41 trên môi trường Czapek có bổ sung guaiacol 0,02 %. A: Mặt trước; B: Mặt sau.

Hình 3. Khuẩn lạc chủng FBV41 trên môi trường PDB . A1: Có bổ sung guaiacol – mặt sau; A2: Có bổ sung guaiacol – Mặt trước; B1: Không bổ sung guaiacol – Mặt sau; B2: Không bổ sung guaiacol – Mặt trước.

Hình 4. Hệ sợi và bào tử của chủng nấm FBV41 quan sát dưới kính hiển vi quang học

Hình 5. Hệ sợi và bào tử của chủng nấm FBV41 quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét

Hình 6. Cây phát sinh chủng loại dựa vào đoạn gen mã hóa 18S rARN của chủng FBV41

Hình 7. Cây phát sinh chủng loại dựa vào đoạn gen mã hóa 5,8S rARN và ITS của chủng FBV41

Hình 8. Khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41 theo thời gian

Hình 9. Ảnh hưởng của nồng độ Cu^{2+} đến khả năng sinh Lac của chủng FBV41

Hình 10. Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh Lac của chủng FBV41

Hình 11. Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh trưởng của chủng FBV41

Hình 12. Ảnh hưởng của các nguồn hữu cơ bổ sung đến khả năng sinh Lac của chủng FBV41

Hình 13. Ảnh hưởng của nồng độ đậu tương đến khả năng sinh Lac của chủng FBV41

Hình 14. Ảnh hưởng của nồng độ cám gạo đến khả năng sinh Lac của chủng FBV41

Hình 15. Ảnh hưởng của các nguồn Carbon đến khả năng sinh tổng hợp Lac của chủng FBV41

Hình 16. Hoạt tính Lac sinh ra bởi FBV41 khi lên men chìm trong bioreactor 15 lít

Hình 17. Sự thay đổi màu khi xử lý bằng laccaza thô từ FBV41 ở nồng độ 100 mg/L

Hình 18. Sự thay đổi màu khi xử lý bằng laccaza thô từ FBV41 ở nồng độ 200 mg/L

Hình 19. Sự thay đổi màu khi xử lý bằng laccaza thô từ FBV41 ở nồng độ 300 mg/L

Hình 20. Phổ hấp thụ màu RBBR trước và sau khi xử lý ở nồng độ 100 mg/L

Hình 21. Khả năng các loại màu khác nhau ở nồng độ 100 mg/L bằng laccaza thô từ FBV41 với các màu

Hình 22. Khả năng các loại màu khác nhau ở nồng độ 200 mg/L bằng laccaza thô từ FBV41 với các màu

Hình 23. Khả năng các loại màu khác nhau ở nồng độ 300 mg/L bằng laccaza thô từ FBV41 với các màu

Hình 24. Hiệu quả loại màu Acid Red 266 bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 25. Sự thay đổi màu Acid Red 266 khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 26. Hiệu quả loại màu RBBR bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 27. Sự thay đổi màu RBBR khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 28. Hiệu quả loại màu Everzol Red LF-2B bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 29. Sự thay đổi màu Everzol Red LF-2B khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 30. Hiệu quả loại màu Megafix Red EBR bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 31. Sự thay đổi màu Megafix Red EBR khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 32. Hiệu quả loại màu Drimaren Blue CLBR bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 33. Sự thay đổi màu Drimaren Blue CLBR khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 34. Hiệu quả loại màu Megafix Blue EBB bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 35. Sự thay đổi màu Megafix Blue EBB khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 36. Hiệu quả loại màu Nova Navy SG bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 37. Sự thay đổi màu Nova Navy SG khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 38. Hiệu quả loại màu Megafix tarquoise BES bởi Lac thô của chủng FBV41

Hình 39. Sự thay đổi màu Megafix tarquoise BES khi xử lý bằng Lac từ FBV41 với nồng độ ViO khác nhau

Hình 40. Điện di protein Lac không biến tính của FBV41 trên gel Native-Page

Hình 41. Điện di protein Lac biến tính của FBV41 trên gel SDS-Page

Hình 42. Tiền xử lý rom rạ bằng laccaza thô từ FBV41

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng nấm *Cerrena* sp. FBV41 thuần khiết về mặt sinh học, phân lập được từ mẫu gỗ mục tại rừng Quốc gia Ba Vì, Hà Nội.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường chứa dịch nuôi cấy chủng nấm FBV41 theo sáng chế.

Sáng chế mô tả chi tiết về chủng nấm đảm *Cerrena* sp. FBV41 từ địa điểm phân lập, làm sạch tạo dạng thuần khiết, xác định hoạt tính ban đầu, phân loại kết hợp hình thái và xác định trình tự 18S rARN và 5,8S rARN cùng vùng đệm ITS, tạo môi trường thích hợp để hoạt tính Lac đạt cao nhất, tách và làm sạch enzym laccaza để xác định số lượng của các isozym, các đặc tính của chúng, các đặc điểm loại màu (màu tổng hợp

và màu từ các nhà máy dệt nhuộm) và khả năng tham gia tiền xử lý rom rạ của laccaza thô từ *Cerena* sp. FBV41. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường chứa dịch nuôi cấy chủng nấm FBV41. Trong đó, xử lý môi trường là loại màu (xử lý nước thải nhà máy dệt nhuộm) hoặc xử lý rom rạ.

A. Phân lập, các đặc điểm hình thái và định danh chủng nấm FBV41

Mẫu gỗ mục thu được từ rừng Quốc gia Ba Vì, Hà Nội được thu thập và bảo quản trong đồ chứa tiệt trùng để đảm bảo không bị nhiễm tạp các vi sinh vật từ môi trường. Sau khi thu, mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm và là nguồn nguyên liệu cho phân lập vi sinh vật có khả năng sinh laccaza trong vòng 24 giờ. Phân lập bằng cách nuôi cấy trên đĩa môi trường dinh dưỡng thích hợp có chứa chất chỉ thị đặc trưng cho enzym laccaza là Guaiacol. Khuẩn lạc tạo thành có khả năng hiện màu chất chỉ thị được tách riêng rẽ, từ đó thu được chủng nấm thuần khiết. Chuyên gia trong lĩnh vực vi sinh vật có thể dễ dàng thực hiện việc chọn môi trường và các thao tác nuôi cấy các chủng nấm trong quá trình phân lập này. Các môi trường được sử dụng trong quá trình phân lập và xác định khả năng sinh tổng hợp enzym Lac được đề cập ở đây là môi trường PDA và PDB. Môi trường PDA (môi trường cơ bản) có thành phần như sau:

- Dịch chiết khoai tây: 200g/L;
- Glucoza: 20g/L;
- Aga: 18g/L;
- vitamin: 1mL/L;
- nguyên tố vi lượng: 1mL/L;
- ampicillin: 0,01%; và
- steptomixin: 0,01%.

Vitamin và nguyên tố vi lượng được sử dụng trong môi trường này là các vitamin và nguyên tố vi lượng thông thường được sử dụng trong lĩnh vực nuôi cấy vi sinh vật, các chuyên gia trong lĩnh vực này có thể chọn lựa một cách dễ dàng.

Môi trường PDB có thành phần tương tự như PDA, chỉ không có thành phần aga (môi trường PDA ở dạng dịch lỏng).

Từ mẫu gỗ mục thu được từ rừng Quốc gia Ba Vì, phân lập được chủng nấm FBV41 có khả năng tạo màu nâu đỏ trên môi trường PDA có guaiacol 0,02% làm chất chỉ thị.

Khả năng sinh tổng hợp Lac của chủng FBV41 được khảo sát bằng cách nuôi cấy chủng này trong môi trường PDB và xác định hoạt tính enzym theo từng ngày. Điều kiện nuôi cấy như sau: lấy mẫu từ khuẩn lạc thu được trên đĩa thạch bằng que cấy, đưa mẫu vào bình tam giác 250ml chứa 50 ml môi trường PDB, nhiệt độ 30⁰C, lắc 200vòng/phút trong 4 ngày. Hoạt tính Lac được xác định theo các phương pháp xác định hoạt tính đã biết trong lĩnh vực. Hoạt tính Lac cao nhất đạt khá cao 4500 U/L sau 4 ngày nuôi cấy. Chủng nấm FBV41 có khả năng sinh tổng hợp enzym laccasa cao ngay sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường cơ bản.

Các đặc điểm hình thái của chủng nấm FBV41 đã khảo sát bằng cách quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi quang học các giai đoạn phát triển của khuẩn lạc và hệ sợi nấm trên các đĩa môi trường thạch khác nhau, các môi trường được sử dụng là PDA và Czapek. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét cuống sinh bào tử và hình dạng bào tử sau 12 ngày nuôi cấy trên đĩa thạch PDA.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc qua các giai đoạn và trên các đĩa môi trường nuôi cấy dạng thạch khác nhau, kết hợp hình ảnh sợi nấm dưới kính hiển vi quang học và hình ảnh bào tử và sợi nấm dưới kính hiển vi điện tử quét, có thể xếp chủng nấm này vào chi nấm đảm *Cerrena* dựa theo khoá phân loại Robert A. Samson, 1984.

Thực hiện phân loại chính xác chủng nấm FBV41 bằng cách thực hiện xác định trình tự đoạn gen 18S rARN với cặp mồi EF4f/Fung5R và trình tự đoạn ADN đệm cùng với gen 5,8S rARN sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4. Các điều kiện thực hiện xác định trình tự đoạn gen là kiến thức thông thường trong lĩnh vực xác định trình tự và các chuyên gia trong lĩnh vực này có thể thực hiện được một cách dễ dàng.

Trình tự đoạn gen 18S rARN của chủng FBV41 có độ dài 491 bp như được thể hiện ở SEQ ID NO: 1 và được đăng ký trên GenBank với mã số KJ471472. Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 có độ dài 468 bp như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

So sánh mức độ tương đồng một phần trình tự gen mã hóa 18S rARN của chủng FBV41 với trình tự đoạn gen này của các chủng nấm được công bố trên các ngân hàng dữ liệu GenBank, EMBL cho thấy chủng FBV41 có mức độ tương đồng

cao nhất 100% với chủng *Cerrena* sp. SAUFC4-3 và *Cerrena* sp. NIOCC F67. Cây phát sinh chủng loại của chủng FBV41 dựa trên trình tự một phần đoạn gen 18S rARN đã được xây dựng và được trình bày trên hình 6.

So sánh mức độ tương đồng đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 của chủng FBV41 với trình tự đoạn gen này của các chủng nấm được công bố trên các ngân hàng dữ liệu GenBank, EMBL cho thấy chủng FBV41 có mức độ tương đồng cao nhất 99% với chủng *Cerrena* sp. NIOCC 2a và *Cerrena* sp. MTCC 5159. Cây phát sinh chủng loại của chủng FBV41 dựa trên trình tự ITS1-5,8S rARN-ITS2 đã được xây dựng và được trình bày trên hình 7.

Dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hệ sợi và bào tử, cường sinh bào tử kết hợp so sánh một phần trình tự gen mã hóa 18S rARN và đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 thì chủng này thuộc giới nấm, ngành *Basidiomycota*, lớp *Agaricomycetes*, bộ *Polyporales*, họ *Polyporaceae*, chi *Cerrena* và được đặt tên là *Cerrena* sp.FBV41.

Tên chủng “FBV41”, trong phạm vi bản mô tả này, vẫn được dùng để chỉ chủng *Cerrena* sp. FBV41 vừa được định tên trên đây.

Chủng nấm FBV41 được phân lập và lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

B. Khả năng sinh tổng hợp enzym laccaza của chủng *Cerrena* sp.FBV41

Chủng *Cerrena* sp.FBV41 sau khi phân lập và xác định có khả năng sinh laccaza được tiếp tục xác định các đặc tính của chủng này liên quan đến khả năng sinh laccaza và các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp laccaza.

Chủng FBV41 được nuôi cấy trên 2 loại môi trường khác nhau là PDB và MCA. Trong đó, thành phần môi trường PDB như đã mô tả trên phần phân lập và môi trường MCA có thành phần như sau: KNO₃ 2,6 g/l; MgSO₄ 0,42 g/l; KH₂PO₄ 0,24 g/l; Na₂HPO₄ 0,56 g/l; NaCl 1 g/l; K₂HPO₄ 0,1 g/l; FeSO₄ 0,002 g/l; Bột ngô 2 g/l; Đường mật 4 g/l. Dựa vào kết quả trên môi trường này để chọn ra môi trường nền để nghiên cứu các đặc tính sinh tổng hợp laccaza. Trên môi trường PDB chủng này sinh tổng hợp laccaza tốt hơn môi trường MCA, do đó môi trường PDB được sử dụng để tiếp tục làm

rõ các đặc điểm sinh học khác. Đặc tính được xác định đầu tiên là thời gian mà chủng FBV41 sinh laccaza đạt hoạt tính cao nhất. Sau 9 ngày nuôi cấy chủng này cho hoạt tính laccaza cao nhất đạt 9.727 U/L. Khoảng thời gian 8 đến 10 ngày nuôi cấy là khoảng thời gian để thu nhận laccaza của các nghiên cứu về các điều kiện ảnh hưởng tiếp theo.

Sự ảnh hưởng của các nhân tố như CuSO_4 , độ pH, các chất hữu cơ bổ sung, nguồn cacbon, tỉ lệ C/N và chất cảm ứng cũng được xác định bằng cách nuôi cấy chủng FBV41 trong các môi trường có thay đổi thành phần các nhân tố cần xác định ảnh hưởng và sau đó xác định hoạt tính laccaza. Từ đó, xác định được các điều kiện thích hợp nhất cho việc sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41 theo sáng chế.

C. Điều kiện và các bước tiến hành lên men chìm thu lượng lớn laccaza từ chủng *Cerrena* sp.FBV41

Để thu được lượng lớn enzym laccaza từ chủng FBV41, chủng này được lên men trong thiết bị lên men chìm quy mô 15 lít. Giống cho lên men chìm quy mô lớn là giống cấp 2, quy trình chuẩn bị nguồn giống được mô tả như sau:

- 1- Giống cấp 1: Chủng giống FBV41 gốc được cấy chuyển sang môi trường PDA, nuôi ở 30°C trong 5 ngày, ta thu được giống cấp 1.
- 2- Giống cấp 2: Giống cấp 1 được chuyển sang 50 ml môi trường PDB pH 6,8 trong bình nón 250ml và nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Sau 5 ngày nuôi cấy thu nhận được giống cấp 2. Nguồn giống này được sử dụng để bổ sung vào thiết bị lên men 15 lít.

Thành phần môi trường lên men chìm của chủng nấm FBV41 là môi trường PDB có bổ sung CuSO_4 0.25 μM . Lượng giống bổ sung là 5% thể tích lên men, môi mẻ lên men 10 – 15 lít. Lên men ở điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C trong thời gian 6 ngày. Dịch lên men thu được có hoạt tính cao, lên đến 70.962 U/L và được lọc thô bằng vải màn để thu dịch enzym thô. Dịch enzym thô được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

D. Tách, tinh chế và xác định các yếu tố ảnh hưởng đến enzym laccaza của chủng *Cerrena* sp.FBV41

Dịch enzyme thô được ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, sau đó được cô đặc bằng hệ thống màng lọc tiếp tuyến 8 kDa. Dịch enzyme sau khi cô được đưa lên cột sắc ký trao đổi ion HiTrap Q HP 1 ml với tổng thể tích dịch enzyme qua cột là 2 ml trong một lần chạy. Cột được cân bằng bởi dung dịch đệm natri axetat 20mM, độ pH=5,5. Thôi mẫu bằng muối NaCl có 0,05M đến 0,35M, bước nhảy giữa các nồng độ là 0,05M, mỗi nồng độ thu 10 phân đoạn với thể tích 1ml/phân đoạn. Tốc độ dòng chảy 1ml/phút khi cân bằng cột và tải mẫu, 1,5ml/ phút khi thôi mẫu. Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme được xác định ở mỗi phân đoạn.

Các phân đoạn có hoạt tính cao tại các đỉnh khác nhau lần lượt được đưa lên cột sắc ký lọc gel Sephadex. Cột có kích thước 1,2x50 cm được cân bằng bằng dung dịch đệm natri axetat 20mM, độ pH=5,5, tốc độ dòng chảy là 20ml/giờ. Thu 40 phân đoạn, thể tích mỗi phân đoạn là 1ml. Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme được xác định trong mỗi phân đoạn.

Khối lượng phân tử tương đối và độ tinh sạch của enzyme laccasa tách chiết được xác định bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit theo Laemmli. Protein không biến tính được điện di trên gel không biến tính (native page). Protein biến tính được điện di trên gel SDS page. Quá trình điện di được thực hiện với dòng điện có hiệu điện thế là 90V đối với bản điện di gel cô và 120V đối với bản điện di gel tách. Thành phần của gel điện di và các bước tiến hành được thực hiện dễ dàng bởi các chuyên gia trong lĩnh vực protein.

Enzyme thô và enzyme laccasa tinh sạch sau quá trình tinh sạch được đưa đi xác định sự ảnh hưởng của các nhân tố khác nhau đến độ bền và hoạt tính của enzyme. Các nhân tố là độ pH, nhiệt độ, các cơ chất khác nhau, chất ức chế và ion kim loại.

Các quá trình thực hiện sắc ký, xác định sự ảnh hưởng của các nhân tố lên hoạt tính của hai loại enzyme laccasa là các quá trình thông thường trong lĩnh vực enzyme. Vì vậy, các chuyên gia trong lĩnh vực có thể dựa vào kiến thức của mình để thực hiện một cách dễ dàng.

E. Ứng dụng của laccasa sinh ra bởi chủng *Cerrena* sp.FBV41 vào loại màu thuốc nhuộm và tiền xử lý rơm rạ

Enzym laccaza thu được từ chủng FBV41 được sử dụng để loại màu của một số màu thuộc nhóm azo như Acid red 266 (NY7), nhóm anthraquinon như RBBR Remazol brilliant blue R. Ngoài ra laccaza từ FBV41 còn loại màu của các màu thương mại được sử dụng rộng rãi trên thị trường Việt Nam hiện nay là Everzol Red LF-2B; Megafix Red EBR; Drimaren Blue CLBR; Megafix Blue EBB; Nova Navy SG và Megafix tarquoise BES. Các màu thương mại này được thu thập từ các cơ sở, nhà máy dệt nhuộm như Nhà máy Dệt Nam Định, nhà máy dệt nhuộm Đông Xuân, Xí nghiệp 5-công ty 20-Bộ Quốc phòng. Khả năng loại màu được tiến hành ở điều kiện 30°C, đệm axetat, độ pH=4, có hoặc không có mặt của chất trung gian (mediator). Laccaza thô của chủng FBV41 loại được từ 60 đến hơn 97 % các màu thử nghiệm.

Laccaza thô từ chủng FBV41 có khả năng ứng dụng để tiền xử lý rơm rạ. Enzym này có khả năng khử độc các hợp chất phenolic có trong rơm rạ là tác nhân ức chế quá trình đường hóa bởi hệ thống các enzym khác. Hiệu quả tiền xử lý thông qua lượng đường khử tạo thành khi so sánh thí nghiệm có laccaza và không có laccaza kết hợp với 2 chế phẩm CTEX và HTEX là các chế phẩm chứa enzym xenulaza (CTEX) và hemixenulaza (HTEX).

Chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường chứa dịch nuôi cấy của chủng *Cerrena* sp. FBV41. Trong đó, dịch nuôi cấy có thể là dịch enzym thô như thu được từ mục C trên đây, hoặc là dịch enzym tinh sạch như thu được từ mục D trên đây. Chế phẩm vi sinh này hữu ích để xử lý môi trường như khử màu trong nước thải nhà máy dệt nhuộm và tiền xử lý rơm rạ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh sẽ biết cách kết hợp các chất bổ trợ với dịch nuôi cấy của chủng *Cerrena* sp. FBV41 để thu được chế phẩm phù hợp với mục đích sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng FBV41 có khả năng sinh laccaza

Mẫu gỗ mục thu được từ rừng Quốc gia Ba Vì, Hà Nội được thu thập và là nguồn nguyên liệu cho phân lập vi sinh vật có khả năng sinh laccaza trong vòng 24 giờ. Phân lập bằng cách nuôi cấy trên đĩa môi trường PDA thích hợp có chứa chất chỉ thị đặc trưng cho enzym laccaza là guaiacol 0,02%. Khuẩn lạc tạo thành có khả năng

hiện màu chất chỉ thị được tách riêng rẽ, từ đó thu được chủng nấm thuần khiết (Hình 1).

Khả năng sinh tổng hợp Lac của chủng FBV41 được khảo sát bằng cách nuôi cấy chủng này trong môi trường PDB ở nhiệt độ 30°C, lắc 200 vòng/phút trong 4 ngày và xác định hoạt tính enzym theo từng ngày. Sau 4 ngày, hoạt tính Lac cao nhất đạt khá cao 4500 U/L.

Ví dụ 2: Hình thái và phân loại chủng *Cerrena* sp. FBV41

Hình thái khuẩn lạc được quan sát trên hai môi trường PDB và Czapek sau 4 ngày nuôi cấy ở 30°C. Khuẩn lạc trên hai môi trường này là khác nhau, với môi trường Czapek hệ sợi phát triển chậm hơn so với trên môi trường PDA. Khuẩn lạc có dạng sợi bông mảnh, mật độ sợi thưa, màu trắng, khuẩn lạc làm môi trường chuyển màu nâu đỏ nhạt (Hình 2). Trên môi trường PDA khuẩn lạc có màu trắng, bông xốp, mật độ sợi dày, tâm khuẩn lạc lõm, tạo nhiều vòng đồng tâm xốp, trên môi trường có guaiacol tạo màu nâu đỏ đậm, màu này đậm hơn rất nhiều so với môi trường Czapek (Hình 3).

Hình thái sợi, cuống sinh bào tử và bào tử của chủng FBV41 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) và quang học sau 12 ngày nuôi cấy trên môi trường PDB. Hệ sợi chủng FBV41 có dạng sợi dài, không chia đốt, tại các điểm phân nhánh có gờ hơi sần (Hình 4). Bào tử vô tính có dạng chuỗi ngắn, kích thước 2 – 2,4 x 7- 10 µm. Cuống sinh bào tử phát sinh từ hệ sợi mảnh, phần cuống nhỏ dính với các bào tử lớn hơn phía trên (Hình 5).

Thực hiện phân loại chủng nấm FBV41 thông qua các bước chính sau:

- 1- Nuôi thu sinh khối
- 2- Tách ADN tổng số
- 3- Khuếch đại đoạn gen mong muốn (18S rARN và ITS1-5,8S rARN-ITS2) bằng phản ứng PCR
- 4- Xác định trình tự đoạn gen 18S rARN và ITS1-5,8S rARN-ITS2 của chủng FBV41
- 5- Xác định độ tương đồng của trình tự các đoạn gen trên của chủng FBV41 với các chủng được công bố trên Genbank

6- Xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm Mega 5

Chi tiết các bước làm được mô tả như sau:

- Tách chiết ADN tổng số của chủng FBV41
- Nuôi cấy thu sinh khối nấm trên môi trường PDB, pH 6,8, sau 3 ngày ở 30°C;
- Thu sinh khối bằng cách ly tâm 6000 vòng/10 phút ở 4°C, lặp lại vài lần để thu đủ mẫu;
- Bổ sung môi trường nuôi cấy để rửa sinh khối, ly tâm 2 lần với 6000 vòng/10 phút ở 4°C;
- Dùng panh để lấy sinh khối cho vào cối sứ đã khử trùng và nghiền trong nitơ lỏng thành bột mịn;
- Dùng thìa xúc mẫu cho vào các ống eppendoff, bổ sung 600µl đệm lysis và lắc nhẹ;
- Bổ sung tiếp 65µl lysozym (10 mg/ml), ủ 37°C trong 30-45 phút;
- Cho 50µl protenaza K (10 mg/ml) ủ ở 56°C trong 2 giờ;
- Bổ sung tiếp clorofom:isoamylalcohol (tỷ lệ 24:1) với tỷ lệ 1:1 về thể tích, trộn đều sau đó ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C;
- Thu phần dịch nổi bên trên cho vào ống eppendorf mới;
- Bổ sung isopropanol với tỷ lệ 1:1 về thể tích, ủ ở 4°C qua đêm;
- Ly tâm ở vận tốc 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu chất kết tủa;
- Hòa tan kết tủa trong 500 µl TE;
- Loại ARN bằng cách thêm AaRNaza, ủ ở 37°C qua đêm;
- Bổ sung clorofom:isomyalcohol (tỷ lệ 24:1) với tỷ lệ 1:1 về thể tích sau đó đảo nhẹ và ly tâm ở vận tốc 12000 vòng/phút, 15 phút ở 4°C;
- Thu phần dịch nổi phía trên;
- Bổ sung etanol 100% (giữ lạnh) tỷ lệ 1:1 về thể tích;

- Ly tâm ở vận tốc 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu kết tủa sau đó rửa sạch bằng etanol 80%, làm khô ADN; và

- Hòa trong 100µl TE và bảo quản ở 4°C.

- Nhân đoạn gen bằng phản ứng PCR

Cặp mồi được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 18S rARN là cặp mồi EF4f/Fung5R và đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 là ITS1/ITS4 được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo thủ cao của các đoạn gen này ở sinh vật có nhân điển hình.

Mồi xuôi EF4f: 5' – GGAAGGG(G/A)TGTATTTATTAG – 3'

Mồi ngược Fung5R: 5' – GTAAAGTCCTGGTTCCC – 3'

Mồi xuôi ITS1: 5' - CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A – 3'

Mồi ngược ITS4: 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'

Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau:

Thành phần phản ứng (µl):

Dệm PCR	2
MgCl ₂ (25mM)	3
dNTP	2,5
Mồi xuôi (20 µM)	1
Mồi ngược (20 µM)	1
Taq-polymeraza (5 unit/µl)	0,5
H ₂ O	12,5
ADN	2
Tổng thể tích	25

Chu trình nhiệt:

Đối với mồi EF4F/ Fung5R:

- Bước 1: 95°C (5 phút)
- Bước 2: 94°C (1 phút)
- Bước 3: 48°C (1 phút)
- Bước 4: 72°C (3 phút)
- Bước 5: Lặp lại 35 lần từ bước 2 đến bước 4
- Bước 6: 72°C (10 phút)
- Bước 7: Bảo quản ở 4°C

Đối với mồi ITS1/ITS4:

- Bước 1: 95°C (5 phút)
- Bước 2: 94°C (1 phút)

- Bước 3: 54°C (1 phút)
- Bước 4: 72°C (3 phút)
- Bước 5: Lặp lại 35 lần từ bước 2 đến bước 4
- Bước 6: 72°C (10 phút)
- Bước 7: Bảo quản ở 4°C

Điện di kiểm tra việc thực hiện PCR bằng gel agarosa 1%, nhuộm bằng etidi bromua và sau đó soi bản gel dưới tia tử ngoại. Xác nhận phản ứng PCR đã xảy ra một cách thành công.

Sản phẩm nhân đoạn gen được tinh sạch bằng kit Qiagen purification[®] và sau đó được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger, sử dụng máy đọc trình tự tự động Automated Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystems (Mỹ). Sử dụng các phần mềm Mega5 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng nấm FBV41.

Kết quả Sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa 18S rARN từ ADN của chủng FBV41 đã được xác định trình tự có kích thước 491 bp (như được thể hiện ở SEQ ID NO: 1) và được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập KJ471472. Kết quả sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa ITS1-5,8S rARN-ITS2 từ ADN của chủng FBV41 đã được xác định trình tự có kích thước 468 bp (như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2).

So sánh mức độ tương đồng một phần trình tự gen mã hóa 18S rARN của chủng FBV41 với trình tự đoạn gen này của các chủng nấm được công bố trên các ngân hàng dữ liệu GenBank, EMBL cho thấy chủng FBV41 có mức độ tương đồng cao nhất 100% với chủng *Cerrena* sp. SAUFC4-3 và *Cerrena* sp. NIOCC F67. Cây phát sinh chủng loại của chủng FBV41 dựa trên trình tự một phần đoạn gen 18S rARN đã được xây dựng và được trình bày trên hình 6.

So sánh mức độ tương đồng đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 của chủng FBV41 với trình tự đoạn gen này của các chủng nấm được công bố trên các ngân hàng dữ liệu GenBank, EMBL cho thấy đoạn gen của chủng FBV41 có mức độ tương đồng cao nhất 99% với chủng *Cerrena* sp. NIOCC 2a và *Cerrena* sp. MTCC 5159. Cây phát sinh chủng loại của chủng FBV41 dựa trên trình tự ITS1-5,8S rARN-ITS2 đã được xây dựng và được trình bày trên hình 7.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hệ sợi và bào tử, cường sinh bào tử kết hợp so sánh một phần trình tự gen mã hóa 18S rARN và đoạn gen ITS1-5,8S rARN-ITS2 thì chủng này thuộc giới nấm, ngành *Basidiomycota*, lớp *Agaricomycetes*, bộ *Polyporales*, họ *Polyporaceae*, chi *Cerrena* và được đặt tên là *Cerrena* sp. FBV41.

Ví dụ 3: Thời gian sinh tổng hợp laccaza của chủng nấm FBV41

Khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41 theo thời gian được theo dõi trên môi trường PDB, chủng được nuôi cấy ở 30°C, lắc 200 v/p. Mẫu được thu theo từng ngày và xác định hoạt tính laccaza. Dừng thu mẫu khi hoạt tính đo được giảm dần sau 5 ngày liên tiếp.

Kết quả được thể hiện tại Hình 8 cho thấy chủng *Cerrena* sp.FBV41 sinh tổng hợp laccaza có hoạt tính cao nhất sau 9 ngày nuôi cấy. Hoạt tính cao nhất đạt 9.727 U/L. Tuy nhiên có một giai đoạn ổn định từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 7, tại giai đoạn này hoạt tính gần như không thay đổi. Ngày thứ 8 hoạt tính tăng dần và đạt đỉnh vào ngày thứ 9. Sau ngày thứ 9 hoạt tính sinh ra có xu hướng giảm dần và chỉ còn 3.139 U/L vào ngày thứ 16. Dựa vào kết quả này, các thí nghiệm tiếp theo dịch lên men được lấy mẫu và xác định hoạt tính tại 3 thời điểm là 8, 9 và 10 ngày, lấy hoạt tính cao nhất để làm kết quả cuối cùng cho các thí nghiệm sau.

Ví dụ 4: Xác định ảnh hưởng của nồng độ CuSO_4 lên khả năng sinh tổng hợp laccaza

Ion Cu^{2+} được chứng minh là có vai trò rất lớn trong việc cảm ứng sinh laccaza, do đó CuSO_4 được sử dụng để bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp laccaza. Dải nồng độ CuSO_4 đã được sử dụng là 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mM.

Sau 9 ngày nuôi cấy ở nồng độ CuSO_4 0,25 μM cho hoạt tính đạt cao nhất 11.986 U/L và tăng 78 % so với mẫu không bổ sung CuSO_4 (6.917 U/l). Trong các thí nghiệm có bổ sung thêm Cu^{2+} đều cho hoạt tính cao hơn so với thí nghiệm đối chứng không bổ sung. Tuy nhiên khi nồng độ của CuSO_4 cao hơn 0,25 mM trong dải khảo sát

là 0,5 đến 1 mM thì làm tăng hoạt tính lên khoảng 50 % nhưng không tăng tuyến tính khi nồng độ Cu^{2+} tiếp tục tăng (Hình 9).

Ví dụ 5. Xác định ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41

pH môi trường nuôi cấy là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp các chất trao đổi thứ cấp. Dải pH được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41 là pH 3,4,5,6,7,8,9,10,11 và 12. Môi trường sử dụng cho nghiên cứu là PDB có bổ sung 0,25 mM Cu^{2+} , pH được điều chỉnh bằng 1M NaOH và 1M HCl, xác định bằng máy Hanna pH211. Sau khi khử trùng pH được kiểm tra và điều chỉnh lại bằng NaOH và HCl vô trùng.

Sau khi chuẩn bị môi trường, giống được bổ sung vào các bình nuôi cấy với tỷ lệ 10% về thể tích. Hoạt tính laccaza khảo sát sau 9 ngày nuôi cấy đạt cao nhất ở pH 8 đạt 25.875 U/L. Trong dải pH khảo sát cho thấy chủng FBV41 sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng pH 3 đến pH 10, đây là khoảng pH rất rộng mà nấm có thể sinh trưởng được (Hình 10). Chủng này sinh tổng hợp được laccaza trong dải pH mà chúng phát triển, tuy nhiên tại pH 3 hoạt tính sinh ra yếu nhất đạt 9.680 U/L, khi pH càng cao hoạt tính laccaza sinh ra càng tăng và cao nhất tại pH 8. Ở pH 9 và 10 hoạt tính laccaza giảm nhanh và lượng sinh khối nấm tạo ra cũng ít hơn. Tại pH 11 và pH 12 chủng này không có khả năng sinh trưởng và tổng hợp laccaza (Hình 11).

Ví dụ 6: Xác định ảnh hưởng của các nguồn hữu cơ bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41

Một số nguồn dinh dưỡng hữu cơ khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy có thể làm tăng hoạt tính laccaza tạo ra, các nguồn được nghiên cứu nhiều là bột ngô, cám lúa mạch, cám lúa mì, cám gạo và bột đậu tương. Các nguồn sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng đối với FBV41 là cám gạo, bột đậu tương, bột ngô, bột gạo.

Môi trường cơ bản PDB chứa dịch chiết khoai tây có bổ sung 0.25 mM Cu^{2+} , pH 8 chỉnh bằng NaOH 1M được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn hữu cơ bổ sung. Tỷ lệ bổ sung 0,5 % giống nhau giữa các nguồn.

Kết quả xác định tại thời điểm hoạt tính laccaza đạt cao nhất sau 9 ngày cho thấy tất cả các nguồn bổ sung đều cho hoạt tính cao hơn so với khi không bổ sung, trong đó nguồn bột đậu tương có ảnh hưởng tốt nhất tiếp sau đến nguồn cám gạo. Khi bổ sung 0,5% bột đậu tương hoạt tính laccaza đạt 34.670 U/L. Với hai nguồn bột gạo và bột ngô, hoạt tính laccaza tăng không đáng kể (Hình 12).

Ví dụ 7: Xác định ảnh hưởng đậu tương lên khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41

Tiếp theo ví dụ được trình bày tại mục “Ví dụ 6” thấy bột đậu tương có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh laccaza của chủng FBV41, do đó các nồng độ khác nhau của bột đậu tương bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã được tiến hành. Thành phần môi trường tương tự trong ví dụ số 6 với khác biệt là nồng độ bột đậu tương được bổ sung ở các nồng độ là 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 và 2,5 %.

Khi bổ sung bột đậu tương ở nồng độ 1% đã làm tăng khả năng sinh tổng hợp laccaza, ở nồng độ bột đậu tương lớn hơn từ 1,5 đến 2,5 % hoạt tính laccaza thu được thấp hơn so với đối chứng (mẫu không bổ sung bột đậu tương). Nồng độ thích hợp nhất là 0,5 % vì ở nồng độ này hoạt tính laccaza đạt 38.354 U/L, tăng 90 % so với khi không bổ sung đậu tương (Hình 13).

Ví dụ 8: Xác định ảnh hưởng của nguồn cám gạo lên khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41

Ngoài đậu tương, cám gạo cũng có ảnh hưởng đến khả năng sinh laccaza của chủng FBV41, nồng độ khác nhau của cám gạo trong môi trường nuôi cấy lần lượt là 0,1; 0,5 và 0,75 % đã được sử dụng; đối chứng là mẫu không bổ sung cám gạo. Môi trường PDB với pH 8, 0,25 mM Cu^{2+} , 0,5 % bột đậu tương, 10 % giống, lắc 200 v/p ở 30 °C đã được sử dụng trong khảo sát này. Hoạt tính laccaza cao nhất đo được sau 9 ngày nuôi với hoạt độ 57.993 U/L ở 0,1 % nồng độ cám gạo (Hình 14).

Ví dụ 9: Xác định ảnh hưởng của nguồn Cacbon lên khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41

Môi trường sử dụng để lên men chủng FBV41 cho hoạt tính cao có thành phần cacbon chính là glucoza, sự thay thế nguồn đường này bằng các nguồn đường khác đã được xác định. Các nguồn đường sử dụng cho nghiên cứu này bao gồm 2 đường đơn glucoza; galactoza, 2 đường đôi saccaroza; lactoza, 2 đường đa là tinh bột, xenluloza, và 2 nguồn cacbon khác là đường phen và rỉ đường. Nồng độ 1% của các nguồn cacbon này giống nhau giữa các bình nuôi cấy và lần thí nghiệm lập lại và bằng với nồng độ đường của glucoza trong thành phần của môi trường cơ bản PDB.

Môi trường được sử dụng trong nghiên cứu này có thành phần bao gồm môi trường cơ bản PDB, pH 8, 0,25 mM Cu^{2+} , 0,5 % bột đậu tương, 0,1 % cám gạo và 1 % các nguồn đường như trình bày ở trên.

Chủng FBV41 có khả năng sử dụng cả 8 nguồn cacbon đã khảo sát. Tuy nhiên, hoạt tính laccaza sinh tổng hợp bởi chủng FBV41 không phụ thuộc vào cấu trúc đường đơn, đường đôi hay đường đa có trong môi trường nuôi cấy mà hoạt tính laccaza lại phụ thuộc vào từng loại đường riêng biệt (Hình 15). Trên môi trường chứa rỉ đường, xenluloza và lactoza hoạt tính laccaza thu được thấp nhất trong các nguồn đường đã khảo sát. Hai nguồn đường đạt hoạt tính cao nhất là galactoza và saccharoza với hoạt tính lần lượt đạt 73.194 và 76.250 U/L. Hoạt tính cao nhất đạt 43.263 U/L sau 6 ngày với rỉ đường và 7 ngày (31.944 U/L) trên nguồn xenluloza và vẫn cao nhất sau 9 ngày nuôi cấy trên các nguồn đường còn lại.

Ví dụ 13: Điều kiện lên men chìm quy mô 15 lít nhằm sinh tổng hợp laccaza của chủng FBV41

Để thu được lượng lớn enzym laccaza từ chủng FBV41, chủng này được lên men trong thiết bị lên men chìm quy mô 15 lít. Giống cho lên men chìm quy mô lớn là giống cấp 2, quy trình chuẩn bị nguồn giống được mô tả như sau:

- Giống cấp 1: Chủng giống FBV41 gốc được cấy chuyển sang môi trường PDA, nuôi ở 30°C trong 5 ngày, ta thu được giống cấp 1.

- Giống cấp 2: Giống cấp 1 được chuyển sang 50 ml môi trường PDB pH 6,8 trong bình nón 250ml và nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Sau 5 ngày nuôi cấy thu nhận được giống cấp 2. Nguồn giống này được sử dụng để bổ sung vào thiết bị lên men 15 lít.
- Đồng nhất giống: Giống cấp 2 trước khi bổ sung vào thiết bị lên men được đồng nhất bằng máy đồng nhất.

Thành phần môi trường lên men chìm của chủng nấm FBV41 là môi trường PDB có bổ sung CuSO_4 0.25 mM, hỗn hợp vitamin, hỗn hợp vi lượng và 10 ml dầu ăn. Lượng giống bổ sung là 5% thể tích lên men, môi mẻ lên men 15 lít. Lên men ở điều kiện nhiệt độ ở 30°C trong thời gian 6 ngày. Dịch lên men được thu theo thời gian sau 24, 48, 72, 96, 126 và 144 giờ để xác định hoạt tính. Sau 144 giờ hoạt tính laccase đạt cao nhất 70.962 U/L (Hình 16). Sau khi lọc thô, dịch enzyme thô được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men quy mô 15 lít của chủng FBV41 vẫn tiếp tục được khảo sát.

Ví dụ 14: Loại màu tổng hợp ở các nồng độ khác nhau bởi enzyme thô của chủng FBV41

Các loại thuốc nhuộm màu được sử dụng trong ví dụ ảnh hưởng của nồng độ màu đến khả năng loại màu của enzyme thô từ chủng FBV41 được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Các loại màu tổng hợp được sử dụng trong nghiên cứu

Thuốc nhuộm	C.I.	Ký hiệu	Trọng lượng (g/mol)	Độ hòa tan (g/L)	λ_{max}
Axit xanh 62	62045	NY3	400,5	40	595
Axit xanh 281		NY5	580,6	20	600
Remazol Brilliant Blue R	61200	RBBR	626,5		595
Dr Blue CLBR	-	-	-	-	595

Tổng thể tích phản ứng loại màu là 5 mL được thực hiện trong lọ thủy tinh. Trong đó gồm đệm 20 mM natri acetate pH 4, nồng độ màu lần lượt là 100, 200 và 300 mg/L, hoạt tính enzyme cuối cùng là 1.000U/L. Mỗi loại màu tham gia vào quá trình nghiên cứu gồm một mẫu đối chứng (C) chỉ gồm đệm natri acetate và màu. Hiệu

suất loại màu được tính trong các khoảng thời gian khác nhau từ 2 đến 90 phút theo công thức sau:

$$D = \frac{100(C_i - C_t)}{C_i}$$

Trong đó

D: phần trăm loại màu thuốc nhuộm (%)

C_i: nồng độ thuốc nhuộm ban đầu

C_t: nồng độ thuốc nhuộm theo thời gian *t*

Sau 90 phút, tất cả các màu đều bị loại bỏ ở mức độ khác nhau khi bổ sung thêm laccaza với hoạt tính ban đầu là 1.000 U/L (Hình 17, 18 và 19). Phổ hấp thụ màu RBBR trước và sau khi xử lý ở nồng độ 100 mg/l bằng máy UV-VIS được thể hiện trên Hình 20 cho thấy có sự thay đổi qua quá trình xử lý.

Trong 4 loại màu nghiên cứu ở nồng độ 100 mg/L thì màu Dr CLBR đã bị loại bỏ nhiều nhất với hơn 90% ngay sau 15 phút và 94% sau 90 phút. Bên cạnh đó màu RBBR, axit xanh 62 và axit xanh 281 cũng bị loại bỏ lần lượt 87,12%; 85,19% và 78,95% chỉ sau 90 phút ở nồng độ 100 mg/L (Hình 21). Khi nồng độ màu tăng lên 200 và 300 mg/L thì khả năng loại màu axit xanh 62, RBBR và axit xanh 281 diễn ra chậm hơn và đạt hiệu quả thấp hơn, đạt từ 68,88 đến 83,7% (Hình 22 và 23). Tuy nhiên với màu Dr CLBR hiệu quả loại màu vẫn đạt trên 93% sau 90 phút. Như vậy, laccaza thô từ FBV41 có khả năng loại màu tốt chỉ từ 15 đến 90 phút. Do đó nó có ý nghĩa rất lớn khi áp dụng phân hủy sinh học ở mô hình công nghiệp trong công nghệ xử lý màu thuốc nhuộm vì có thể rút ngắn thời gian xử lý và đem lại hiệu quả kinh tế cao hơn.

Kết quả ở bảng 2, 3 và 4 cho thấy, trong quá trình loại màu có sự tham gia của enzym ngoại bào laccaza.

Bảng 2. Sự giảm hoạt tính laccaza theo thời gian xử lý loại màu thuốc nhuộm ở nồng độ 100 mg/L

Màu (100 mg/L)	Hoạt tính laccaza (U/L)						
	2 phút	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	75 phút	90 phút
RBBR	466	484	380	240	106	112	89
Axit xanh 62	958	773	626	391	317	330	245
Dr Blue CLBR	719	713	524	242	242	221	189
Axit xanh 281	788	516	569	294	246	217	192

Bảng 3. Sự giảm hoạt tính laccaza theo thời gian xử lý loại màu thuốc nhuộm ở nồng độ 200 mg/L

Màu (200 mg/L)	Hoạt tính laccaza (U/L)						
	2 phút	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	75 phút	90 phút
RBBR	211	209	158	78	15	12	18
Axit xanh 62	566	401	337	237	42	38	39
Dr Blue CLBR	374	534	505	86	10	13	14
Axit xanh 281	608	514	416	314	61	68	60

Bảng 4. Sự giảm hoạt tính laccaza theo thời gian xử lý loại màu thuốc nhuộm ở nồng độ màu 300 mg/L

Màu (300 mg/L)	Hoạt tính laccaza (U/L)						
	2 phút	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	75 phút	90 phút
RBBR	472	457	269	193	158	192	139
Axit xanh 62	932	855	790	704	700	692	567
Dr Blue CLBR	903	714	634	643	639	496	500
Axit xanh 281	498	428	289	269	265	218	226

Ví dụ 15: Ảnh hưởng của chất oxi hóa khử trung gian đến khả năng loại màu tổng hợp bởi dịch Lac thô của chủng FBV41

Hai loại màu được sử dụng trong nghiên cứu này là màu tổng hợp, màu đỏ Acid red 266 (NY7) thuộc nhóm màu azo và màu xanh Remazol Brilliant Blue R (RBBR) thuộc nhóm màu anthraquinone. Thí nghiệm được tiến hành ở 30⁰C, nồng độ màu 100 mg/l, hoạt tính Lac ban đầu là 1.000 U/L, chất trung gian sử dụng là Violuric axit (ViO) với các nồng độ khác nhau. Đối với màu NY7 các nồng độ của ViO là 50; 100; 200 và 300 μ M. Đối với màu RBBR các nồng độ của ViO sử dụng để nghiên cứu là 100; 300 và 500 μ M. Mẫu đối chứng là mẫu không có bổ sung chất trung gian. Hiệu suất loại màu được xác định sau 24 giờ với màu NY7 và 48 giờ với màu RBBR.

Kết quả hiệu suất loại màu được thể hiện trên hình 24 và 26. Kết quả cho thấy chất trung gian làm tăng hiệu quả loại màu. Với màu đỏ NY7 Lac thô loại được 91,1 % màu sau 24 giờ và 80 % màu sau 1 giờ ở nồng độ ViO là 300 μ M. Với nồng độ 200,

100 và 50 μM hiệu suất loại màu tương ứng là 87,8; 85 và 73 %. Đối với mẫu không bổ sung chất trung gian hiệu suất loại màu đạt 9 %.

Đối với màu xanh RBBR, khi không có mặt chất trung gian laccaza thô loại được 58,1 %, trong khi có mặt 500 μM ViO loại được 91,2 %, hiệu suất được xác định sau 48 giờ. Sự thay đổi màu sau 24 giờ được thể hiện trên hình 25 và 27.

Ví dụ 16: Loại màu thương mại (nhóm màu hoạt tính) bởi laccaza thô từ chủng FBV41

Một số màu thương mại hiện nay các công ty, xí nghiệp dệt nhuộm tại Việt Nam đang sử dụng đã được thu thập làm nguyên liệu cho nghiên cứu khả năng loại màu của laccaza thu nhận từ chủng FBV41. Các màu này thuộc nhóm màu thuốc nhuộm hoạt tính, các màu được sử dụng trong ví dụ này bao gồm Everzol Red LF-2B, Megafix Red EBR, Drimaren Blue CLBR, Megafix Blue EBB, Nova Navy SG và Megafix tarquoise BES.

Phản ứng loại màu được thực hiện trong đệm Natri axetat pH 4, nhiệt độ 30 °C, hoạt tính laccaza ban đầu 1.000 U/L, nồng độ màu 100 mg/l. Mẫu đối chứng là mẫu chỉ có đệm và màu, mẫu thí nghiệm bổ sung dịch enzym thô và các nồng độ khác nhau của chất trung gian. Chất trung gian sử dụng trong thí nghiệm là ViO.

Kết quả cho thấy laccaza của FBV41 có thể loại màu thuốc nhuộm hoạt tính không cần chất trung gian như với màu Everzol Red LF-2B, Megafix Blue EBB, Drimaren Blue CLBR và Megafix tarquoise BES, có phụ thuộc chất trung gian như Megafix Red EBR, Nova Navy SG. Hiệu suất loại màu cao nhất đối với Everzol Red LF-2B là 96,5 % khi không có mặt chất trung gian sau 20 giờ, khi có mặt chất trung gian là ViO tốc độ loại màu diễn ra nhanh hơn nhưng hiệu suất cuối cùng tương đương với khi không có ViO, chỉ sau 15 phút đã loại được 92,8 % màu khi bổ sung 500 μM (Hình 28, 29). Màu CL-BR bị loại bỏ 97,4 % khi chỉ sử dụng laccaza thô (Hình 32, 33), màu EBB bị loại bỏ 96,3 % và 97,2 % tương ứng với mẫu không có ViO và có bổ sung 500 μM ViO (Hình 34, 35). Đối với màu BES khi bổ sung thêm ViO hiệu suất loại màu thấp hơn so với mẫu không bổ sung, khi bổ sung càng nhiều ViO thì hiệu suất loại màu bởi laccaza thô càng giảm, hiệu suất khi không bổ sung chất trung gian đạt 64,6 % (Hình 38, 39).

Laccaza của FBV41 có khả năng loại màu của EBR tuy nhiên khi bổ sung thêm chất trung gian thì hiệu suất loại màu tăng đáng kể (không bổ sung: 3,4 %; có bổ sung 500 μ M: 92,2 %) (Hình 30, 31). Nova Navy SG hoàn toàn không bị loại bỏ bởi laccaza từ FBV41 nhưng khi bổ sung 500 μ M enzym này loại được 90,5 % sau 48 giờ (Hình 36, 37). Chi tiết thông tin thời gian loại màu và hiệu suất loại màu được thể hiện tại bảng 5.

Bảng 5. Hiệu suất và thời gian loại một số màu bởi Lac thô từ chủng FBV41

Tên	Loại màu		Nguồn gốc	Hiệu quả (%)	Thời gian (giờ)	Chất trung gian (ViO μ M)
Acid red 266 (NY7)	Nhân tạo	azo	phòng thí nghiệm	91,1	24	300
				80	1	300
RBBR	Nhân tạo	anthraquinon	phòng thí nghiệm	91,2	48	500
Everzol Red LF-2B	Công nghiệp	phản ứng	Đông Xuân	96,5	24	-
				94,7	24	200
				91,4	0,25	200
Megafix Red EBR	Công nghiệp	phản ứng	Công ty 20/MOD	82,2	48	500
Drimaren Blue CLBR	Công nghiệp	phản ứng	Nam Định	92,6	0,25	-
				94,7	24	-
Megafix Blue EBB	Công nghiệp	phản ứng	Nam Định	97,2	24	500
				93,4	0,25	500
				96,3	24	-
Nova Navy SG	Công nghiệp	phản ứng	Công ty 20/MOD	90,5	48	500
Megafix tarquoise BES	Công nghiệp	phản ứng	Công ty 20/MOD	64,6	48	-

Ví dụ 17: Phân tách và tinh sạch laccaza izozyme của chủng FBV41

Dịch enzym thô được ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, sau đó được cô đặc bằng hệ thống màng lọc tiếp tuyến 8 kDa. Dịch enzym sau khi cô được đưa lên cột sắc ký trao đổi ion HiTrap Q HP 1 ml với tổng thể tích dịch enzym qua cột là 2 ml trong một lần chạy. Cột được cân bằng bởi dung dịch đệm natri axetat 20mM, độ pH=5,5. Thôi mẫu bằng muối NaCl có 0,05 M đến 0,3 M, bước nhảy giữa các nồng độ là 0,05M, mỗi nồng độ thu 10 phân đoạn với thể tích 1ml/phân đoạn. Tốc độ dòng chảy 1ml/phút khi cân bằng cột và tải mẫu, 1,5ml/ phút khi thôi mẫu. Hoạt tính enzym được xác định ở mỗi phân đoạn, kết quả cho thấy có 3 đỉnh hoạt tính ở các

phân đoạn số 2, số 22 và số 42, tương ứng với các bước nhảy có nồng độ muối lần lượt là 0,05; 0,1 và 0,25 M. Ba phân đoạn này được kiểm tra độ tinh sạch và khối lượng phân tử protein trên bản gel SDS-page và số lượng isozym có thể có bằng điện di không biến tính protein trên bản gel native-page (Hình 40). Kết quả hiển thị trên 2 bản gel cho thấy laccaza sinh ra bởi chủng FBV41 có 6 isozym, khối lượng phân tử của isoz1 đến isoz6 lần lượt là 59; 53; 50; 48; 45; 42 KDa (Hình 41).

Phân đoạn số 2, 3, 4 có hoạt tính cao nhất ở nồng độ muối NaCl 0,05 M được gộp chung và đưa lên cột lọc gel Sephadex G-75. Cột có kích thước 1,2 x 50 cm được cân bằng bằng dung dịch đệm natri axetat 20 mM, độ pH=5,5, tốc độ dòng chảy là 20 ml/giờ. Thu 40 phân đoạn, thể tích mỗi phân đoạn là 1ml. Hoạt tính enzym được xác định trong mỗi phân đoạn. Hoạt tính Lac của phân đoạn số 13 đạt cao nhất và dịch enzym của phân đoạn này được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di tương tự với các phân đoạn của sắc ký trao đổi ion nói trên.

Quá trình điện di được thực hiện với dòng điện có hiệu điện thế là 90V đối với bản điện di gel cô và 120V đối với bản điện di gel tách. Kết quả cho thấy isozym laccaza số 1 (Isoz1) của chủng FBV41 đã được tinh sạch và có kích thước khoảng 59 KDa.

Ví dụ 18: Xác định các đặc tính của laccaza isozym tinh sạch thu được từ chủng FBV41

Enzym thô và enzym laccaza tinh sạch sau quá trình tinh sạch được xác định sự ảnh hưởng của các nhân tố khác nhau đến độ bền và hoạt tính của enzym. Các nhân tố là độ pH, nhiệt độ, các cơ chất khác nhau, chất ức chế và ion kim loại.

Các quá trình thực hiện sắc ký, xác định sự ảnh hưởng của các nhân tố lên hoạt tính của hai loại enzym laccaza là các quá trình thông thường trong lĩnh vực enzym. Vì vậy, các chuyên gia trong lĩnh vực có thể dựa vào kiến thức của mình để thực hiện một cách dễ dàng.

pH hoạt động tối ưu được nghiên cứu trong giải pH từ 1 đến 10. Enzym laccaza tinh sạch và enzym thô thu được từ chủng FBV41 được ủ tại các giá trị độ pH khác

nhau và nằm trong khoảng từ 1 đến 10 để nghiên cứu pH bền. Xác định hoạt tính còn lại của enzym sau khi ủ trong khoảng thời gian từ 0 đến 3 giờ đối với các pH không bền và đến 48 giờ đối với pH bền. Cả Lac thô và isozym tinh sạch (Iso_1) đều hoạt động tốt nhất tại pH=3 với đệm Natri axetat và cơ chất ABTS. Cả hai loại enzym này đều bền ở pH kiềm, hoạt tính không giảm sau 48 giờ ủ với đệm pH=9 Glyxin – NaOH. Tại pH=6 với đệm PPB hoạt tính giảm nhẹ sau 3 giờ ủ (giảm 11% đối với enzym tinh sạch và 14 % đối với Lac thô). Enzym mất hoàn toàn hoạt tính khi ủ ở pH=3 sau 3 giờ và mất hoạt tính ngay lập tức khi ủ ở pH=1.

Để khảo sát nhiệt độ tối ưu của laccaza tinh sạch và Lac thô thu được từ chủng FBV41, phản ứng của các enzym này được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau nằm trong khoảng từ 30⁰C đến 90⁰C. Khi tăng nhiệt độ từ 30 đến 50 °C, hoạt tính của laccaza tăng dần từ 67 đến 90 %. Hoạt tính đạt cao nhất tại 55 °C. Khi nhiệt độ tăng quá 55 °C thì hoạt tính laccaza bắt đầu giảm. Ở 70°C, hoạt tính giảm nhẹ còn 96% nhưng đến 80°C thì giảm mạnh và chỉ còn 7% ở 90°C.

Ví dụ 19: Tiền xử lý rom rạ sử dụng laccaza thô từ FBV41

Rom nghiền nhỏ (<0,3 cm) được sử dụng cho quá trình thí nghiệm. Với laccaza từ chủng FBV41, thí nghiệm được tiến hành với 5 g rom trong đệm natri axetat 20mM; pH 5; 0,27 g CTEX và 0,03 g HTEX, bổ sung laccaza với hoạt tính là 29.000 U/L. Tổng thể tích phản ứng là 100 ml. Mẫu đối chứng là mẫu tương tự nhưng không bổ sung laccaza.

Mẫu được để tĩnh ở 50⁰C, lấy mẫu ban đầu và sau mỗi ngày để xác định hoạt tính laccaza còn lại và hàm lượng glucoza được tạo ra. Hàm lượng đường tạo ra được xác định theo phương pháp của Miller et al (1959).

Thí nghiệm tiền xử lý rom rạ bằng laccaza thô từ chủng FBV41 đã được tiến hành (Hình 42). Hàm lượng đường khử và hoạt tính laccaza được xác định sau mỗi ngày và thể hiện tại bảng 6.

Bảng 6. Hàm lượng đường khử tạo ra khi xử lý rơm rạ có và không có enzym laccaza từ chủng nấm FBV41 sau 5 ngày

Mẫu	Hàm lượng đường khử (mg/mL)					Hiệu suất (%)
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	
Không enzym	-	-	-	-	-	-
CTEX+HTEX	3,52	3,50	2,94	2,97	3,32	100
Laccaza(FBV41)+CTEX+HTEX	5,21	2,67	2,80	2,73	2,79	148

Trong đó: CTEX: Xenlulaza
HTEX: Hemizenlulaza

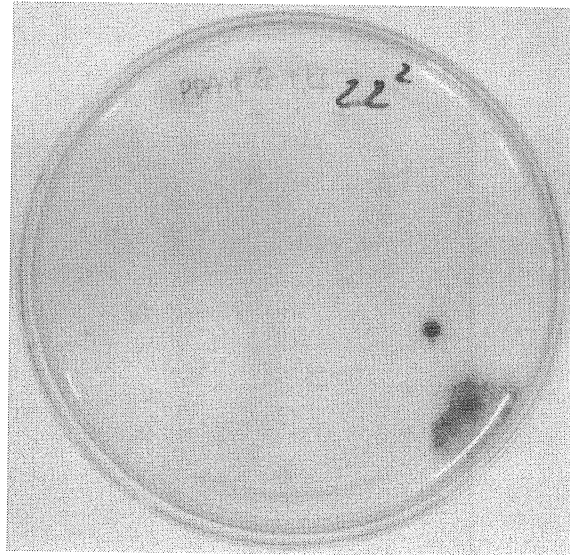
Bảng 7. Hoạt tính laccaza sau mỗi ngày xử lý

Mẫu	Hoạt tính laccaza (U/L)					
	Ban đầu	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày
Laccaza (FBV41)+CTEX+HTEX	29.000	13.672	9.390	2.588	1.430	1.336
Laccaza (FRHY3)+CTEX+HTEX	2.000	822	162	61	41	25

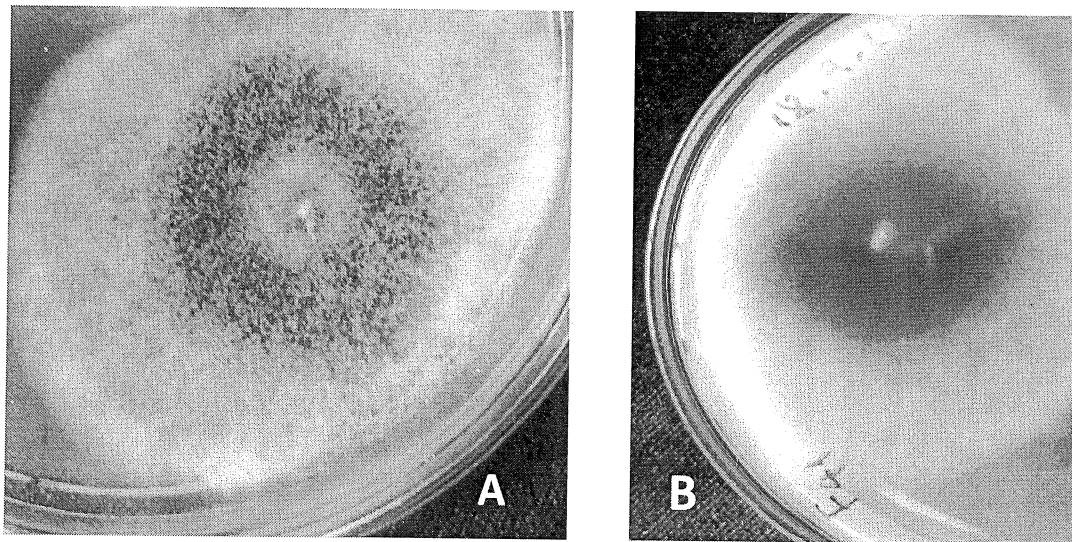
Bảng 7 cho thấy hàm lượng đường khử sau quá trình xử lý rơm trong thí nghiệm có sử dụng laccaza, CTEX, HTEX cao hơn 1,48 - 1,94 lần khi chỉ sử dụng CTEX và HTEX. Với laccaza từ FBV41 đạt cao nhất 5,21 mg/ml sau 1 ngày. Hoạt tính laccaza từ FBV41 giảm dần theo các ngày do chúng đã được sử dụng và tiêu hao trong quá trình xử lý rơm (bảng 7).

YÊU CẦU BẢO HỘ

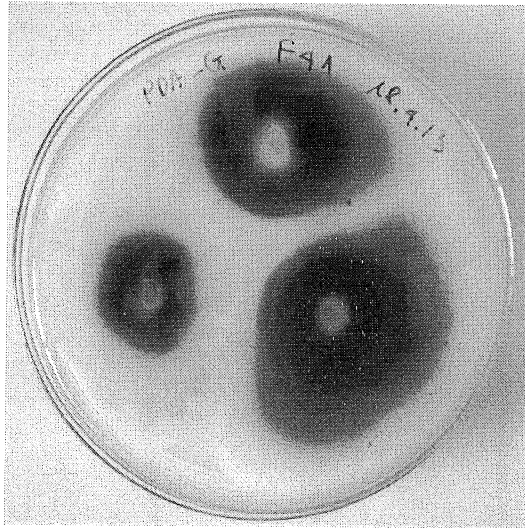
1. Chủng nấm *Cerrena* sp. FBV41 thuần khiết về mặt sinh học, trong đó chủng nấm này có đoạn gen mã hoá 18S rARN có kích thước 491 bp, trình tự được thể hiện ở SEQ ID NO: 1 và được đăng ký trên GenBank với mã số KJ471472, có đoạn gen mã hoá đoạn ITS1-5,8S rARN-ITS2 có kích thước 468 bp và trình tự được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 và có khả năng sinh tổng hợp enzym laccaza.
2. Chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường chứa dịch nuôi cấy chủng nấm *Cerrena* sp. FBV41 theo điểm 1, trong đó dịch nuôi cấy chủng nấm *Cerrena* sp. FBV41 được thu ở điều kiện nuôi cấy thu enzym laccaza, và xử lý môi trường là khử màu trong nước thải dệt nhuộm hoặc tiền xử lý rơm rạ.



Hình 1



Hình 2



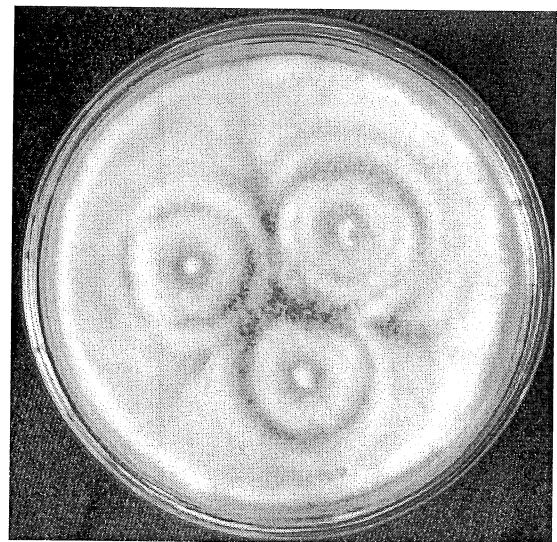
A1



A2

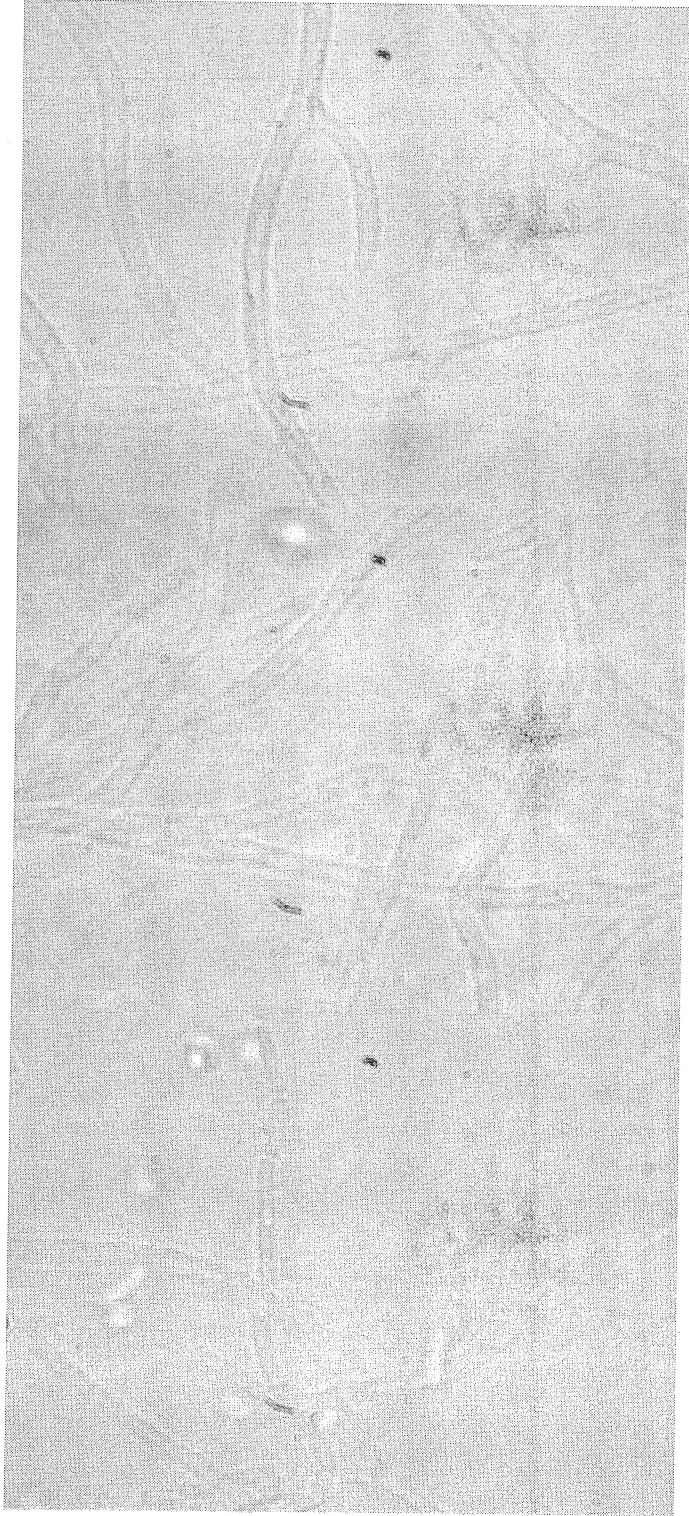


B1

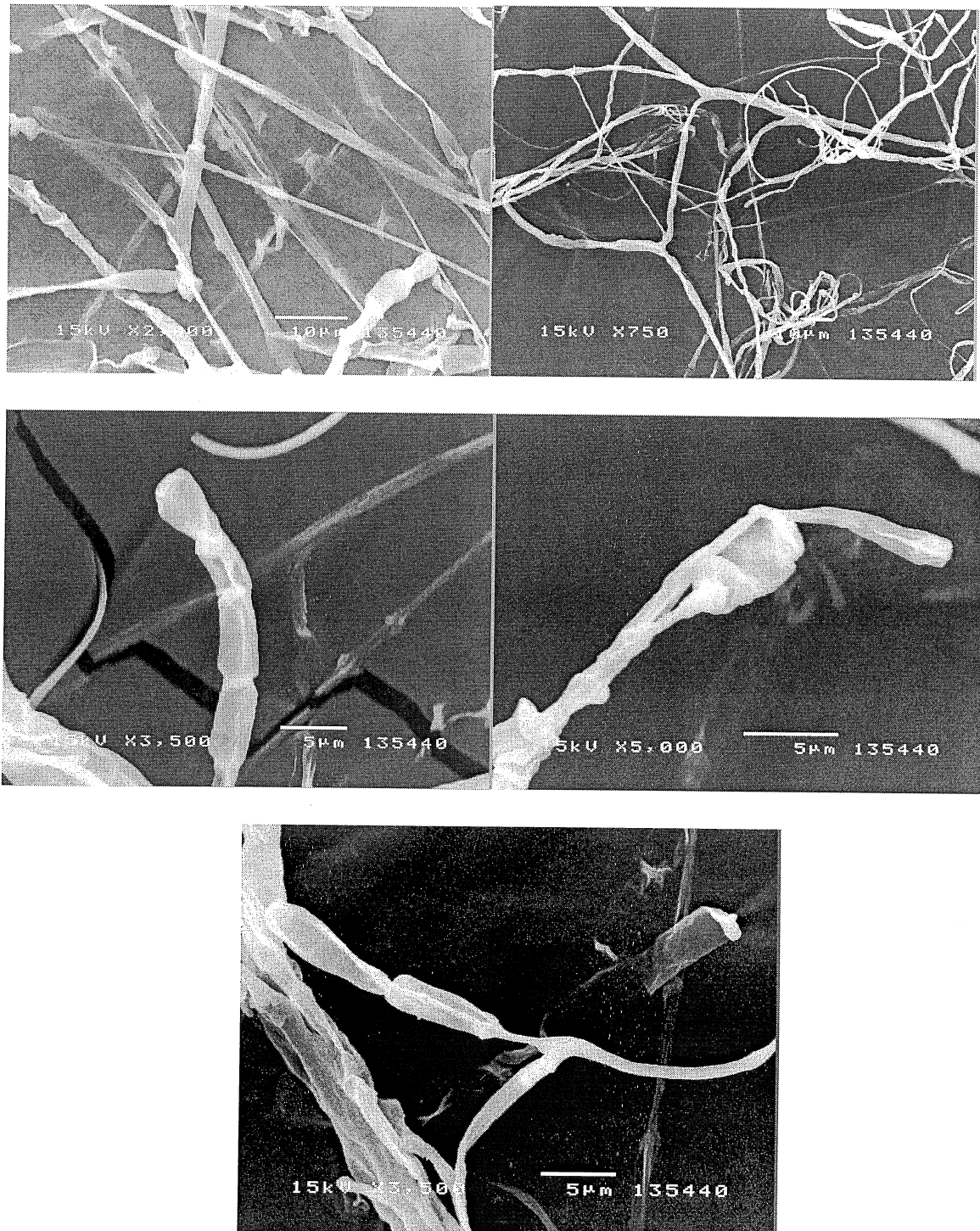


B2

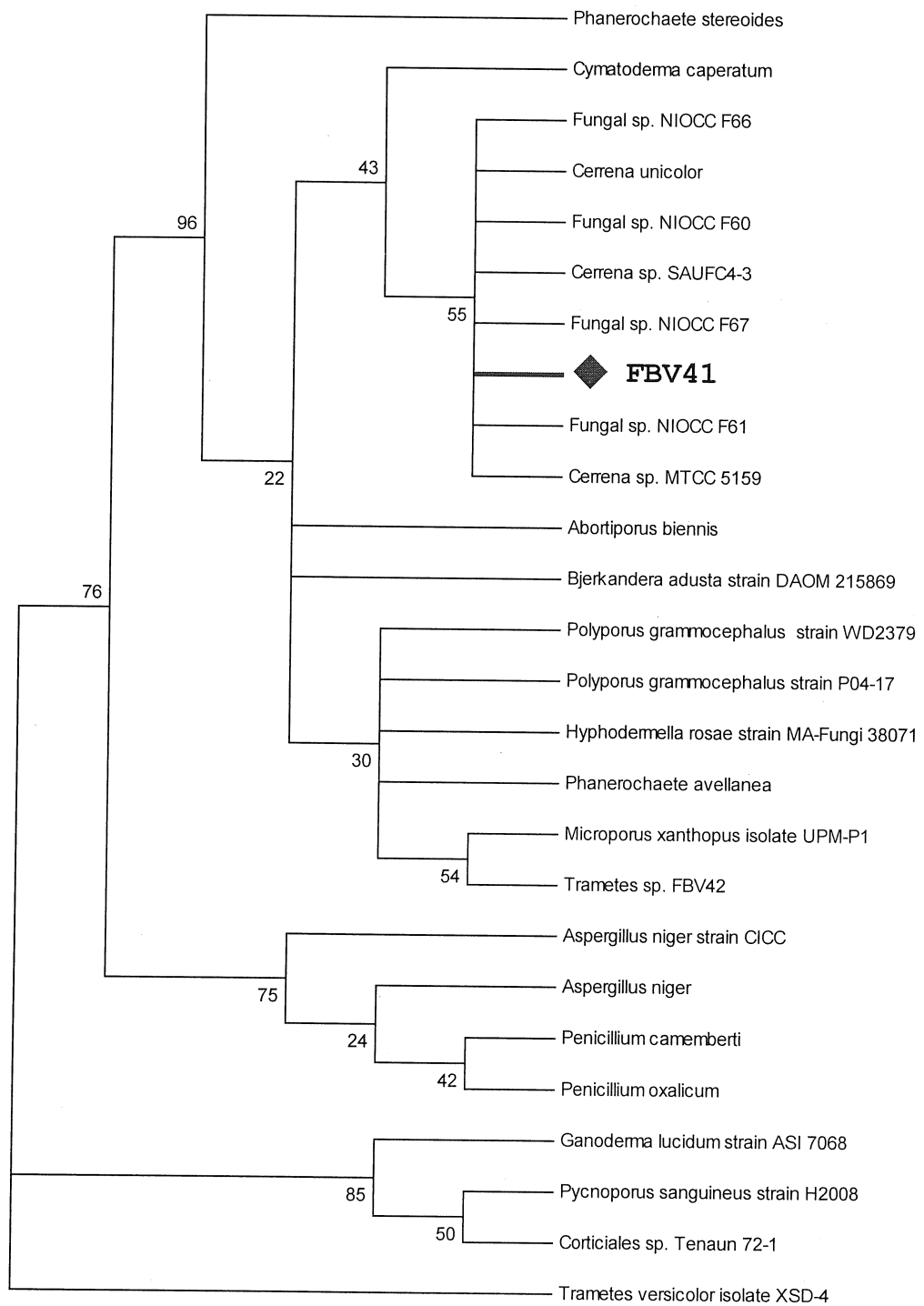
Hình 3



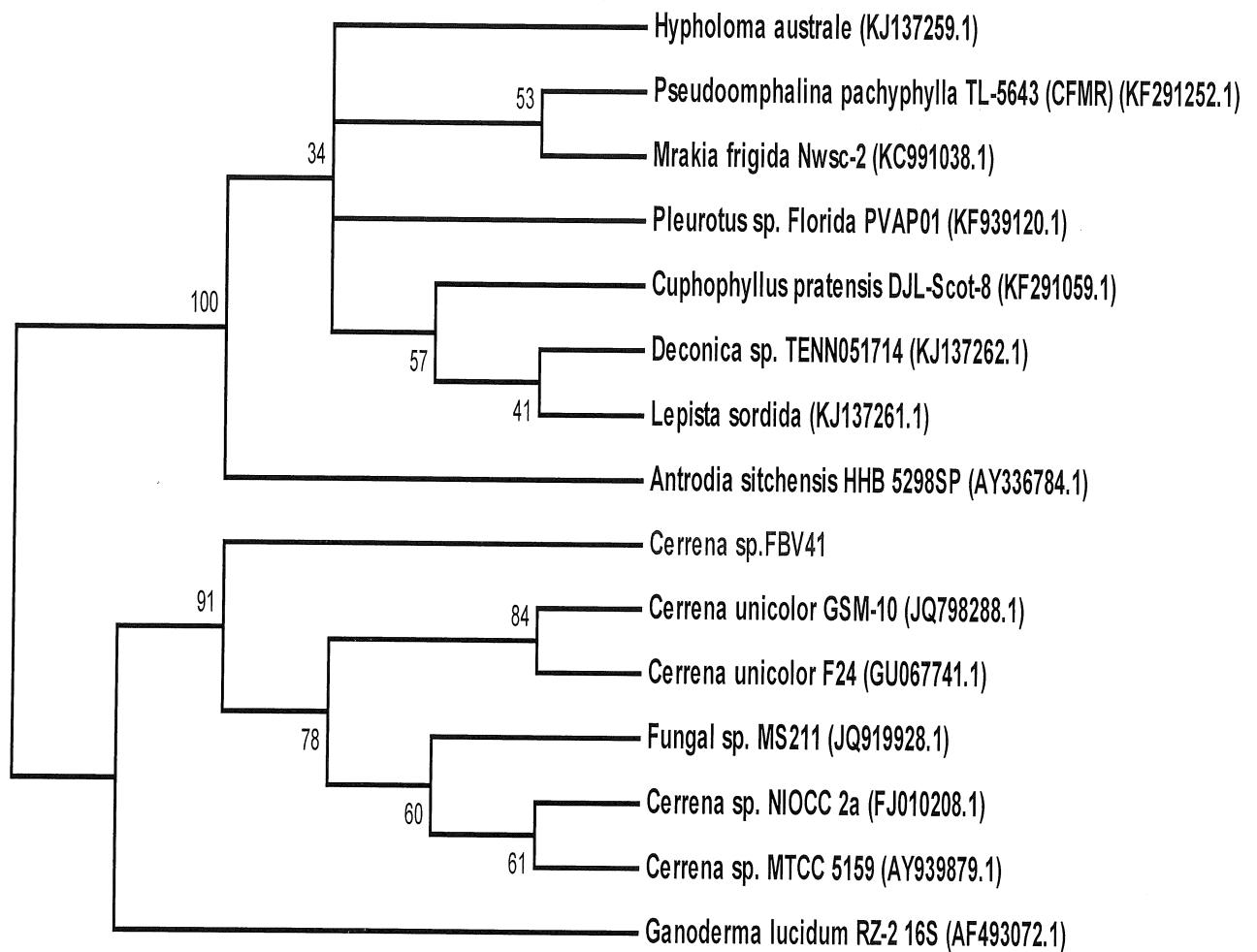
Hình 4



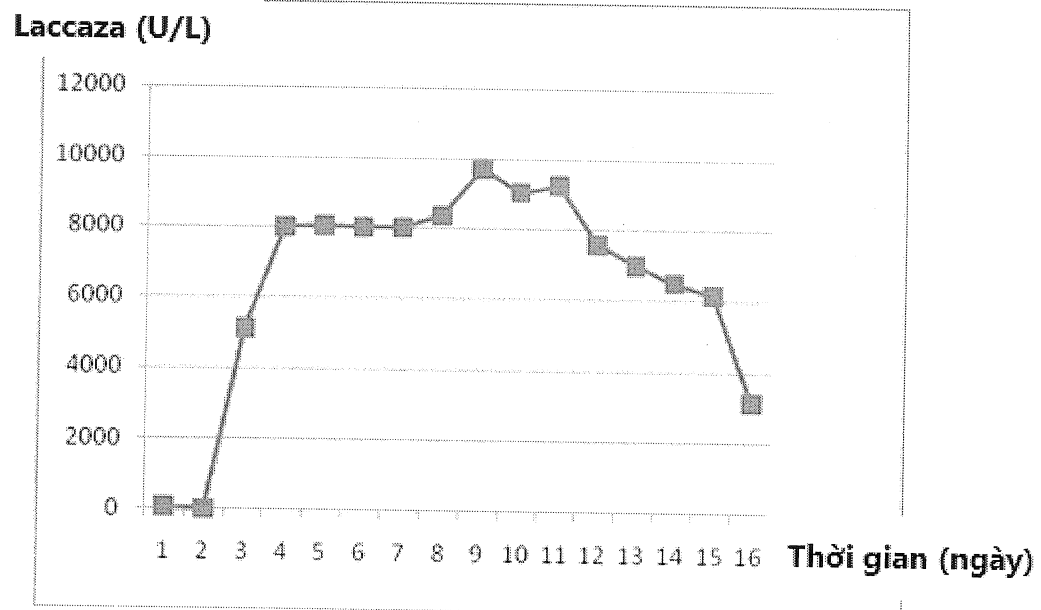
Hình 5



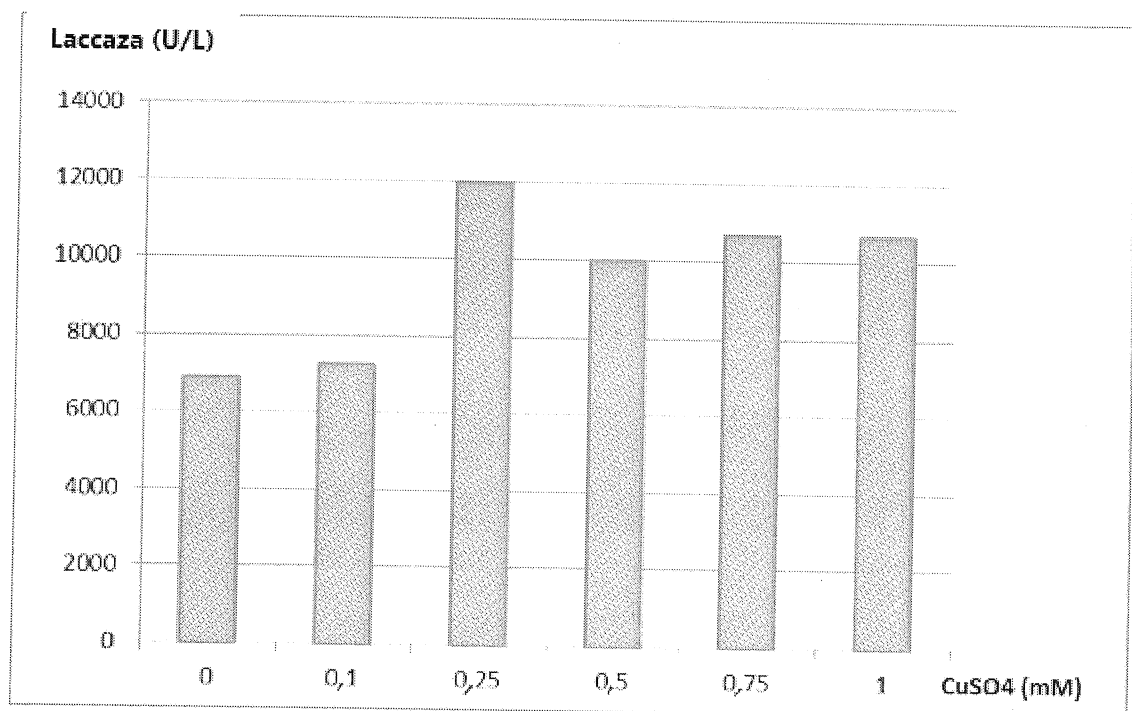
Hình 6



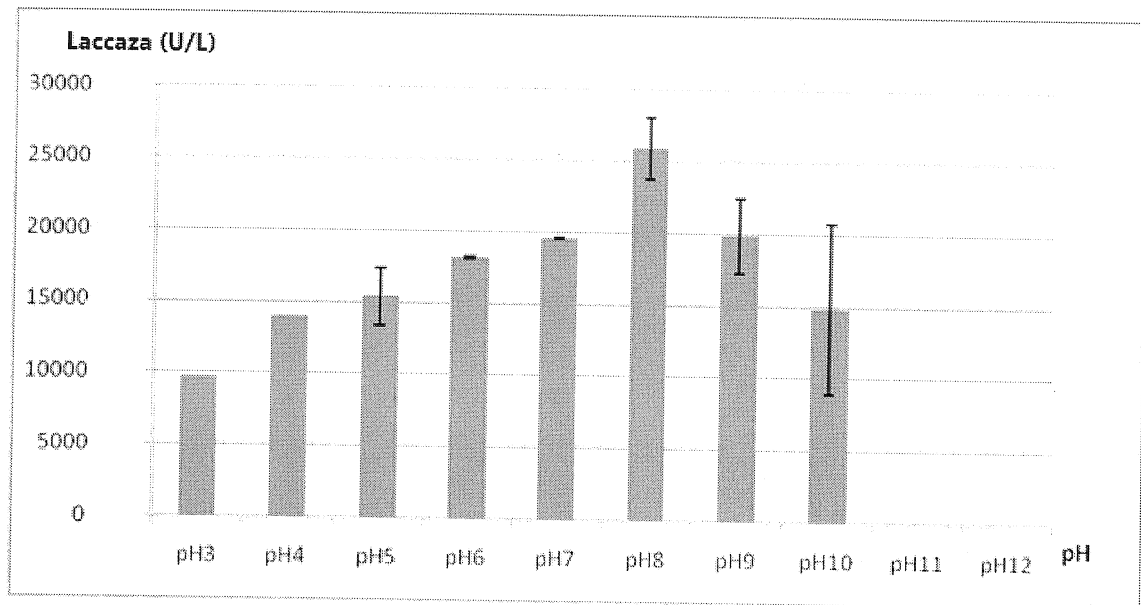
Hình 7



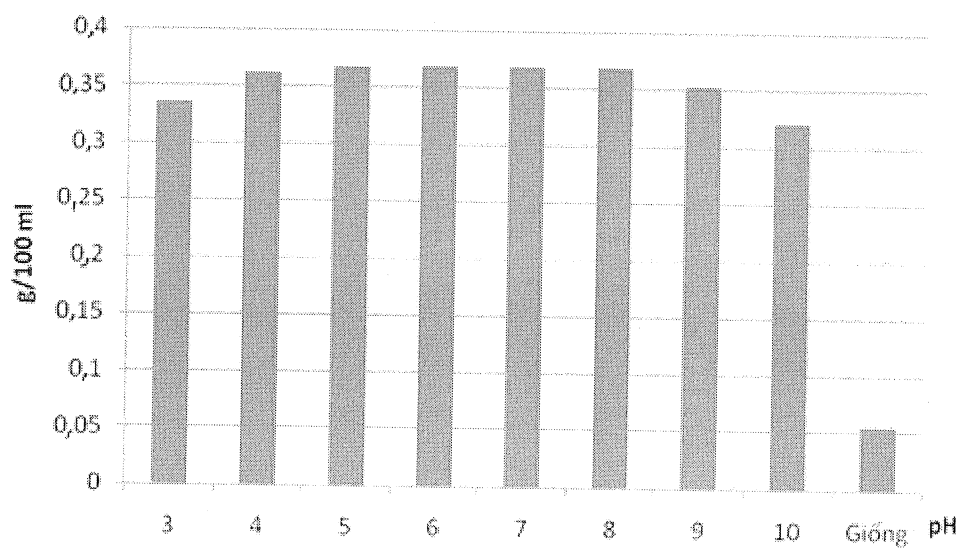
Hình 8



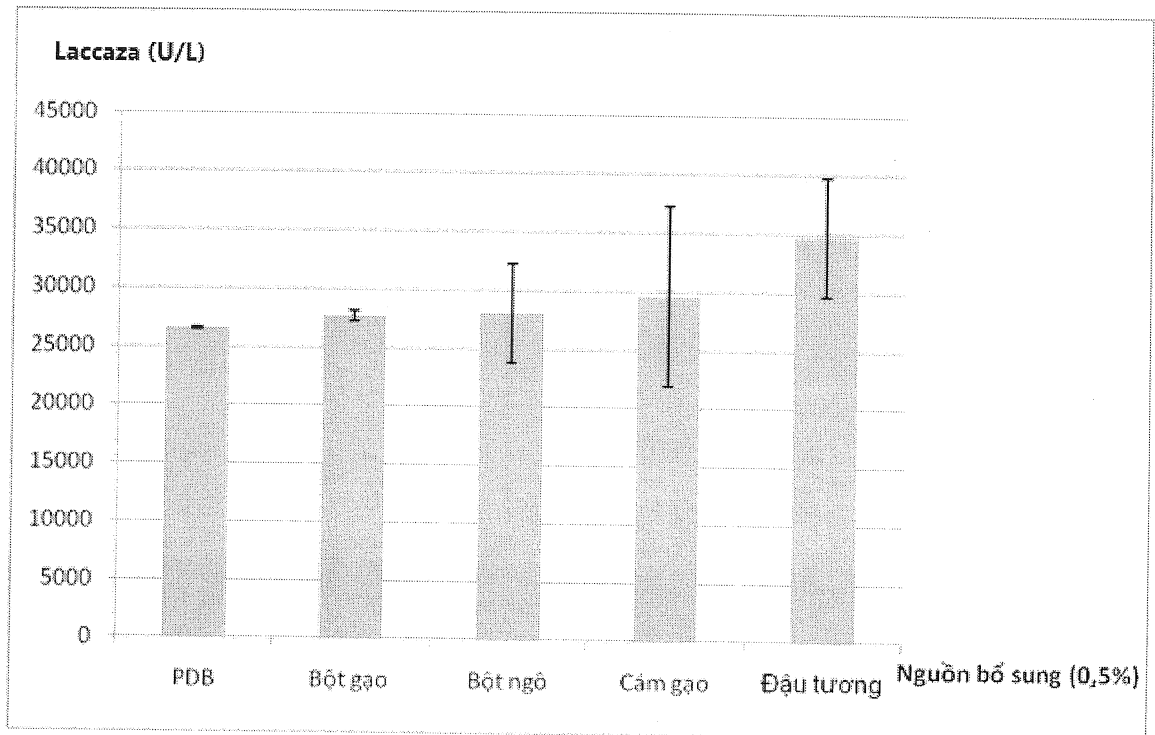
Hình 9



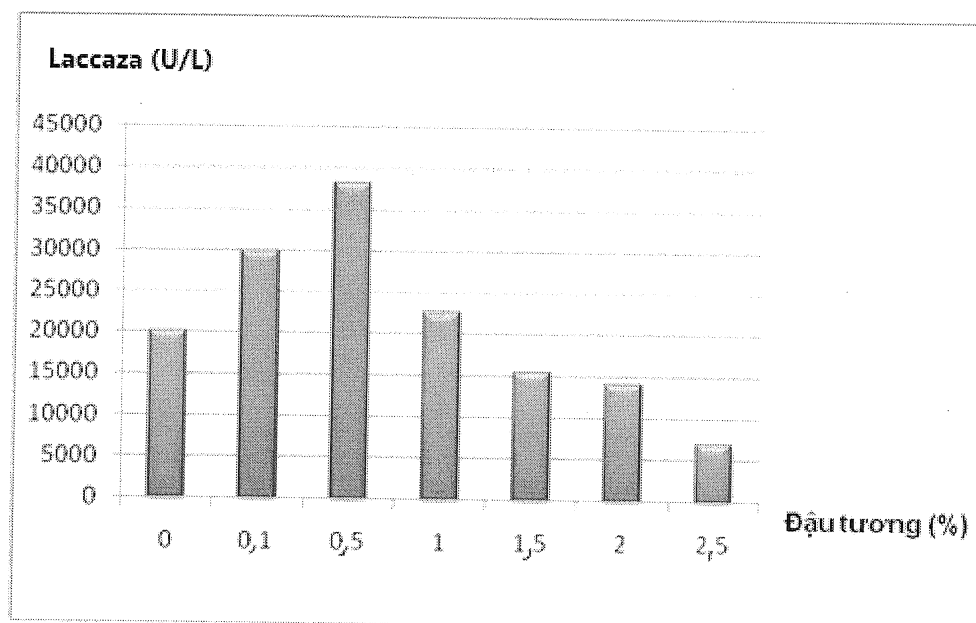
Hình 10



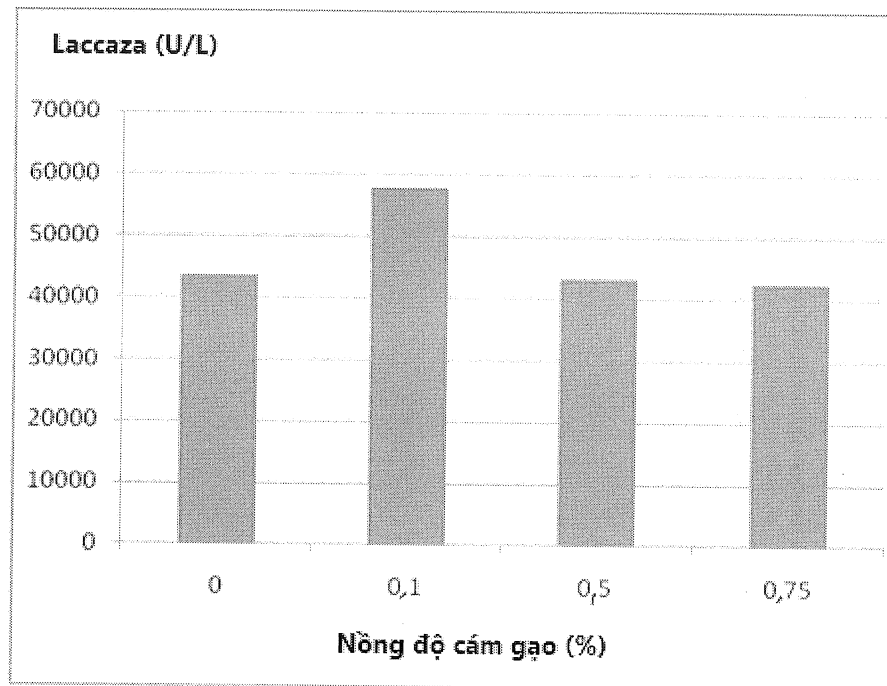
Hình 11



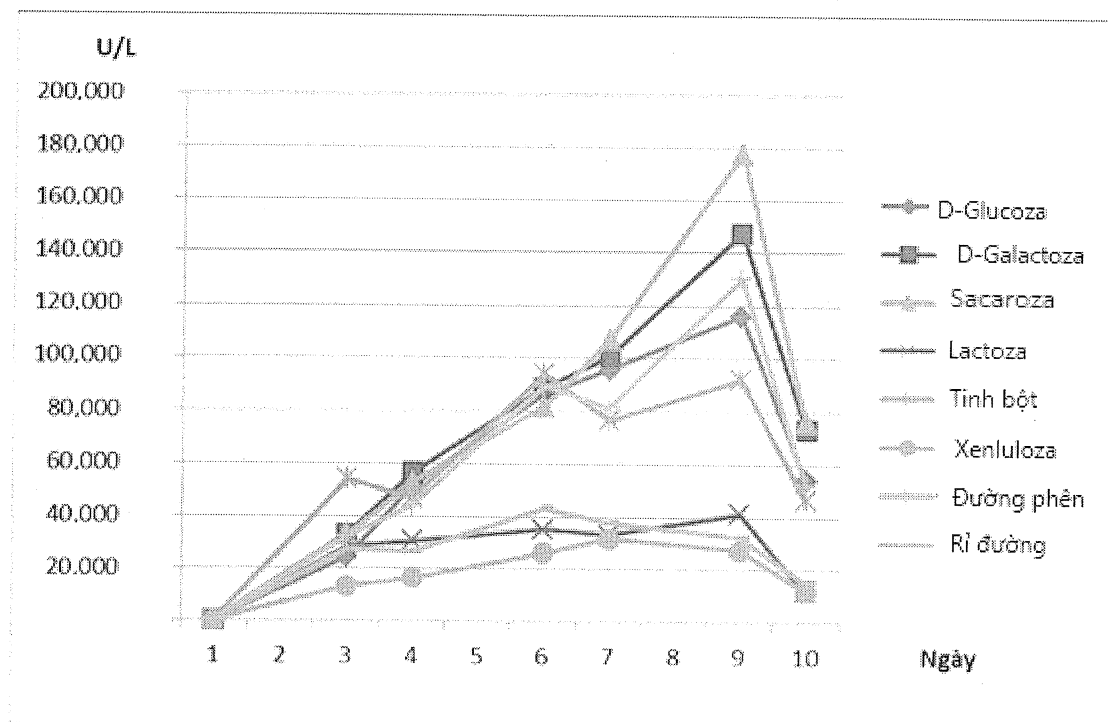
Hình 12



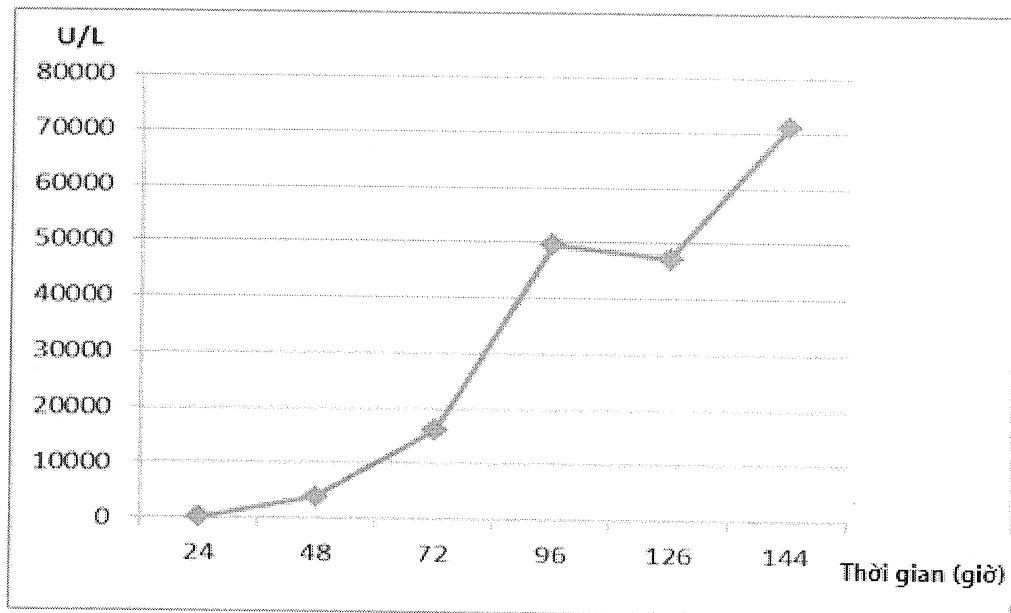
Hình 13



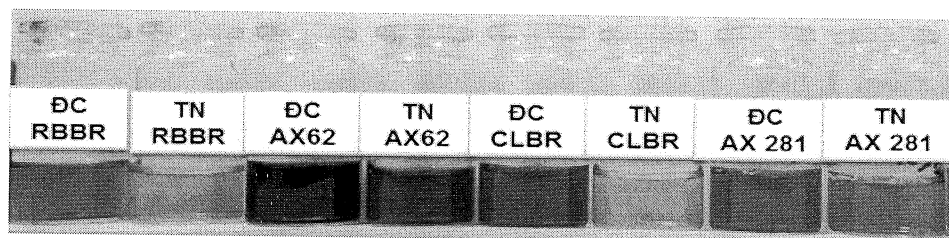
Hình 14



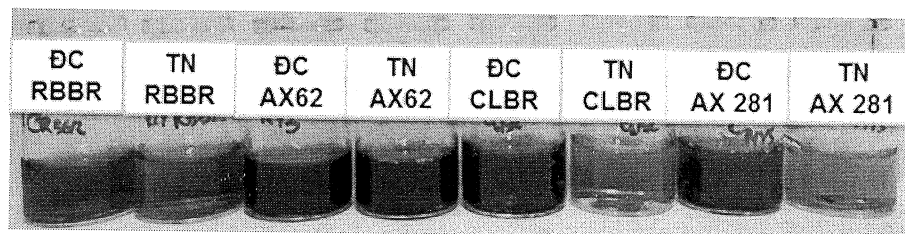
Hình 15



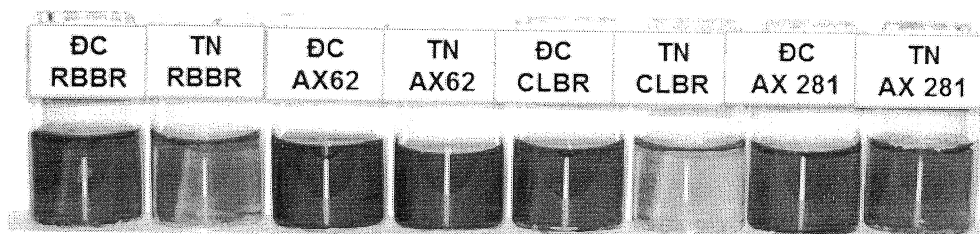
Hình 16



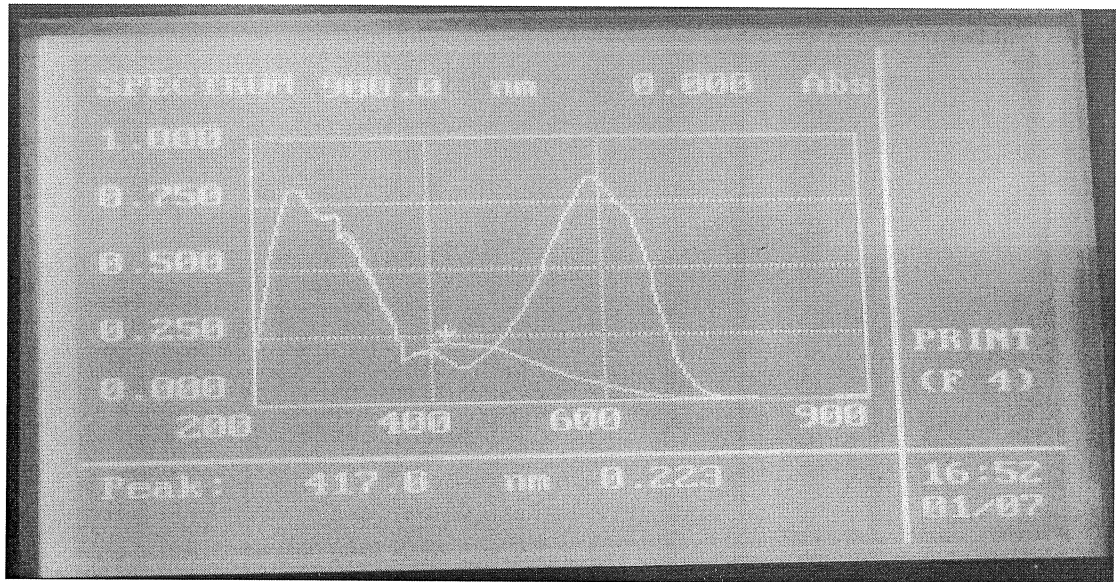
Hình 17



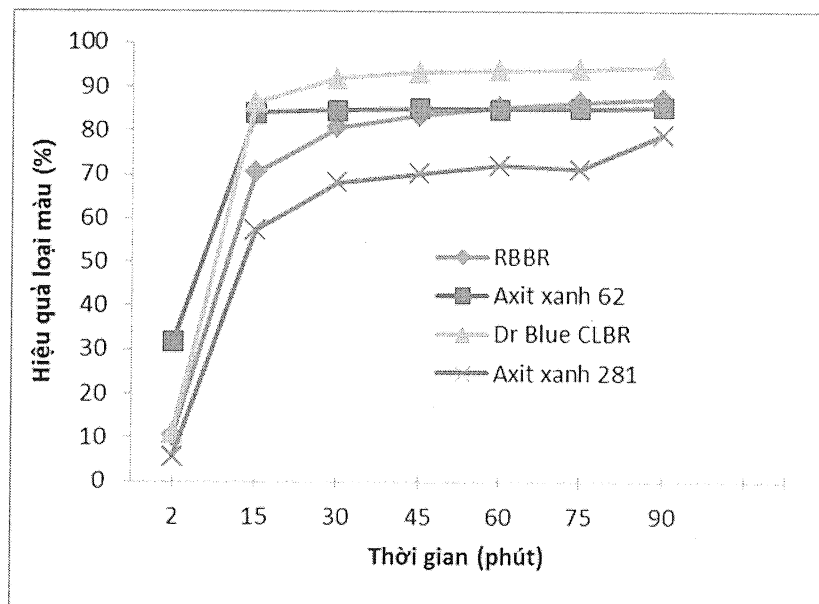
Hình 18



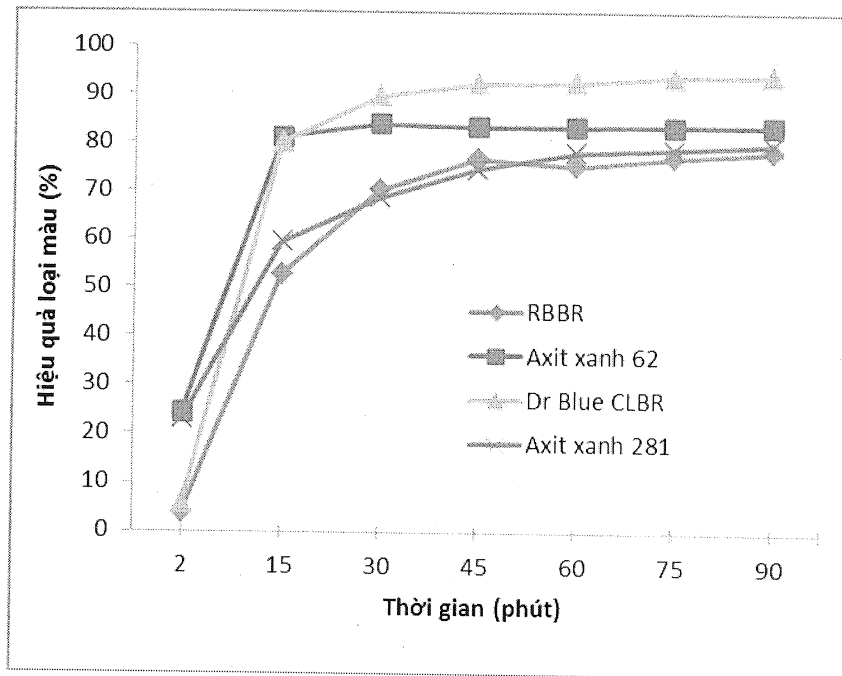
Hình 19



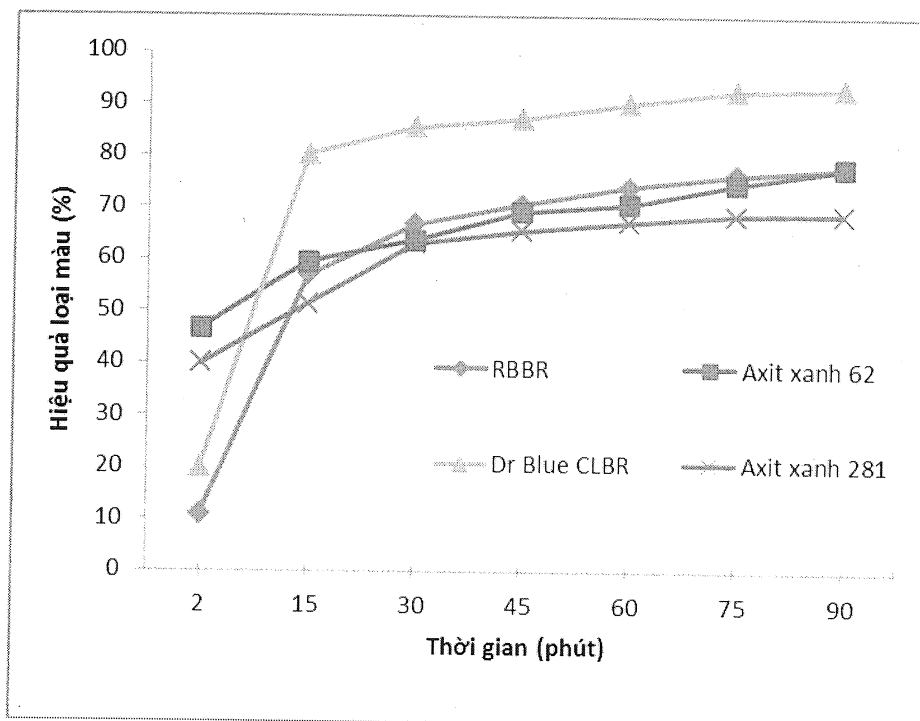
Hình 20



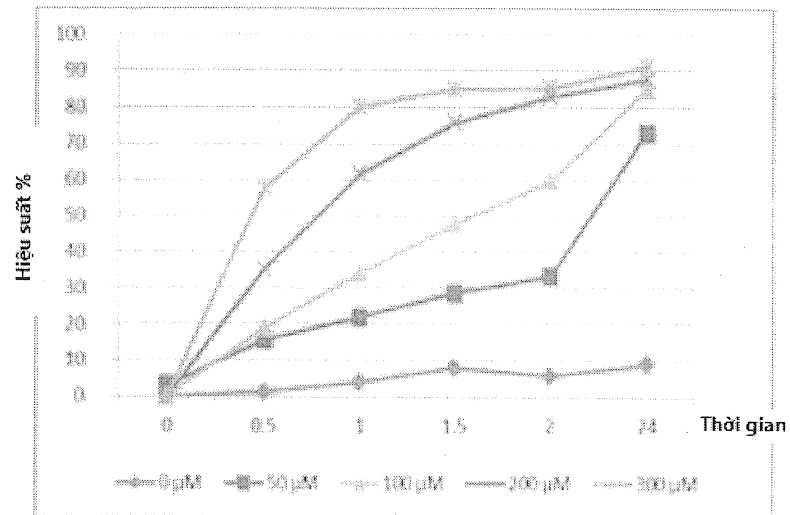
Hình 21



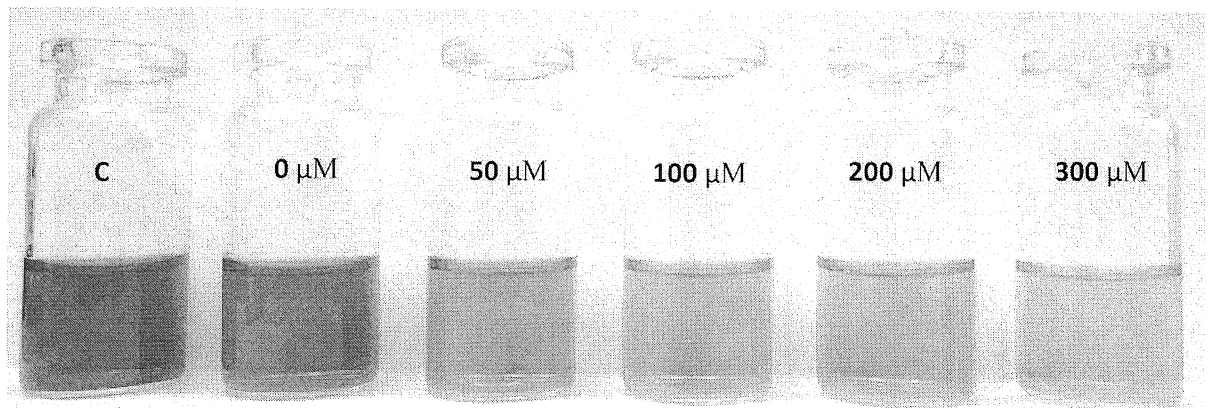
Hình 22



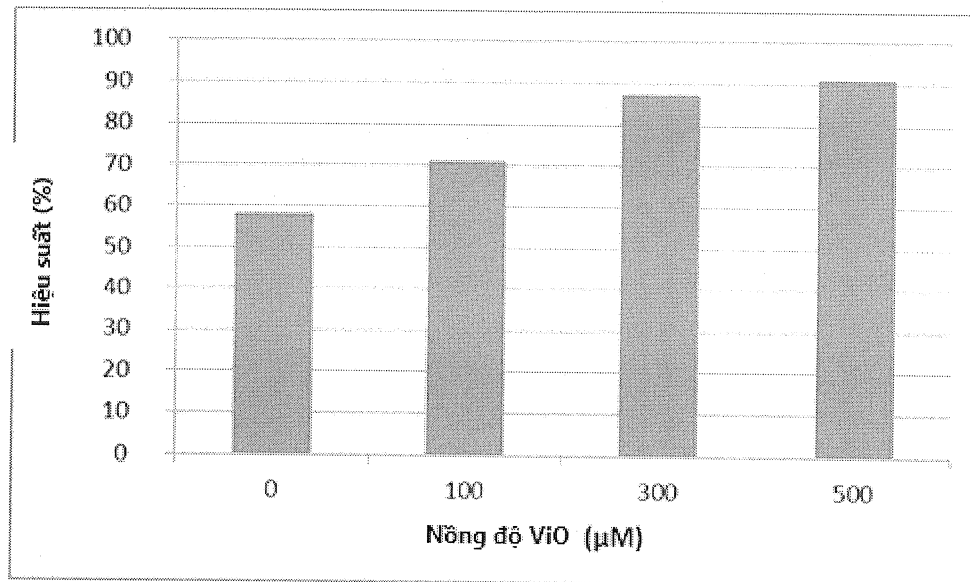
Hình 23



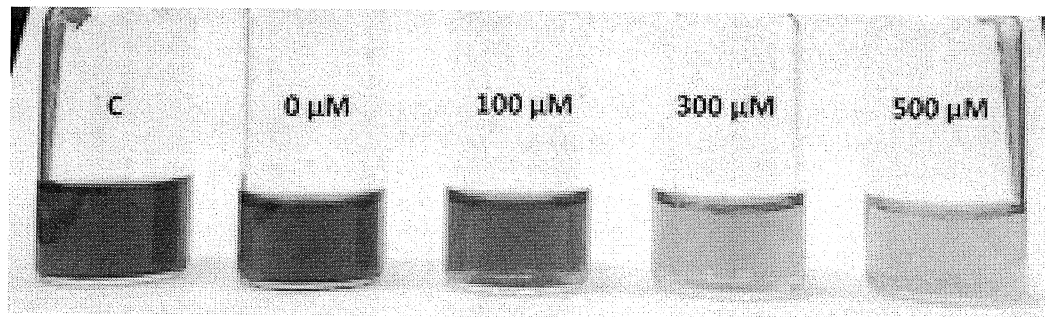
Hình 24



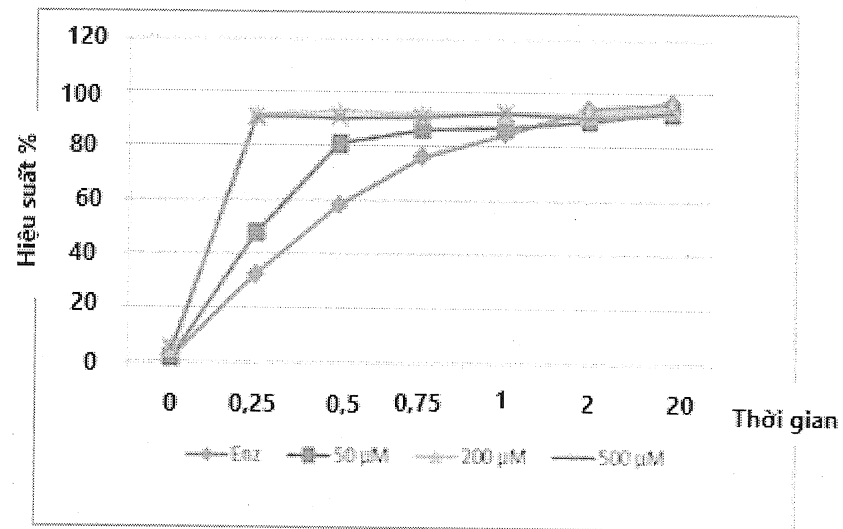
Hình 25



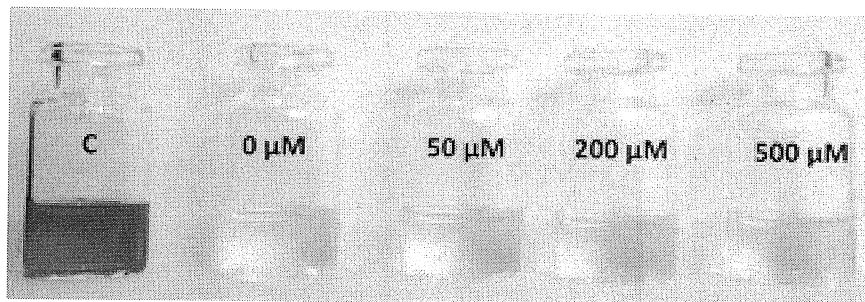
Hình 26



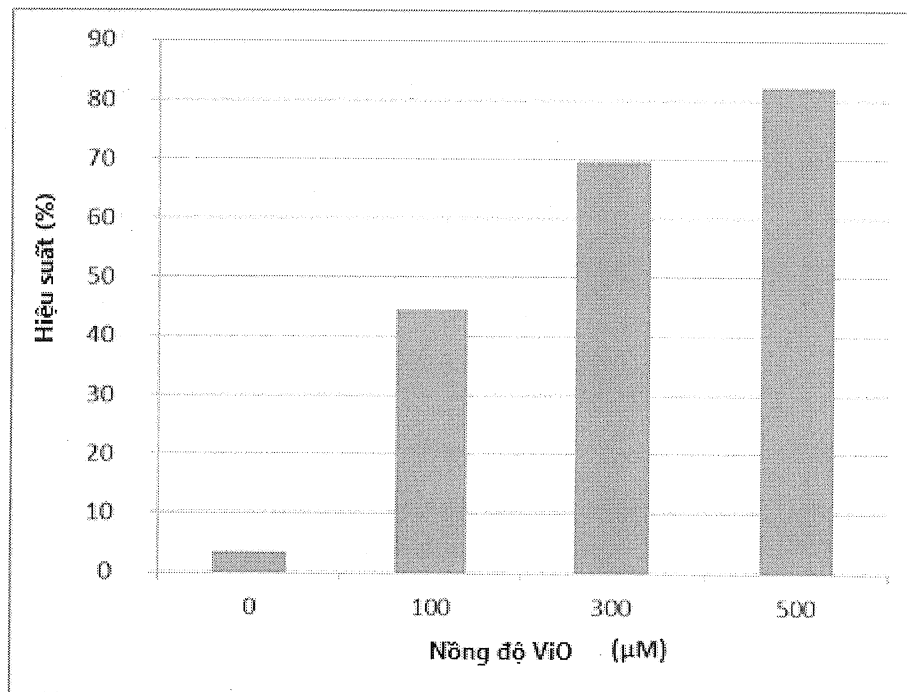
Hình 27



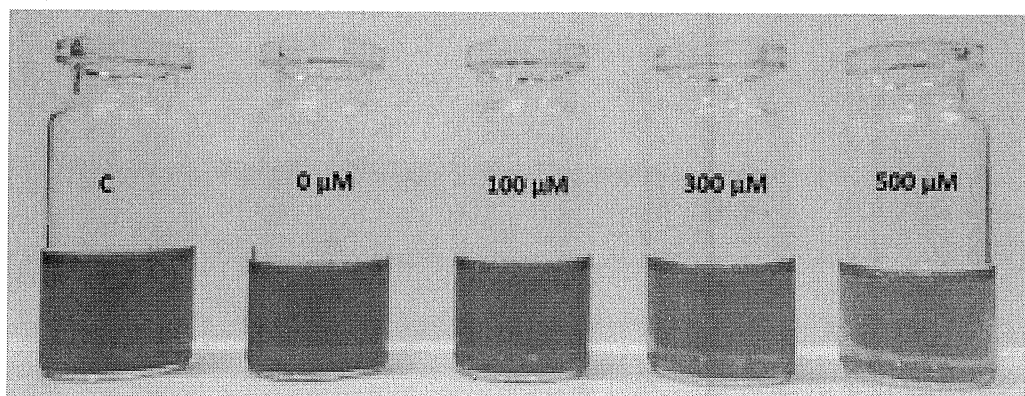
Hình 28



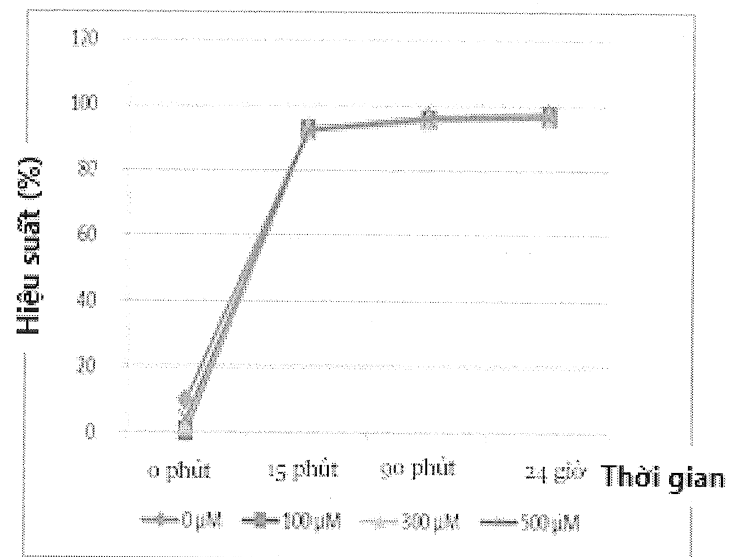
Hình 29



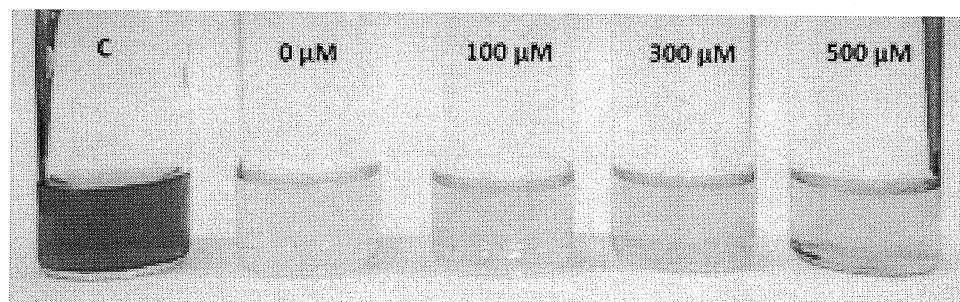
Hình 30



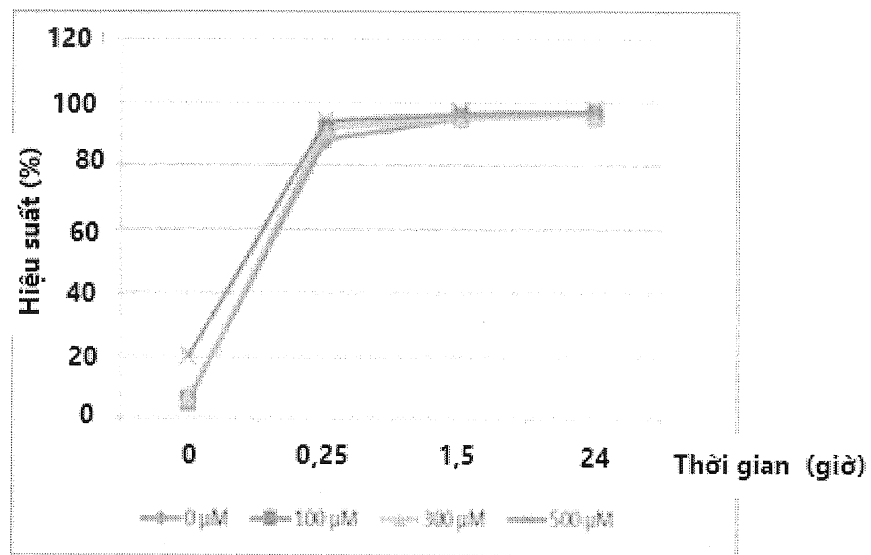
Hình 31



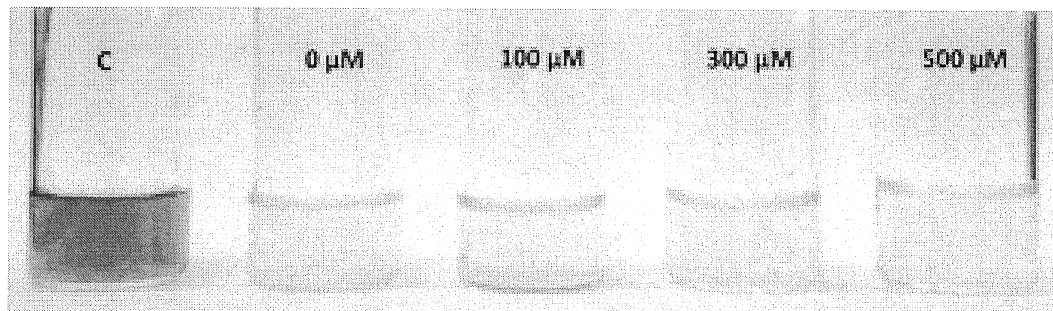
Hình 32



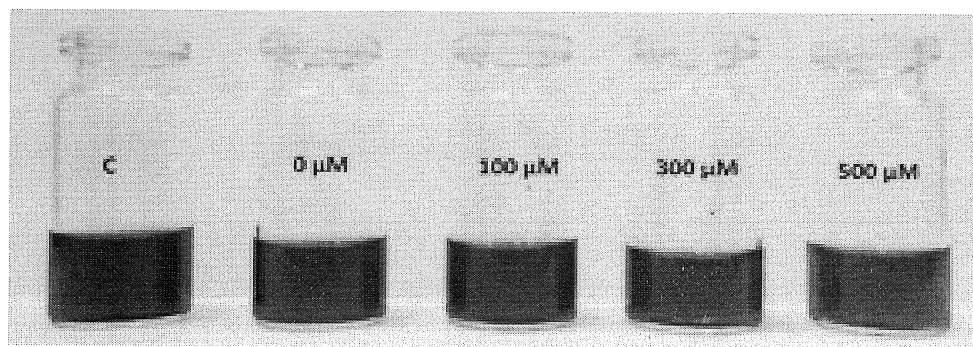
Hình 33



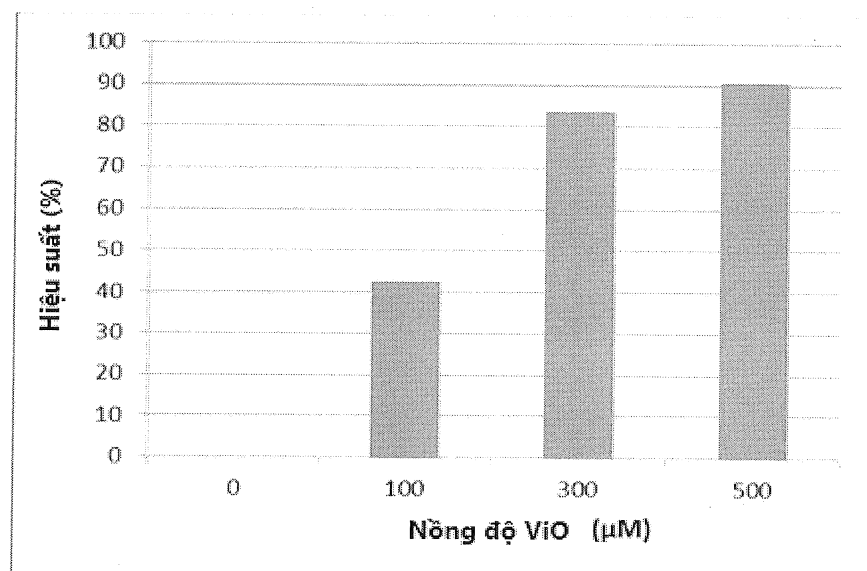
Hình 34



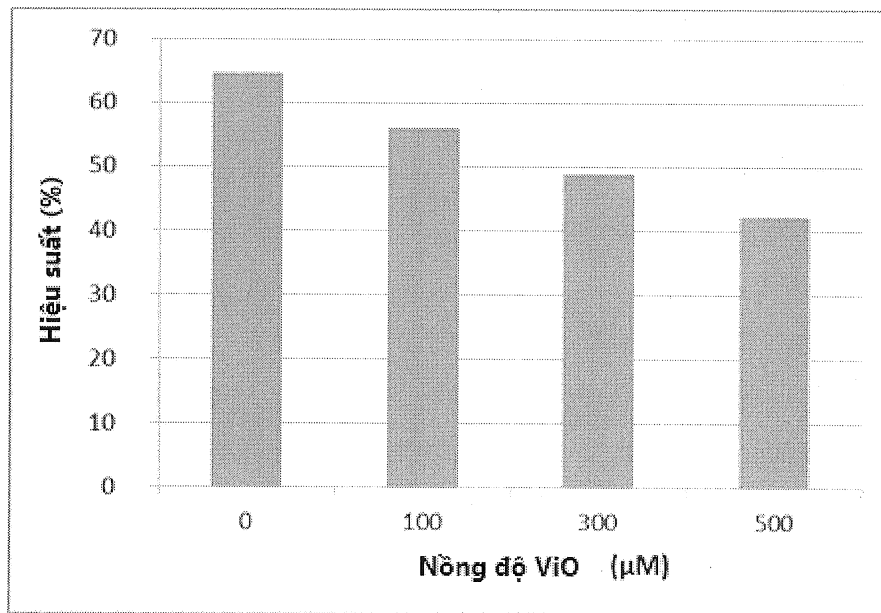
Hình 35



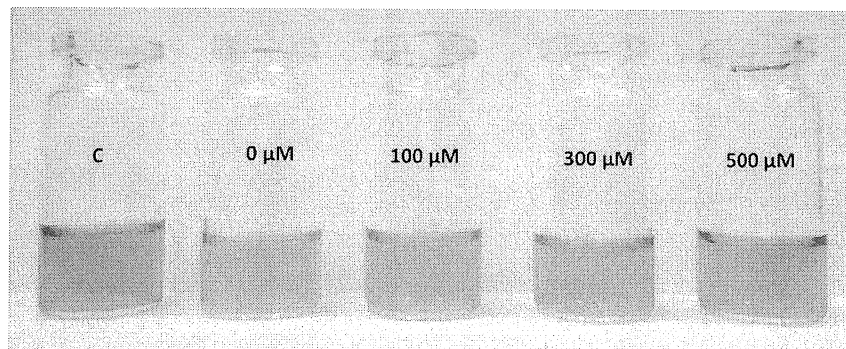
Hình 36



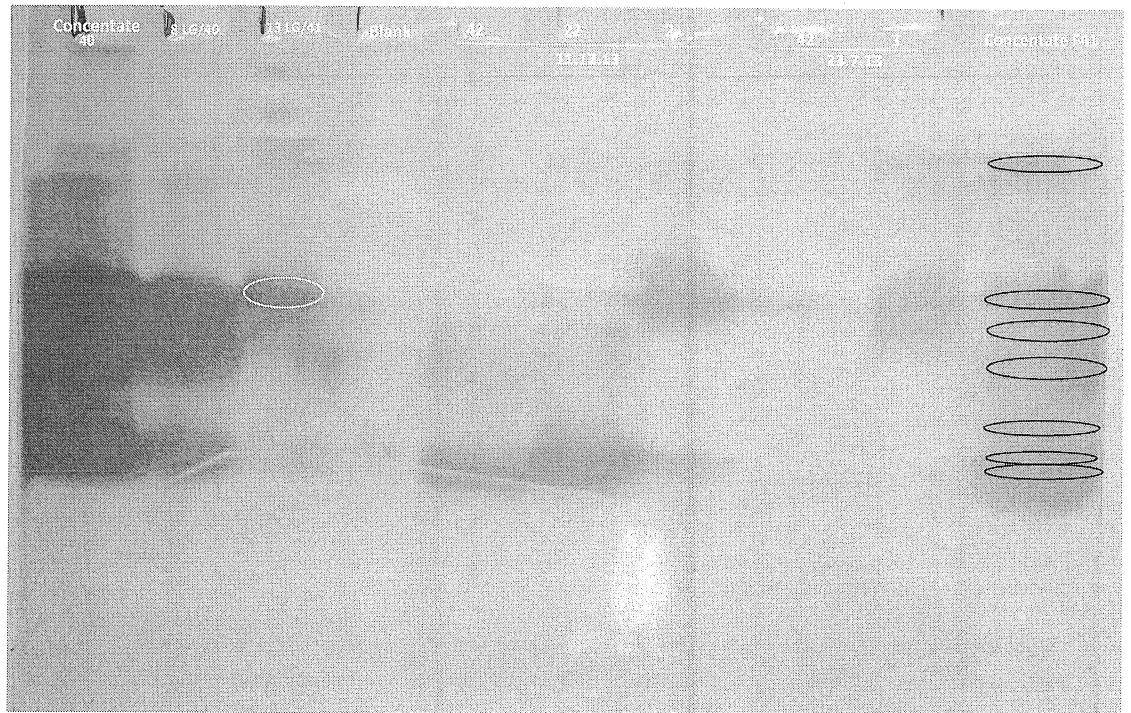
Hình 37



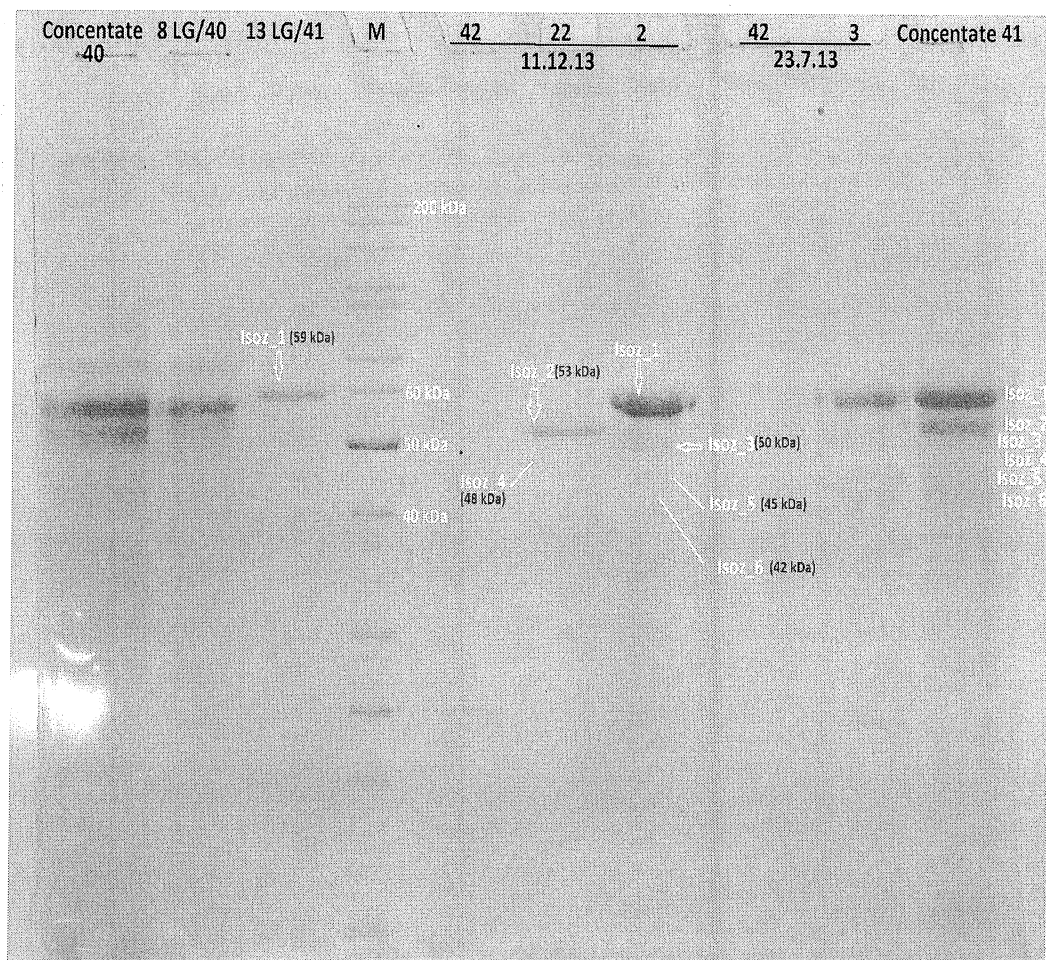
Hình 38



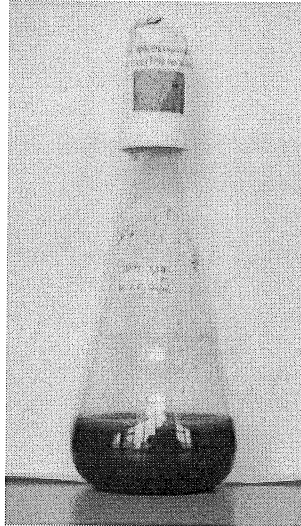
Hình 39



Hình 40



Hình 41



Hình 42

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- <120> **Chủng nấm *Cerrena* sp. FBV41 thuần khiết về mặt sinh học và chế phẩm vi sinh để xử lý môi trường chứa dịch nuôi cấy chủng nấm này**

<160> 2

<210> 1

<211> 491

<212> ARN

<213> *Cerrena* sp. FBV41

<400> 1

```

1 taataacttc togaatcgca tggccttgtg ccggcgatgc ttcattcaaa tatctgccct
61 atcaactttc gatggttaga tagaggccta ccatggtttc aacgggtaac ggggaataag
121 ggttcgattc cggagaggga gcctgagaaa cgctaccac atccaaggaa ggcagcaggc
181 gcgcaaatta cccaatccca atacggggag gtagtgacaa taaataacaa tatagggctc
241 ttctgggtct tataattgga atgagtacaa tttaaatccc ttaacgagga acaattggag
301 ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tcagctcca atagcgtata ttaaagttgt
361 tgcagttaaa aagctcgtag ttgaacttca gactcggctg ggcggtctgc ctaacggtat
421 gtactgtccg gctgggtctt acctcttggg gagccggtat gctctttact ggggtgtgccg
481 gggaacggaa t

```

<210> 2

<211> 468

<212> ARN

<213> *Cerrena* sp. FBV41

<400> 2

```

1 acattaatga attttatggc ggaattgtag ctggcccaaa ccgggcatgt gcacattctg
61 ttcattccat tctcatacac ctctgtgcac ttacataggt ttggtatag aaaaggtctt
121 tattgacttt ggaaatactg acctatgctt ttataaacgc ttcagtttta gaatgtcatc
181 cgcgtataac gcaataaata caactttcag caacggatct cttggctctc gcatcgatga
241 agaacgcagc gatccccgtc ggcgaactcg gtaatttgcg cgcctgtctc cttctttgga
301 tgtggttagcc gtttctcagg ttccttctcc ggattcgaac cctttttccc cggtaccgt
361 tgaaaccatg gtaggcctct atcctacat cgaaagtga tagggcagat atttgaatga
421 agcatgcgcg gcacaaggcc atgcgattcg agaagttatt atgagtcg

```