



(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)



2-0003204

(51) **C12N 1/14**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00314

(22) 28/08/2019

(67) 1-2019-04751

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/01/2021 394

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Phan Thị Hồng Thảo (VN); Nguyễn Văn Hiếu (VN); Nguyễn Thị Hồng Liên (VN);
Trần Thị Hương (VN); Đặng Thị Nhung (VN); Nguyễn Vũ Mai Linh (VN).

(54) **CHỦNG NẤM MỤC TRẮNG PHANEROCHAETE SP. B68 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT
SINH HỌC**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ dăm mảnh gỗ của nhà máy giấy Bãi Bằng, Phú Ninh, Phú Thọ, Việt Nam. Chủng này có khả năng sinh trưởng và làm giảm nhựa cây trong dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn. Chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 như nêu trong SEQ ID NO:1 và được đăng ký trên GenBank với mã số MN263249.

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 *Phanerochaete* sp. B68 thu thập tại nhà máy giấy Bãi Bằng, Phú Ninh, Phú Thọ, Việt Nam, có khả năng sinh enzym phân hủy nhựa cây và khả năng xử lý nguyên liệu dăm mảnh gỗ nhằm ứng dụng trong phân hủy nhựa cây áp dụng trong sản xuất bột giấy hóa học tẩy trắng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Gỗ được cấu tạo từ 3 thành phần chính là xenluloza (42-45%), hemixenluloza (20-25%) và lignin (22-25%), ngoài ra chúng còn một chứa một lượng nhỏ 2- 8% thành phần các chất hữu cơ như lipit và các chất trích ly (extractive). Đáng chú ý nhất là các chất trích ly béo (lipophilic extractives), tức là các hợp chất chiết được trong dung môi không phân cực, sau đây gọi chung là “nhựa cây” vì chúng có ảnh hưởng lớn tới quá trình sản xuất bột giấy và giấy.

Trong quá trình nấu bột giấy sulfat, phần lớn các chất nhựa có thể xà phòng hóa như axit béo, axit nhựa tự do, triglycerit, steryl este phản ứng với xút, được xà phòng hóa và tan vào trong dịch nấu. Tuy nhiên ở gỗ cứng tỷ lệ xà phòng hóa của nhựa cây thấp. Mặt khác, nhựa đã xà phòng hóa chỉ tan ở dạng keo có tính ổn định tương đối thấp, nên có thể kết hợp với các thành phần nhựa không xà phòng hóa, rất dễ kết tủa tạo ra cặn nhựa trên bề mặt các bộ phận của thiết bị trong dây chuyền khi điều kiện của quá trình sản xuất (độ pH và nhiệt độ) thay đổi. Bên cạnh đó, các hợp chất trong nhựa thường tương tác với nhau và với các hóa chất trong quá trình nấu bột và làm giấy, tạo ra cặn nhựa (pitch deposit). Cặn nhựa dính vào các lưới lô rửa làm giảm hiệu quả rửa bột giấy. Nhựa kết hợp cùng với các chất vô cơ gây đóng cặn ở các thiết bị chưng bốc dịch đen, nhất là thiết bị chưng bốc màng roi, làm giảm năng suất do phải dừng để rửa thiết bị và tiêu tốn thêm nhiên liệu. Nhựa cây liên kết với lignin trong dịch đen, kết thành mảng dày trên bề mặt bể, gây khó khăn cho công đoạn oxy hóa dịch đen. Mặt khác, nhựa cây trong bột sau nấu và rửa vẫn có thể bám trên xơ sợi, cản trở sự liên kết giữa các xơ sợi và làm giảm độ bền của giấy trong quá trình xeo vì gây đứt giấy. Trong quá trình tẩy trắng bột giấy, các chất nhựa này được tách ra và tích lũy trong nước trắng, nhưng dễ kết hợp với các hóa chất khác (như cacbonat canxi) tạo thành các hạt màu đen bám lên thành đường ống, bể chứa

và bề mặt của các thiết bị và có thể tạo thành mảng lớn rơi vào dòng bột. Vấn đề này càng trở nên nghiêm trọng hơn khi nhà máy có mức độ tuần hoàn nước sản xuất cao. Các axit béo mạch dài, nhựa béo mạch dài và các sản phẩm oxy hóa của sterol là những thành phần của chất trích ly béo có xu hướng cao để tạo ra cặn nhựa. Trong quá trình sản xuất bột giấy Kraft và tẩy trắng bằng ClO_2 có tới 80% axit béo của gỗ keo vẫn còn lưu lại trong bột giấy tẩy trắng. Vì vậy, bột giấy của gỗ keo có khả năng tạo cặn nhựa rất cao trong quá trình sản xuất giấy. Cặn nhựa còn lại trong bột sẽ làm giảm chất lượng của sản phẩm như đốm đen, đứt gãy giấy, thùng, mỏng (ở vị trí có nhựa cây) và tạo ra vùng giấy không bám mực khi in ấn. Như vậy, nếu không loại bỏ tối đa được nhựa cây trong các giai đoạn chuẩn bị và nấu bột thì sẽ làm giảm hiệu quả hoạt động của thiết bị, giảm chất lượng giấy và hiệu quả kinh tế. Mặt khác, nước thải từ quá trình sản xuất chứa chất trích ly gỗ có thể độc hại với môi trường. Do có cấu trúc bền vững nên các axit nhựa ít bị biến đổi bởi các quá trình phân hủy hóa học và duy trì được cấu trúc trong suốt quá trình sản xuất bột giấy và thường tạo thành các keo tụ ở trong nước và gây ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh sản của động vật thủy sinh.

Để giảm các vấn đề nhựa cây phát sinh trong quá trình sản xuất giấy, có nhiều phương pháp để loại bỏ nhựa cây như: các phương pháp truyền thống (lưu giữ gỗ hoặc dầm mảnh tại nhà máy trước khi sản xuất bột giấy (quá trình xử lý tự nhiên). Tuy nhiên, thời gian lưu giữ kéo dài sẽ làm giảm độ sáng, năng suất và chất lượng bột giấy do không kiểm soát được tác động của vi sinh vật. Phương pháp sử dụng hóa chất (hút bám hoặc phân tán các hạt nhựa cây bằng hóa chất trong quá trình sản xuất bột giấy và giấy). Tuy nhiên, cần phải xử lý các chất nhựa và hóa chất trước khi tái xử lý nước rửa hoặc xả thải ra môi trường. Hiện nay giải pháp được quan tâm và phát triển là sử dụng một số loại vi sinh vật để đẩy nhanh và kiểm soát quá trình xử lý nguyên liệu, hoặc dùng enzym để xử lý bột giấy.

Trong tự nhiên, vi sinh vật phân hủy gỗ bao gồm nấm mốc, nấm đảm (basidiomycetes), nấm dất gỗ (sapstain fungi), và một số loại khác. Trong giải pháp này chúng tôi đề cập đến nhóm nấm mục trắng. Tác nhân phân hủy lignin và nhựa cây mạnh trong điều kiện tự nhiên nhờ có hệ enzym phong phú, chúng xúc tác sinh học để phân hủy lignin và các chất trích ly nhựa cây mà lipaza và nấm dất gỗ không phân hủy được. Xử lý nhựa bằng phương pháp này không những cải thiện được chất lượng bột giấy, cải thiện quá trình sản xuất, mà còn hạn chế được các chất độc hại trong nước thải.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về sử dụng vi sinh vật trong xử lý dăm mảnh gỗ cứng Keo và Bạch đàn để loại nhựa cây mới chỉ được công bố bởi nhóm nghiên cứu của chúng tôi. Trên thế giới và Việt Nam chưa có công bố nào về nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68 (chủng nấm phân lập tại nhà máy giấy Bãi Bằng) ứng dụng trong xử lý nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn để phân hủy nhựa cây. Chủng nấm công bố có khả năng sinh trưởng tốt trên nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn làm giảm hàm lượng nhựa trong nguyên liệu gỗ Keo là trên 60% và gỗ Bạch đàn là trên 77 %, không làm giảm hiệu suất thu hồi xenluloza sau 21 ngày xử lý (hiệu suất thu hồi bột là 50,3% tương đương với đối chứng là 50,1%), hàm lượng lignin còn lại thấp hơn so với đối chứng không xử lý (xử lý là 18,3; đối chứng là 20,1).

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sinh trưởng tốt trên nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn, làm giảm hàm lượng nhựa trong nguyên liệu gỗ Keo là trên 60% và gỗ Bạch đàn là trên 77 %, không làm giảm hiệu suất thu hồi xenluloza sau 21 ngày xử lý (hiệu suất thu hồi bột là 50,3% tương đương với đối chứng là 50,1%), hàm lượng lignin còn lại thấp hơn so với đối chứng không xử lý (xử lý là 18,3; đối chứng là 20,1) có thể áp dụng cho xử lý nguyên liệu dăm mảnh trước nấu trong sản xuất bột giấy hóa học tẩy trắng. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68 được phân lập từ dăm mảnh gỗ của nhà máy giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp enzym phân hủy nhựa cây là sterol esteaza, laccaza và phân hủy nhựa cây trong nguyên liệu gỗ, không làm ảnh hưởng đến hàm lượng xenluloza trong nguyên liệu sau 21 ngày xử lý. 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 650 bp như nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số MN263249 với tên phân loại là *Phanerochaete* sp. B68

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1. Ảnh chụp khuẩn lạc và hệ sợi nấm *Phanerochaete* sp. B68.

Hình 2. Trình tự vùng ITS rADN của chủng *Phanerochaete* sp. B68.

Hình 3. Ảnh chủng nấm *Phanerochaete* sp. B68 phát triển trên dăm mảnh gỗ sau 7 ngày.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Trong phạm vi của giải pháp hữu ích, chủng nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68 thuần khiết về mặt sinh học 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 *Phanerochaete* sp. B68 có khả năng ứng dụng trong xử lý nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn làm giảm hàm lượng nhựa trong nguyên liệu mà không làm giảm hàm lượng xenluloza thu hồi trong nguyên liệu. Chủng *Phanerochaete* sp. B68 được phân lập từ dăm mảnh gỗ của Nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phú Ninh, Phú Thọ, được mô tả và định danh bởi Phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam. Chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước là 650 bp như nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số MN263249 với tên phân loại là *Phanerochaete* sp. B68. 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 *Phanerochaete* sp. B68 được phân lập như sau: Phần dăm mảnh gỗ có chứa tế bào nấm được thu tại bãi dăm mảnh khu nguyên liệu nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phú Ninh, Phú Thọ được bảo quản trong túi ni lông, đánh số và bảo quản trong điều kiện 4°C đến khi phân lập. Hình Thái nấm khi phân lập có dạng bột bám sát vào dăm mảnh gỗ. Phần bột nấm thu thập được gạt nhẹ mặt trên và thu nhận phần nhỏ bột nấm và đặt vào đĩa petri có môi trường thạch cao malt 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 cao malt 2% mới. Thu được nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68. Chủng nấm phân lập được tách và đánh số và kiểm tra khả năng sinh tổng hợp hai enzym phân hủy nhựa là sterol esteaza, laccaza và đánh giá sinh trưởng trên nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn, phân tích hàm lượng nhựa và xenluloza trên nguyên liệu sau xử lý. Chủng *Phanerochaete* sp. B68 thu nhận từ nhà máy giấy Bãi Bằng được đánh số 68, sinh tổng hợp enzym phân hủy nhựa sterol esteaza khoảng 21,05 U/g gỗ và laccaza khoảng 9,9 U/g gỗ sau 21 ngày ủ trên dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn, sinh trưởng nhanh trên dăm mảnh gỗ Keo thử nghiệm 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 *Phanerochaete* sp. B68 và nghiên cứu thời gian xử lý nấm trên nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn. Chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước 650 bp như nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự này được đăng ký trên GenBank mã số MN263249 với tên *Phanerochaete* sp. B68, hiện tại, chủng *Phanerochaete* sp. B68 này đang được lưu giữ tại Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học.

Để định danh chủng *Phanerochaete* sp. B68 theo giải pháp hữu ích, tiến hành giải trình tự với cặp mồi sử dụng bao gồm:

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

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

Kết quả giải trình tự thu được trình tự kích thước là 650 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 *Phanerochaete* sp. B68 theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Phanerochaete* chủng B68, và đây được xác định là một chủng mới và đăng kí trên ngân hàng GenBank mã số MN263249.

Trên môi trường cao malt, ở nhiệt độ 30°C, khuẩn lạc chủng *Phanerochaete* sp. B68 tròn đều, bề mặt mịn, màu trắng (chuyển sang phớt hồng sau 7 ngày), tạo thành dạng bột mịn trên đĩa sau 5-7 ngày nuôi cấy. Sợi nấm ngắn, mập, kết chặt vào nhau, tạo dạng bột nấm. Mặt dưới khuẩn lạc màu trắng ngà. Sợi nấm sinh trưởng đạt tốc độ 625 $\mu\text{m}/\text{h}$. Khi nuôi cấy trong môi trường dịch thể cao malt 2%, chủng nấm sinh trưởng tốt, không sinh sắc tố ra môi trường. Các hạt pellet, hình cầu tròn, có màu vàng nhạt, kích thước nhỏ ($\phi = 1 - 2 \text{ mm}$). Các chủng nấm đều có hệ sợi phát triển. Hệ sợi của các chủng nấm 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 4- 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, nhiều sợi nấm trong hệ sợi tạo thành khóa (clamp connection). Chủng phát triển trong dải nhiệt độ từ 15 ÷ 50°C, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 30-37°C, pH sinh trưởng 3÷9, tốt nhất ở 5÷6. Theo giải pháp hữu ích chủng *Phanerochaete* sp. B68 khác biệt ở chỗ, là chủng nấm mục trắng (nấm bột) có khả năng sinh trưởng nhanh trên nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn, điều kiện ủ có độ ẩm 50%, ở nhiệt độ phòng (28-40°C). Nguyên liệu

sau xử lý 21 ngày được nghiền sơ bộ, xác định hiệu suất nấu bột thu hồi xenluloza. Xử lý nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn với nấm B68 không làm ảnh hưởng đến hàm lượng xenluloza thu hồi (thông qua hiệu suất nấu bột giấy bằng phương pháp sulphat), làm giảm nhẹ lượng kiềm dư (đánh giá thông qua tàn kiềm) và làm giảm trị số kappa (tương ứng với việc làm giảm hàm lượng lignin trong bột sau nấu, đặc biệt làm giảm lượng chất trích ly nhựa cây trên 60% phù hợp cho sử dụng để tiền dăm mảnh cho sản xuất bột giấy hóa học tẩy trắng).

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 *Phanerochaete* sp. B68 và ảnh khuẩn lạc và hệ sợi của chủng *Phanerochaete* sp. B68

Phần dăm mảnh gỗ có chứa tế bào nấm được thu tại bãi dăm mảnh của nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phú Ninh, Phú Thọ được bảo quản trong túi ni lông, đánh số và bảo quản trong điều kiện 4°C đến khi phân lập. Hình thái nấm khi phân lập có dạng bột bám sát vào dăm mảnh gỗ. Phần bột nấm thu thập được gạt nhẹ mặt trên và thu nhận phần nhỏ bột nấm và đặt vào đĩa petri có môi trường thạch cao malt 2%. Nuôi cấy ở 30°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 cao malt 2% mới. Thu được nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68.

+ Kiểm tra đặc điểm sinh học

Các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch cao malt 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 được nghiên cứu theo phương pháp của Trịnh Tam Kiệt (2011). Theo các khóa phân loại về đặc điểm hình thái này, *Phanerochaete* sp. B68 được xếp thuộc ngành phụ nấm đảm Basidiomycotina, khuẩn lạc tròn đều, bề mặt dạng bột mịn, màu trắng (chuyển sang phớt hồng sau 7 ngày). Sợi nấm ngắn, mập, kết chặt vào nhau, tạo dạng bột nấm. Mặt dưới khuẩn lạc màu trắng ngà. Sợi nấm sinh trưởng nhanh, đạt tốc độ 625 $\mu\text{m/h}$. Khi nuôi cấy trong môi trường dịch thể cao malt 2%, chủng nấm sinh trưởng tốt, không sinh sắc tố ra môi trường. Các hạt pellet, hình cầu cầu tròn, có màu vàng nhạt, kích thước kích thước nhỏ ($\phi = 1 - 2$ mm). Các chủng nấm đều có hệ sợi phát triển. Hệ sợi của các chủng nấm có 2 trong 3 loại

sợi là sợi dinh dưỡng, sợi cứng và sợi bền. 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 4-5 μ m; 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 μ m, rất hiếm khi thấy phân nhánh; sợi bền cũng có vách dày, phân nhánh rõ rệt, không thấy có vách ngăn ngang, đường kính nhỏ hơn, Nhiều sợi nằm trong hệ sợi tạo thành khóa (clamp connection). Chúng phát triển trong dải nhiệt độ từ 15 ÷ 50°C, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 30-37°C, pH sinh trưởng 3÷9, tốt nhất ở 5÷6. Khi nuôi cấy trong môi trường dịch thể, pellet của chủng B68 có kích thước nhỏ (ϕ = 2 - 3 mm). Chủng sinh tổng hợp enzym phân hủy nhựa cây sterol esteaza khoảng 21,05 U/g gỗ và laccase khoảng 9,9 U/g gỗ sau 21 ngày ủ trên dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn. Hình ảnh sợi nấm và khuẩn lạc *Phanerochaete* sp. B68 được thể hiện trên hình 1.

+ Xác định trình tự gen chủng *Phanerochaete* sp. B68:

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 μ l 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 vortex 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, clorofom 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 μ l etanol 70% trước khi được hòa trong 50 μ l đệm TE. Chất lượng ADN được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%. Gen 5,8S rARN 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 rADN của chủng B68 có độ tương đồng cao (trên 98%) so với gen tương ứng của các chủng thuộc chi *Phanerochaete*: *Phanerochaete cumulodentata* LE298935 (KP994359), *Phanerochaete cf. australis* RG2014

(KJ8318974), *Phanerochaete* sp. JSP0011B3.2 (KR093843), *Phanerochaete magloliae* (KP135089) (Bảng 3.2). Kết hợp với các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, chủng B68 được đặt tên là *Phanerochaete* sp. B68. Trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước 650 bp như nêu trong SEQ ID NO: 1, được đăng ký trên GenBank mã số MN263249 với tên phân loại là *Phanerochaete* sp. B68. Trình tự vùng ITS 5,8S rADN của chủng *Phanerochaete* sp. B68 cũng được thể hiện trên hình 2.

Ví dụ 2: Xác định khả năng xử lý nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn để phân hủy nhựa cây trong dăm mảnh gỗ áp dụng trong sản xuất bột giấy hóa học tẩy trắng:

Dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn thu nhận từ nhà máy giấy Bãi Bằng, được xông hơi trong 30 phút, để nguội và cho vào các túi nilong và cấy 0,5 - 1% chủng B68 và ủ ở nhiệt độ 30-37°C. Kiểm tra sự phát triển của chủng nấm trên gỗ, trích ly kiểm tra hàm lượng nhựa cây còn lại trong nguyên liệu bằng phương pháp trích ly trong axeton và nấu đánh giá hiệu suất thu hồi xenluloza, đánh giá hàm lượng lignin thông qua chỉ số Kappa. Sợi nấm B68 phát triển tốt và nhanh chóng bao bọc dăm mảnh gỗ sau 3-5 ngày bổ sung. Hàm lượng nhựa giảm trong nguyên liệu gỗ Keo là trên 60% và gỗ Bạch đàn là trên 77 % và không làm giảm hiệu suất thu hồi xenluloza sau 21 ngày xử lý (hiệu suất thu hồi bột là 50,3% tương đương với đối chứng là 50,1%), hàm lượng lignin còn lại thấp hơn so với đối chứng không xử lý (xử lý là 18,3; đối chứng là 20,1).

Hình ảnh sợi nấm phát triển trên dăm mảnh gỗ được thể hiện trên hình 3.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng nấm *Phanerochaete* sp. B68 theo giải pháp hữu ích được phân lập từ dăm mảnh gỗ của nhà máy giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, Việt Nam có khả năng sinh trưởng tốt trên dăm mảnh gỗ Keo và Bạch Đàn và phân hủy chất trích ly nhựa cây trong dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn mà không làm giảm hàm lượng xenluloza thu được trên nguyên liệu, làm giảm hàm lượng nhựa trong nguyên liệu gỗ Keo giảm trên 60% và gỗ Bạch đàn giảm trên 77 %, hàm lượng lignin còn lại thấp hơn so với đối chứng (xử lý là 18,3; đối chứng là 20,1). Điều này đưa ra khả năng ứng dụng chủng nấm *Phanerochaete* sp. B68 cho xử lý nguyên liệu gỗ Keo và Bạch đàn để phân hủy nhựa cây trong dăm mảnh trong công nghiệp sản xuất bột giấy hóa học tẩy trắng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

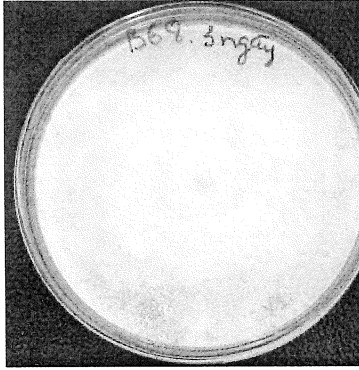
1. Chủng nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ dăm mảnh gỗ của nhà máy giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, Việt Nam có các đặc tính sau:

- Có khả năng sinh tổng hợp enzym sterol esteraza khoảng 21,05 U/g gỗ và laccaza khoảng 9,9 U/g gỗ sau 21 ngày ủ trên dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn;

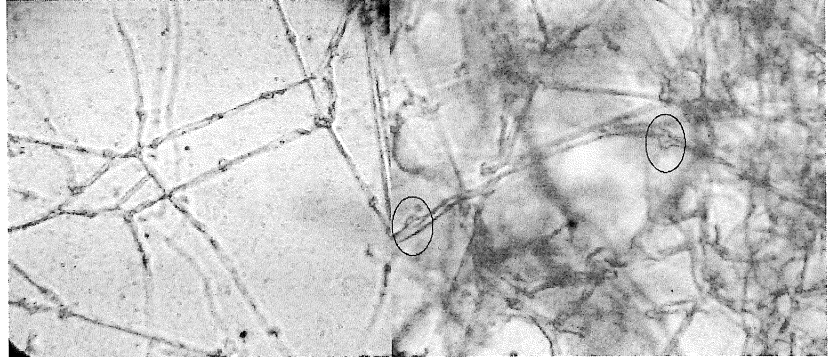
- Có khả năng sinh trưởng và làm giảm nhựa cây trong dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn, nguyên liệu dăm mảnh gỗ sau 21 ngày xử lý với chủng nấm *Phanerochaete* sp. B68 có hàm lượng nhựa giảm trên 60% với gỗ keo và trên 77% với gỗ Bạch đàn;

- Chủng nấm này có trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS4 với kích thước 650 bp như nêu trong SEQ ID NO: 1 và được đăng ký trên GenBank với mã số MN263249.

Hình 1. Ảnh khuẩn lạc (a) và hình thái hệ thái (b)



a



b

Hình 2. Trình tự vùng ITS 5,8S rADN của chủng *Phanerochaete* sp. B68

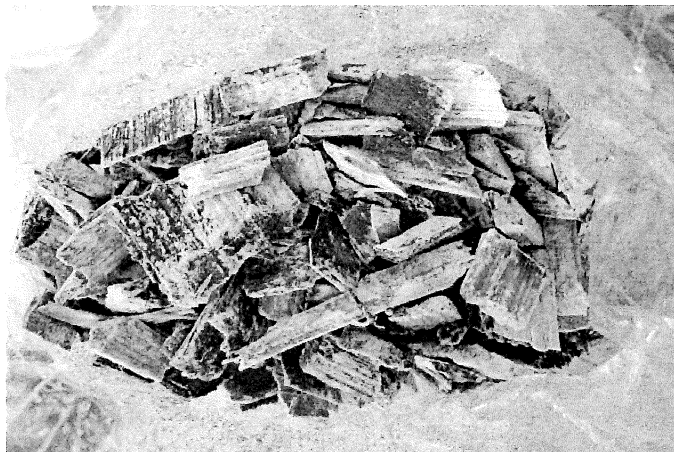
```

1  cgtagtgacc  tgcggaggat  cattaacgag  taactgaaca  ggtttagct  ggctctcgg
61  ggcatgtgca  cacctggctc  atccactctt  caacctctgt  gcacttggtg  taggtcggca
121  gaagggcgag  tctaacagct  cgctcggaag  ccttcctatg  ttttactaca  aacgcttcag
181  tttaagaatg  taaacctgag  tataacgcat  ctatatacaa  ctttcagcaa  cggatctctt
241  ggctctcgca  tcgatgaaga  acgcagcgaa  atgcgataag  taatgtgaat  tgcagaattc
301  agtgaatcat  cgaatctttg  aacgcacctt  gcgctccctg  gtattccggg  gagcatgcct
361  gtttgagtgt  catgggtattc  tcactccttc  taacttttgt  tatcgaaggc  atggacttgg
421  aggtcgtgct  ggctcctcgt  tgaatcagct  cctcttaaat  gtattagcgt  gagtgtaacg
481  gatcgcttcg  gtgtgataat  tatctgcgcc  gtggctgtga  agtaacataa  gcttgcgctt
541  ctaaccgtcc  ttaagctgga  caacttactt  tgacatctga  cctcaaatca  ggtaggacta
601  cccgctgaac  ttaagcatat  caataagcgg  aggaaaagaa  actaacaagg

```

//

Hình 3. Ảnh nấm B68 phát triển trên dăm mảnh gỗ sau 7 ngày



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> Chủng nấm mục trắng *Phanerochaete* sp. B68 thuần khiết về mặt sinh học

<160> 1

<210> 1

<211> 650

<212> ADN

<213> *Phanerochaete* sp.

<400> 1

```

1  cgtagtgacc  tgcggaggat  cattaacgag  taactgaaca  ggttgtagct  ggcctctcgg  60
61  ggcattgtgca  cacctggctc  atccactctt  caacctctgt  gcacttggtg  taggtcggca  120
121  gaagggcgag  tctaacagct  cgctcggaag  ccttcctatg  ttttactaca  aacgcttcag  180
181  ttttaagaatg  taaacctgcg  tataacgcat  ctatatacaa  ctttcagcaa  cggatctctt  240
241  ggctctcgca  tcgatgaaga  acgcagcgaa  atgcgataag  taatgtgaat  tgcagaattc  300
301  agtgaatcat  cgaatctttg  aacgcacctt  gcgctccctg  gtattccggg  gagcatgcct  360
361  gtttgagtgt  catggtattc  tcatccttca  taacttttgt  tatcgaaggc  atggacttgg  420
421  aggtcgtgct  ggttcctcgt  tgaatcagct  cctcttaaat  gtattagcgt  gagtgtaacg  480
481  gatcgcttcg  gtgtgataat  tatctgcgcc  gtggtcgtga  agtaacataa  gcttgcgctt  540
541  ctaaccgtcc  ttaagctgga  caacttactt  tgacatctga  cctcaaatca  ggtaggacta  600
601  cccgctgaac  ttaagcatat  caataagcgg  aggaaaagaa  actaacaagg  650

```