



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

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

(11)



2-0002588

(51)⁷ **C12N 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00341

(22) 06/11/2017

(45) 25/03/2021 396

(43) 27/05/2019 374A

(73) Viện Công nghiệp Giấy và Xenlulo (VN)

59 Vũ Trọng Phụng, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Cao Văn Sơn (VN); Phan Thị Hồng Thảo (VN); Nguyễn Thị Hồng Liên (VN);
Nguyễn Văn Hiếu (VN); Hy Tuấn Anh (VN).

(54) **CHŨNG NẤM MỤC TRẮNG TRAMETES ELEGANS CP23**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp enzym lignin peroxydaza đạt 1711 nkat/L và mangan peroxydaza 1492 nkat/L, sinh trưởng nhanh và mạnh trên cơ chất rơm, nguyên liệu rơm rạ sau 30 ngày nuôi cấy với nấm CP23 được nghiền tạo thành bột giấy sinh học, bột giấy đạt hiệu suất thu hồi bột (%) là 63,8, chiều dài đứt là 3020 m, chỉ số độ bền xé 3,1 mN.m²/g, chỉ số độ chịu bụi 1,3 kPa.m²/g, hàm lượng lignin 18,5% đạt tiêu chuẩn bột giấy cho sản xuất bao bì, chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước là 659 bp và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số KT763333 với tên phân loại là *Trametes elegans* CP23.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến Chủng nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 thu nhận tại rừng Cúc Phương, Ninh Bình, Việt Nam và khảo sát khả năng sinh enzym phân hủy lignin và khả năng sử dụng trong xử lý nguyên liệu rơm rạ của chủng nấm mục trắng nhằm ứng dụng trong tạo bột giấy sinh học.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việt Nam là một nước nông nghiệp nên nguồn phụ phẩm nông nghiệp rất dồi dào. Số liệu từ các báo cáo tổng hợp của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn cho thấy, lượng phế phụ phẩm nông nghiệp hàng năm lên đến trăm triệu tấn/năm từ quá trình sản xuất lúa gạo như rơm rạ, hàng chục triệu tấn bã mía từ các nhà máy đường chưa được xử lý hiệu quả, gây ô nhiễm môi trường, tác động tiêu cực đến sự biến đổi khí hậu toàn cầu nếu người dân vẫn xử lý theo các phương pháp truyền thống như sản xuất nấm ăn, làm phân bón vi sinh, đốt trực tiếp ngoài ruộng lấy tro. Việc đốt rơm rạ không những gây lãng phí nguồn nguyên liệu, mà còn phát thải ra khí CO₂, CO, CH₄, v.v. và bụi lơ lửng gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Vì vậy, một trong những hướng đi mới là tận dụng nguồn phế phụ phẩm này làm nguyên liệu cho sản xuất giấy, không những tăng nguồn bột giấy cho sản xuất mà còn bảo vệ được tài nguyên rừng. Tuy nhiên, do hàm lượng xơ sợi trong các loại nguyên liệu này thấp, nếu sử dụng phương pháp hóa học thông thường sẽ không đem lại hiệu quả kinh tế, còn có thể gây tác động ô nhiễm môi trường.

Nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng nguyên liệu, giảm thiểu ô nhiễm môi trường, nâng cao hiệu quả kinh tế, các nhà khoa học đã dẫn tập trung nghiên cứu theo hướng sản xuất bột giấy theo phương pháp sinh học. Bột giấy sản xuất theo phương pháp này thường sử dụng các loại chế phẩm sinh học như một tác nhân phá vỡ các liên kết, loại bỏ lignin để

thu được xơ sợi chứa phần lớn là xenluloza. Đã có rất nhiều nghiên cứu cho thấy, với các nguyên liệu khác nhau như bã mía, rơm rạ, gỗ bạch đàn, gỗ dương hầu hết v.v.. Các nghiên cứu đều sử dụng các chủng nấm như: *Phanerochates chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Trametes sp.*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus sp* (trong đó hầu hết là các loài nấm đảm) và một số loài khác. Các loại nấm thuộc nhóm nấm đảm được chia làm ba loại: nấm mục trắng, nấm mục nâu và nấm mục xốp tấn công vào vách tế bào. Tuy nhiên, chỉ có nấm mục trắng là có khả năng phân hủy lignin, còn hai loại nấm kia chủ yếu tấn công vào xenlulo và hemixenlulo. Các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, sử dụng chủng nấm mục trắng có khả năng phân hủy lignin để sản xuất bột giấy từ nguyên liệu thực vật, chủ yếu là cây ngắn ngày cho kết quả rất khả quan. Sản xuất theo phương pháp này không những cải thiện được chất lượng bột giấy, mà còn hạn chế được lượng nước thải và các thông số ô nhiễm đáng kể.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về nấm mục trắng chủ yếu là trong thu nhận enzym phân hủy lignin như laccaza, mangan peroxydaza v.v. trong xử lý màu thuốc nhuộm dệt. Trên thế giới và Việt Nam chưa có công bố nào về nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 ứng dụng trong tiền xử lý nguyên liệu rơm để ứng dụng trong sản xuất bột giấy sinh học sau 30 ngày tiền xử lý nấm trên nguyên liệu hàm lượng xenluloza tăng lên 47,7% và hàm lượng lignin giảm xuống còn 23,8% tương ứng với mẫu đối chứng không xử lý nấm hàm lượng xenluloza là 45,9% và hàm lượng lignin là 25,2%. Điều này có nghĩa trong thời gian 30 ngày nấm *Trametes elegans* CP23 đã không làm ảnh hưởng đến hàm lượng xenluloza trên rơm mà chỉ cắt lignin dẫn tới giảm lignin trong nguyên liệu khi kiểm tra điều này có tiềm năng lớn trong ứng dụng chủng tiền xử lý nguyên liệu rơm trong sản xuất bột giấy.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 có khả năng sinh trưởng tốt trên cơ chất rơm rạ làm giảm hàm lượng lignin trong nguyên liệu mà không làm giảm hàm lượng xenluloza, nguyên liệu rơm sau xử lý 30 ngày tạo ra bột giấy với hiệu suất thu hồi bột (%) là 63,8, chiều dài đứt là 3020 m, chỉ số độ bền xé 3,1

mN.m²/g, chỉ số độ chịu bụi 1,3 kPa.m²/g, hàm lượng lignin 18,5% đạt tiêu chuẩn bột giấy cho sản xuất bao bì. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 phân lập từ rừng Cúc Phương, Ninh Bình Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp enzym phân hủy lignin và phân cắt chọn lọc cơ chất lignin trong nguyên liệu, không làm ảnh hưởng đến hàm lượng xenluloza trong nguyên liệu sau 30 ngày xử lý nhằm ứng dụng trong sản xuất bột giấy sinh học từ nguyên liệu rơm. Việc phân lập và xác định chủng do Phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tiến hành. Chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước là 659 bp và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số *KT763333* với tên phân loại là *Trametes elegans* CP23.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Ảnh chụp khuẩn lạc và hệ sợi nấm *Trametes elegans* CP23.

Hình 2. Trình tự vùng ITS rADN của chủng *Trametes elegans* CP23.

Hình 3. Hình ảnh sợi nấm *Trametes elegans* CP23 phát triển trên rơm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Trong phạm vi của giải pháp hữu ích, chủng nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 có khả năng ứng dụng trong tiền xử lý nguyên liệu rơm làm giảm hàm lượng lignin trong nguyên liệu mà không làm giảm hàm lượng xenluloza trong nguyên liệu rơm. Chủng *Trametes elegans* CP23 được phân lập từ rừng Cúc Phương, Ninh Bình, được mô tả và định danh bởi Phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước là 659 bp và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số *KT763333* với tên phân loại là *Trametes elegans* CP23. Hiện chủng nấm này được lưu giữ tại Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chủng *Trametes elegans* CP23 được phân lập như sau: quả thể nấm được thu trong tự nhiên tại rừng Cúc Phương Ninh Bình được bảo quản trong túi ni lông, đánh số và bảo quản trong điều kiện 4°C đến khi phân lập. Các quả thể nấm được rửa dưới vòi nước sạch, dùng dao vô trùng cắt một mẫu nhỏ quả thể, khử trùng bằng dung dịch etanol 95% trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất khử trùng, đặt vào đĩa petri có môi trường thạch bột chiết từ lúa mạch 2% sao cho mặt dưới của quả thể (lớp bào tử) nơi bào tử bắn ra hướng xuống đĩa. Nuôi cấy ở 28°C trong 3 ÷ 7 ngày. Cắt phần thạch tại đầu sinh trưởng sợi nấm cách đầu sợi nấm nhìn thấy 2 mm. Chuyển phần sợi nấm sang đĩa thạch mới có môi trường thạch bột chiết từ lúa mạch 2%. Thu được nấm mục trắng CP23. Chủng nấm phân lập được tách và đánh số và kiểm tra khả năng sinh tổng hợp enzym phân hủy lignin và sinh trưởng trên nguyên liệu rom, phân tích hàm lượng lignin và xenluloza trên nguyên liệu sau xử lý. Chủng CP23 thu nhận từ rừng Cúc Phương, Ninh Bình được đánh số 23, bước đầu sinh tổng hợp enzym phân hủy lignin như lignin peroxydaza đạt 1711 nkat/L và mangan peroxydaza 1492 nkat/L, sinh trưởng nhanh và mạnh trên cơ chất rom được lựa chọn phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS – rADN dựa trên cặp mồi ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') và ITS4 (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3') theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút, 30 chu trình (94°C trong 60 giây, 53°C trong 60 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Tác giả tiến hành, nghiên cứu đặc điểm hình thái về quả thể, hệ sợi, sinh lý của *Trametes elegans* CP23 và nghiên cứu thời gian xử lý nấm trên nguyên liệu rom. Chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước là 659 bp và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số KT763333 với tên phân loại là *Trametes elegans* CP23 và hiện tại, chủng *Trametes elegans* CP23 này đang được lưu giữ tại Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Để định danh chủng *Trametes elegans* CP23 theo giải pháp hữu ích, tiến hành giải trình tự với cặp mồi sử dụng bao gồm:

Mồi xuôi: ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')

Môi ngược: ITS4 (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3')

Kết quả giải trình tự thu được trình tự kích thước là 659 bp, kết quả này được dùng để định danh bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 18S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Trametes elegans* CP23 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Trametes* và thuộc loài *elegans*, và được xác định là một chủng mới, đăng kí trên ngân hàng GenBank mã số KT763333.

Trên môi trường thạch bột chiết từ lúa mạch 2%, ở nhiệt độ 28°C, khuẩn lạc chủng *Trametes elegans* CP23 mặt trên màu trắng tuyết, mặt dưới màu hơi vàng, không đồng nhất, bông, thưa, chia làm 2 vòng rõ rệt: vòng phía trong dày hơn vòng phía ngoài, hệ sợi tỏa tròn không đều, mép khuẩn lạc tạo thành tia. Sợi nấm dài và mảnh, hệ sợi kết lỏng lẻo. Tốc độ lan sợi 312,5 μm /giờ. Chủng nấm có hệ sợi phát triển, có 2 trong 3 loại sợi là sợi dinh dưỡng, sợi cứng và sợi bện. Hệ sợi kiểu này gọi là dimitic. Sợi dinh dưỡng trong suốt, vách mỏng có khóa (clamp) rõ ràng, có vách ngăn điển hình, đường kính cỡ 2,5- 5 μm . Sợi cứng ở vùng thịt nấm có vách rất dày, không thấy có vách ngăn tế bào, không hình thành khóa, đường kính tới 6-12 μm , rất hiếm khi thấy phân nhánh. Sợi bện cũng có vách dày, phân nhánh rõ rệt, không thấy có vách ngăn ngang, đường kính nhỏ hơn (2,5- 5,5 μm). Nhiều sợi nấm trong hệ sợi tạo thành khóa (clamp connection). Trên môi trường chỉ có cơ chất CMC, tinh bột và casein chủng có khả năng phân hủy cả 3 cơ chất này. Chủng phát triển trong dải nhiệt độ từ 20 ÷ 45°C, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 37°C, pH sinh trưởng 3÷9, tốt nhất ở 5÷6, chịu được nồng độ muối dưới 5%. Khi nuôi cấy trong môi trường dịch thể, pellet của chủng CP23 có kích thước nhỏ ($\phi = 2 - 3 \text{ mm}$). Theo giải pháp hữu ích chủng *Trametes elegans* CP23 khác biệt ở chỗ, là chủng nấm mục trắng có khả năng sinh trưởng nhanh trên nguyên liệu rơm làm giảm hàm lượng lignin sau 30 ngày xử lý là không làm giảm hàm lượng xenluloza trên nguyên liệu và điều kiện ủ là rơm có độ ẩm 60%, bổ sung 1% sucroza và 0,2% ure, ở nhiệt độ phòng (28-30°C). Nguyên liệu sau xử lý 30 ngày được nghiền sơ bộ, xác định hiệu suất qua thiết bị sàng phân ly. Bột hợp cách thu được nghiền trên máy nghiền PFI đến độ nghiền 50⁰SR và xeo trên máy xeo Rapid để xác định tính chất của bột giấy. Chất lượng bột giấy đạt hiệu suất thu hồi bột

(%) là 63,8, chiều dài đứt là 3020 m, chỉ số độ bền xé 3,1 mN.m²/g, chỉ số độ chịu bực 1,3 kPa.m²/g, hàm lượng lignin 18,5% đạt tiêu chuẩn bột giấy cho sản xuất bao bì.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Phân lập nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23, ảnh khuẩn lạc và hệ sợi của chủng *Trametes elegans* CP23

Quả thể nấm được thu trong tự nhiên tại rừng Cúc Phương Ninh Bình được bảo quản trong túi ni lông, đánh số và bảo quản trong điều kiện 4°C đến khi phân lập. Các quả thể nấm được rửa dưới vòi nước sạch, dùng dao vô trùng cắt một mẫu nhỏ quả thể, khử trùng bằng dung dịch etanol 95% trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất khử trùng, đặt vào đĩa petri có môi trường thạch bột chiết từ lúa mạch 2% sao cho mặt dưới của quả thể (lớp bào tử) nơi bào tử bắn ra hướng xuống đĩa petri có môi trường thạch bột chiết từ lúa mạch 2%. Nuôi cấy ở 28°C trong 3 ÷ 7 ngày. Cắt phần thạch tại đầu sinh trưởng sợi nấm cách đầu sợi nấm nhìn thấy 2 mm. Chuyển phần sợi nấm sang đĩa thạch mới có môi trường thạch bột chiết từ lúa mạch 2%. Thu được nấm mục trắng CP23.

+ Kiểm tra đặc điểm sinh học

Các chủng nấm được nuôi cấy trên đĩa thạch có môi trường thạch bột chiết từ lúa mạch 2% ở 28°C sau 2 – 7 ngày lấy ra qua sát hình dạng, kích thước và màu sắc khuẩn lạc. Làm tiêu bản và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi độ phóng đại 400 lần. Tốc độ phát triển hệ sợi được tính theo Schwantes & Salttler (1971). Các đặc điểm hình thái của thể sinh bào tử như hình dạng, kích thước và màu sắc của quả thể và cuống nấm, bề mặt và mép của quả thể, vị trí đính của cuống nấm vào mũ nấm, bề mặt lớp bào tử, kích thước và hình dạng của các ống bào tử được nghiên cứu theo phương pháp của Trịnh Tam Kiệt (2011). Theo các khóa phân loại về đặc điểm hình thái này, *Trametes elegans* CP23 được xếp thuộc ngành phụ nấm đảm Basidiomycotina, khuẩn lạc mặt trên màu trắng tuyết, mặt dưới màu hơi vàng, không đồng nhất, bông, thưa, chia làm 2 vòng

rõ rệt: vòng phía trong dày hơn vòng phía ngoài, hệ sợi tỏa tròn không đều, mép khuẩn lạc tạo thành tia. Sợi nấm dài và mảnh, hệ sợi kết lỏng lẻo. Tốc độ lan sợi 312,5 μm /giờ. Chủng nấm có hệ sợi phát triển, có 2 trong 3 loại sợi là sợi dinh dưỡng, sợi cứng và sợi bện. Hệ sợi kiểu này gọi là dimitic. Sợi dinh dưỡng trong suốt, vách mỏng có khóa (clamp) rõ ràng, có vách ngăn điển hình, đường kính cỡ 2,5- 5 μm . Sợi cứng ở vùng thịt nấm có vách rất dày, không thấy có vách ngăn tế bào, không hình thành khóa, đường kính tới 6-12 μm , rất hiếm khi thấy phân nhánh. Sợi bện cũng có vách dày, phân nhánh rõ rệt, không thấy có vách ngăn ngang, đường kính nhỏ hơn (2,5- 5,5 μm). Nhiều sợi nấm trong hệ sợi tạo thành khóa (clamp connection). Trên môi trường chỉ có cơ chất CMC, tinh bột và casein chủng có khả năng phân hủy cả 3 cơ chất này. Chủng phát triển trong dải nhiệt độ từ 20 ÷ 45°C, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 37°C, pH sinh trưởng 3÷9, tốt nhất ở 5÷6, chịu được nồng độ muối dưới 5%. Khi nuôi cấy trong môi trường dịch thể, pellet của chủng CP23 có kích thước nhỏ (ϕ = 2 - 3 mm). Chủng sinh tổng hợp enzym phân hủy lignin (lignin peroxydaza đạt 1711 nkat/L và mangan peroxydaza 1492 nkat/L). Hình ảnh sợi nấm và khuẩn lạc *Trametes elegans* CP23 được thể hiện trên hình 1.

+ Xác định trình tự gen chủng *Trametes elegans* CP23:

ADN tổng số nấm được tách chiết dựa trên phương pháp tách chiết bằng kiềm (alkaline extraction). 100mg sợi nấm đã được rửa sạch, thu từ môi trường nuôi lỏng, được trộn kỹ với 600 μl đệm TENS (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1N NaOH và 0,5% SDS) trong ống eppendorf 1,5ml và ủ ở 55°C trong 15 phút. Sau khi ủ, đá thủy tinh được thêm vào để phá vỡ thành tế bào nấm bằng cách đảo trộn kỹ bốn lần một phút với thời gian nghỉ 1 phút trong đá lạnh giữa các lần. Đá thủy tinh được loại bỏ bằng ly tâm. Sau đó, chloroform được thêm vào dịch phá tế bào ở trên với tỉ lệ 1:1, để ở nhiệt độ phòng 5 phút. Hỗn hợp trên được ly tâm 12500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, dịch nổi được hút vào ống Eppendorf 1,5 ml mới. Tiếp theo, iso - propanol lạnh được thêm vào với tỷ lệ 1:1, ly tâm với tốc độ 15000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, và loại bỏ dịch nổi. Sau đó, kết tủa ADN được rửa 2 - 3 lần bằng 500 μl etanol 70% trước khi được hòa trong 50 μl đệm TE. Chất lượng ADN được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%. Gen 5,8S

rADN được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ ADN tổng số sử dụng cặp mồi BF (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') và BR (5'-CAGGAGACT TGTACACGGTCCAG-3') theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút, 35 chu trình (94°C trong 90 giây, 53°C trong 90 giây, 72°C trong 120 giây), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, xử lý bằng phần mềm SeqAssem version 01/2005 và Sequencher version 4.0.5. Vùng ITS 5,8S rRNA của chủng CP23 có độ tương đồng cao (99%) so với gen tương ứng của các chủng thuộc chi *Trametes cubensis* S26, *Trametes elegans* 028. Kết hợp với các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, chủng CP23 được đặt tên là *Trametes elegans* CP23. Trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước là 659 bp được đăng ký trên GenBank mã số *KT763333* với tên phân loại là *Trametes elegans* CP23. Trình tự vùng ITS 5,8S rADN của chủng *Trametes elegans* CP23 được thể hiện trên hình 2.

Ví dụ 2: Xác định khả năng tiền xử lý cơ chất rơm làm bột giấy sinh học

Rơm rạ sau khi thu hoạch được chặt bằng máy chặt ở các kích thước 5 cm, sau đó được ngâm nước nóng trong thời gian 30 phút và bổ sung ure 0,2 % và sucroza 1 %, tiếp tục xông hơi bằng hơi nước nóng trong thời gian 30 phút, Kết thúc thời gian xông hơi, nguyên liệu rơm rạ được làm nguội và đưa vào các túi ni lông. Bổ sung 10% nấm C23 nguyên liệu và ủ ở nhiệt độ 28-30°C, kiểm tra sau hàm lượng lignin, xenluloza trên tổng nguyên liệu 10, 15, 20, 30 và 40 ngày và kiểm tra sự phát triển của sợi nấm trên kính hiển vi huỳnh quang Axioplan 2 (CarlZeiss, Germany), camera Optika B5 (Italia), máy cắt lát mỏng Microtome (Germany). Mẫu sau ủ được kiểm tra % hàm lượng xenluloza và lignin. Chủng nấm C23 phát triển trắng, bọc toàn bộ sợi rơm, dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy sợi nấm đâm xuyên và đan xen vào sợi rơm. Hàm lượng lignin sau 30 ngày xử lý giảm xuống còn 23,8% và hàm lượng xenluloza tăng lên 47,7% so với ban đầu là 25,2 và 45,9% tương ứng. Nguyên liệu sau xử lý 30 ngày được nghiền sơ bộ, xác định hiệu suất qua thiết bị sàng phân ly. Bột hợp cách thu được nghiền trên máy nghiền PFI đến độ nghiền 50⁰SR và xeo trên máy xeo Rapid để xác định tính chất của bột giấy. Chất lượng

bột giấy đạt hiệu suất thu hồi bột (%) là 63,8, chiều dài đứt là 3020 m, chỉ số độ bền xé 3,1 mN.m²/g, chỉ số độ chịu bụi 1,3 kPa.m²/g, hàm lượng lignin 18,5% đạt tiêu chuẩn bột giấy cho sản xuất bao bì.

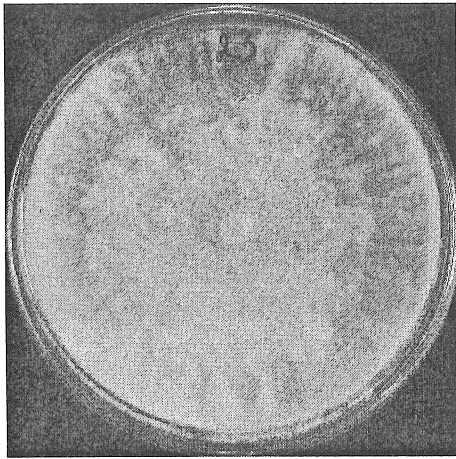
Hình ảnh sợi nấm phát triển trên rơm được thể hiện trên hình 3.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

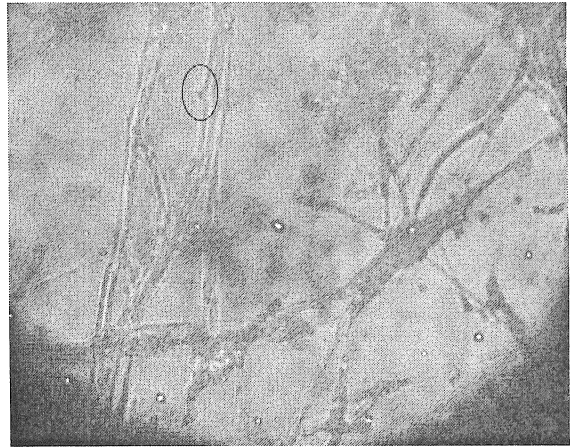
Chủng nấm *Trametes elegans* CP23 theo giải pháp hữu ích được phân lập từ rừng Cúc Phương, Ninh Bình, Việt Nam có khả năng sinh trưởng tốt trên rơm và phân hủy cơ chất lignin trên rơm mà không làm giảm hàm lượng xenluloza thu được trên nguyên liệu. Bột giấy đạt hiệu suất thu hồi bột (%) là 63,8, chiều dài đứt là 3020 m, chỉ số độ bền xé 3,1 mN.m²/g, chỉ số độ chịu bụi 1,3 kPa.m²/g, hàm lượng lignin 18,5% đạt tiêu chuẩn bột giấy cho sản xuất bao bì. Điều này đưa ra khả năng ứng dụng chủng nấm *Trametes elegans* C23 trong công nghiệp sản xuất giấy sinh học từ các nguyên liệu rơm rạ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng nấm mục trắng *Trametes elegans* CP23 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp enzym lignin peroxydaza đạt 1711 nkat/L và mangan peroxydaza 1492 nkat/L, sinh trưởng nhanh và mạnh trên cơ chất rom, nguyên liệu rom rạ sau 30 ngày nuôi cấy với nấm CP23 được nghiền tạo thành bột giấy sinh học, bột giấy đạt hiệu suất thu hồi bột (%) là 63,8, chiều dài đứt là 3020 m, chỉ số độ bền xé 3,1 mN.m²/g, chỉ số độ chịu bực 1,3 kPa.m²/g, hàm lượng lignin 18,5 % đạt tiêu chuẩn bột giấy cho sản xuất bao bì, chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước là 659 bp có SEQ ID NO:1 và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số KT763333 với tên phân loại là *Trametes elegans* CP23.



a



b

Hình 1

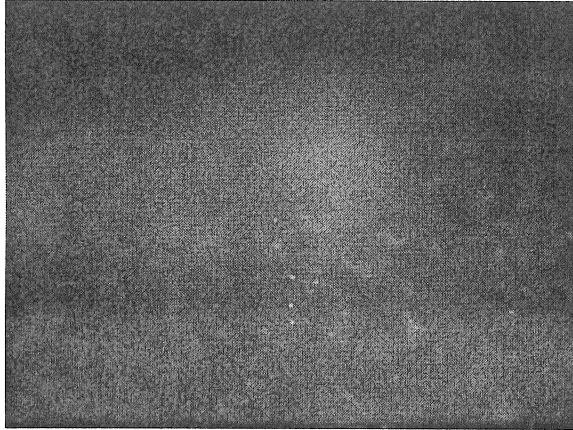
```

1  gttttgacat gggttgtagc tggcctcacg aggcattgtgc acgccctgct catccactct
61  acacctgtgc acttactgta ggtttggcgt gggctttcgg ggccttcacg ggctttgaga
121 gcattctgcc tgcctatgta tcactataaa cactacgaag taacagaatg taatcgcgtc
181 taacgcatct taatacaact ttcagcaacg gatctcttgg ctctcgcatc gatgaagaac
241 gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa
301 cgcaccttgc gctccttggg attccgagga gcatgcctgt ttgagtgtca tggatttctc
361 aacccacaca tccttgatgc gcttgtaggg cttggacttg gaggcttgct ggcccatcgc
421 ggtcgggctc tcctgaatgc attagcttgg ttccttgagg atcggctctc agtgtgataa
481 ttgtctacgc tgtgaccgtg aagcgtttgg cgagcttcta accgtcctgc tagggacaac
541 ttacttgaca tctgacctca aatcaggtag gactaccgcg tgaacttaag catatcaata
601 agcggaggaa aagaaactaa caaggattcc cctagtaact gcgagtgaag cgggaaaag

```

//

Hình 2



a



b

Hình 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghiệp Giấy và Xenlulô

<120> CHÙNG NẤM MỤC TRẮNG TRAMETES ELEGANS CP23

<160> 1

<210> 1

<211> 659

<212> ADN

<213> *Trametes elegans*

<400> 1

> SEQ ID NO: 1

```

1  gttttgacat gggttgtagc tggcctcacg aggcattgtgc acgcccctgct catccactct
61  acacctgtgc acttactgta ggtttggcgt gggccttcacg ggctttgaga
121 gcattctgcc tgcctatgta tcaactataaa cactacgaag taacagaatg taatcgcgtc
181 taacgcatct taatacaact ttcagcaacg gatctcttgg ctctcgcatc gatgaagaac
241 gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa
301 cgcaccttgc gctccttggg attccgagga gcatgcctgt ttgagtgtca tgggtattctc
361 aacccacaca tccttgtgat gcttgtgagg ctgggacttg gaggcttgct ggcccatcgc
421 ggtcggctcc tcttgaatgc attagcttgg ttccttgagg atcggctctc agtgtgataa
481 ttgtctacgc tgtgaccgtg aagcgtttgg cgagcttcta accgtcctgc tagggacaac
541 ttacttgaca tctgacctca aatcaggtag gactacccgc tgaacttaag catatcaata
601 agcggaggaa aagaaactaa caaggattcc cctagtaact gcgagtgaag cgggaaaag

```

//