



(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) 
1-0021300

(51)⁷ **C12N 1/14**

(13) **B**

(21) 1-2017-02981

(22) 02.08.2017

(45) 25.07.2019 376

(43) 25.09.2017 354

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)**

Nhà A10, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Đặng Thị Cẩm Hà (VN), Nguyễn Đăng Thắng (VN), Thái Hoàng (VN), Trần Thị Thu Hiền (VN), Nguyễn Thúy Chinh (VN), Trần Xuân Bách (VN), Nguyễn Văn Huỳnh (VN)**

(54) **CHẾ PHẨM SINH HỌC PHÂN HỦY MÀNG POLYME CÓ NGUỒN GỐC TỪ DẦU MỎ VÀ CHẤT DẺO PHÂN HỦY SINH HỌC**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học. Trong đó, chế phẩm này chứa bào tử hoặc dịch enzym thu được từ môi trường nuôi cấy của bốn chủng nấm đảm mới được phân lập là Earliella scabrosa FBP11 (FBP11), Earliella scabrosa FBP13 (FBP13), Earliella scabrosa FQNa36 (FQNa36) và Earliella scabrosa FDNa20 (FDNa20).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh học phân hủy màng có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh học chứa bào tử của 4 chủng nấm đảm mới phân lập tại Việt Nam thuộc chi *Earliella*, có khả năng phân hủy màng polyme, plastic có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học như túi nilon, chất dẻo (plastic), nhựa PE, nhựa PE đã được xúc tiến oxy hóa (exo-biodegradable plastic) và chất dẻo phân huỷ sinh học. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme và plastic có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân huỷ sinh học chứa dịch enzym thu được từ môi trường nuôi cấy 4 chủng nấm đảm mới được phân lập tại Việt Nam thuộc chi *Earliella* nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất dẻo (còn được gọi là plastic, nhựa, v.v.) được sử dụng từ giữa thế kỷ trước và nhu cầu sử dụng chất dẻo không ngừng tăng lên, nhất là giai đoạn hiện nay. Theo tính toán gần đây nhất (2014) thì lượng chất dẻo tiêu thụ tới hơn 300 triệu tấn/năm. Bình quân đầu người năm 2015 sử dụng ở các khu vực trên thế giới rất khác nhau, mức tiêu thụ trung bình trên đầu người gần 79kg/năm. Tiêu thụ chất dẻo nhiều nhất là người Mỹ (155kg/người) và ít hơn cả là người châu Á tiêu thụ hơn 48 kg/người. Còn ở Việt Nam hơn 40kg/người. Polyetylen được tiêu thụ nhiều nhất chiếm tới 38% tương đương với 76 triệu tấn năm. Ở Việt Nam hiện đang sử dụng các loại chất dẻo sau đây: polyetylen (LDPE,HDPE), polyetylen terephthalat (PET), nilon polybutylen, polypropylen (PP), polystyren (PS), polyvinyl clorua (PVC), và các loại khác.

Lượng rác thải từ chất dẻo thải vào môi trường rất cao, tính đến 2012 ở Mỹ và châu Âu đã thải lần lượt 29 và 25,2 triệu tấn. Theo Liên Hiệp Quốc thì loại rác chất dẻo này chủ yếu mới xử lý được từ 22 đến 43% bằng chôn lấp, còn 35% được đổ vào đại dương. Rác thải nhựa polyme không ngừng tăng trên toàn thế giới. Nếu ước tính

đại dương. Rác thải nhựa polyme không ngừng tăng trên toàn thế giới. Nếu ước tính theo thể tích thì loại phế thải nằm trong các hố chôn lấp chiếm 20–30% rác thải sinh hoạt trên phạm vi toàn cầu. Lượng chất thải rắn của Việt Nam phát sinh trung bình hàng năm tăng khoảng 200% và tiếp tục tăng lên khoảng 44 triệu tấn/năm. Năm 2015, Việt Nam là nước có lượng rác nhựa đổ ra biển đứng thứ 4 trên thế giới, trung bình là 0,73 triệu tấn/năm, chiếm 6% lượng rác nhựa đổ ra biển của toàn thế giới (Trong sách xuất bản gần đây của Ellen MacArthur Foundation và McKinsey & Company “The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics” là công trình của 180 chuyên gia và phân tích 200 báo cáo liên quan đến chất dẻo). Qua những thông tin từ tư liệu này cho thấy một cách nhìn nhận mới về sự lãng phí ghê gớm về kinh tế từ chất dẻo và rác thải từ chất dẻo. Năm 2013 công nghiệp đã đưa vào thị trường 78 triệu tấn chất dẻo bao gói với giá trị lên tới 260 tỷ USD và ước tính đến năm 2050 sẽ lên 318 triệu tấn. Tuy nhiên, sau 40 năm sử dụng trên toàn thế giới thì chỉ có 15% chất dẻo bao gói được quay vòng tái sử dụng. Đã có đến 95%, tương đương với 80-120 tỷ USD chất dẻo bao gói bị mất sau thời gian ngắn sử dụng. Nếu tính cả thiệt hại do hiệu ứng nhà kính trong quá trình sản xuất và các hệ lụy xã hội, theo UNEP ước tính lên tới 40 tỷ USD.

Theo kết quả điều tra hàng năm ở các thành phố lớn của nước ta thải ra gần 200.000 tấn nhựa phế thải các loại, trong đó túi nilon và các loại bao bì bằng nhựa LDPE chiếm 75% (khoảng 150.000 tấn). Hiệp hội Nhựa Việt Nam cho biết, tổng doanh thu toàn ngành nhựa năm 2015 đạt 13.238 tỷ đồng, tăng 16%; lợi nhuận toàn ngành đạt 1.340 tỷ đồng, tăng 30% so với 2014. Theo các công ty sản xuất, thị trường bao bì nhựa có tốc độ tăng trưởng ấn tượng khoảng 15 – 20%, sức tiêu thụ của các loại bao bì nhựa tăng theo tính tiện dụng. Mức tiêu thụ nhựa bình quân đầu người của Việt Nam năm 1994 là 3,5 kg/người/năm; năm 2003 là 15 kg/người/năm (Trần Quang Ninh, Tổng luận "Chất thải nhựa, túi nilon và công nghệ xử lý", Trung tâm thông tin KH&CN quốc gia), trong 2011 và có xu hướng tăng cao trong 10 năm qua. Năm

2008, mức tiêu thụ nhựa bình quân đầu người đạt 22 kg/người/năm; năm 2010 là 33 kg/người/năm thì hiện nay con số này đạt trên 41 kg/người/năm, dự kiến đến năm 2020 con số này tăng lên 45 kg/người (Theo Cơ sở dữ liệu Tạp chí Công thương).

Chất dẻo do con người tạo ra và thành phần bao gồm cacbon, hydro, silicon, oxy, clorua và nitơ. Dầu thô, than đá, khí tự nhiên đã là nguồn nguyên liệu cơ bản cho việc chiết xuất tạo nên chất dẻo. Loại chất dẻo này rất bền vững theo thời gian. Chủ yếu, chất dẻo đang được sử dụng là polyetylen (LDPE, MDPE, HDPE và LLDPE), polyetylen terephthalat (PET), polybutylen terephthalat (PBT), nilon, poly-propylen (PP), polystyren (PS), polyvinyl clorua (PVC), và polyurethan (PUR).

Còn chất dẻo được tạo ra từ sinh khối hay nguồn nguyên liệu tái tạo như poly(hydroxybutyrat) (PHB), poly(lactid) (PLA) và tinh bột hỗn hợp được vi sinh vật hay enzym của chúng sinh ra dễ dàng phân hủy sinh học có tên gọi là chất dẻo sinh học “bioplastic”. Loại chất dẻo cũng có thể phân hủy sinh học bằng cải thiện mức độ thủy phân hay độ dài của chuỗi polyme có thể được giảm bằng sự oxy hóa nhờ sinh trường của vi sinh vật. Loại chất dẻo này được gọi là đã được xúc tiến oxy hóa (exobiodegradable) và được tạo ra trên cơ sở polyetyl (LDPE, MDPE, HDPE và LLDPE) kết hợp với các phụ gia xúc tiến oxy hóa và chúng thường là các ion kim loại chuyển tiếp được đưa vào ở dạng stearat hay phức chất với các phối tử hữu cơ khác. Các kim loại chuyển tiếp được sử dụng làm phụ gia xúc tiến oxy hóa gồm Ti, V, Cr, Mn, Fe 2 Co, Ni, Cu, Zn, Ca, v.v., trong đó hiệu quả nhất phải kể đến phức stearat của Co, Mn và Fe. Dưới tác động của tia cực tím (UV), nhiệt độ hoặc các tác động cơ học, các phụ gia thúc đẩy phản ứng oxy hóa mạch polym tạo thành các nhóm chức như cacbonyl, cacboxyl, hydroxit, v.v., tạo điều kiện cho vi sinh vật dễ dàng tiếp cận để phân hủy tiếp các mạch monome, dionome, oligome v.v.. Nhờ các chất xúc tiến oxy hóa, thời gian phân hủy chất dẻo từ hàng trăm năm giảm xuống còn vài năm thậm chí là vài tuần hay vài tháng đối với chất dẻo đã được cải biến này.

Như đã đề cập chất dẻo cũng có cấu trúc gần giống lignin cho nên cách tác động của laccaza enzym cũng thường xảy ra tương tự. Cơ chế hoạt động của enzym từ vi sinh vật nói chung và laccaza nói riêng cơ bản được mô tả như sau: Laccaza chỉ tấn công vào tiểu phần phenolic của lignin dẫn đến sự cắt vòng aryl-alkyl, oxy hóa Ca và cắt vòng C α -Cb. Laccaza xúc tác theo các bước sau (i) Khử đồng typ 1 bởi sự khử cơ chất; (ii) Chuyển electron trung gian từ đồng typ 1 sang typ 2 và typ 3; (iii) Khử oxy đến H₂O ở vị trí đồng typ 2 và 3. Với sự có mặt của chất gắn kết (mediators), họ enzym laccaza đã thể hiện rõ khả năng oxy hóa cao các hợp chất không phải là phenolic lignin. Các bước vi sinh vật phân hủy chất dẻo xảy ra như sau: Vi sinh vật (ở dạng đơn lẻ hay tổ hợp, tuy nhiên trong tự nhiên là tổ hợp vi sinh vật) sinh trưởng và tạo nên các enzym ngoại bào; Các enzym ngoại bào do vi sinh vật tiết ra bám lên bề mặt của chất dẻo; Chúng cắt chuỗi polyme và xảy ra bề mặt chất dẻo bị xói mòn, phân hủy sinh học chất dẻo xảy ra với tốc độ khác nhau do rất nhiều yếu tố tác động, sản phẩm cuối cùng của quá trình phân hủy chất dẻo là CO₂, H₂O và CH₄.

Cơ chế phân hủy sinh học chất dẻo (polyme và plastic): Thường vi sinh vật hiếu khí sử dụng oxy như là chất nhận điện tử và phá hủy các chất hóa học thành các chất hữu cơ nhỏ hơn thường tạo thành sản phẩm cuối cùng là CO₂ và nước. Còn vi sinh vật kỵ khí sinh trưởng và hoạt động khi không có mặt của oxy. Có một vài nhóm vi khuẩn kỵ khí sử dụng nitrat, sulfat, sắt, mangan, CO₂ như là nguồn nhận điện tử và phá cấu trúc các chất hữu cơ hóa học thành các chất có trọng lượng phân tử nhỏ hơn với cấu trúc hóa học thay đổi.

Nói chung, quá trình phân hủy sinh học polyme như sau: vi sinh vật bám lên bề mặt của màng polyme tạo khuẩn lạc trên bề mặt, chúng sinh trưởng và sinh tổng hợp các enzym khác nhau. Khi điều kiện môi trường phù hợp quá trình phân hủy polyme bằng các enzym theo 2 bước: bước thứ nhất: enzym gắn vào cơ chất của polyme tiếp đến là xúc tác cho quá trình thủy phân cắt vòng thơm. Polyme được phân hủy thành các oligome với trọng lượng phân tử thấp, dime, monome và cuối cùng là khoáng hóa

tạo nên CO₂ và nước. Để có được sự khoáng hóa hoàn toàn polyme phải nhờ đến hàng chuỗi enzym khác nhau và chỉ xảy ra có hiệu quả khi các chất cảm ứng, các chất gắn kết, các ion kim loại, pH, nhiệt độ v.v. có trong môi trường phù hợp và đồng cộng hưởng tác động.

Trong tự nhiên quá trình này xảy ra rất chậm, tuy nhiên, nhiều công trình gần đây đã chứng minh rằng có thể khoáng hóa được chất dẻo. Có những nghiên cứu cơ bản chứng minh được một số chủng vi sinh vật đơn lẻ có thể tham gia phân hủy được chất dẻo nhưng một chủng đơn lẻ không thể khoáng hóa được chất dẻo bởi cấu trúc của bền vững tạo nên chất dẻo đều có nguồn gốc dầu mỏ. Trừ loại có khả năng phân hủy sinh học nhanh và hoàn toàn có xuất xứ từ sinh khối thì loại polyme tạo ra từ quá trình xúc tiến oxy hóa nhờ một số kim loại Fe, Co, Ni, Cu, Ti, V, Cr, Mn, Zn, Ca v.v., đang được sử dụng tại một số quốc gia đã được thương mại hóa. Nếu được tác động trước (tiền xử lý) bởi các tác nhân hóa học, lý học và như tia cực tím (UV), các phụ gia, nhiệt độ hoặc các tác động cơ học khác nhau thì quá trình oxy hóa mạch polyme được thúc đẩy để các phản ứng tạo thành các nhóm chức như cacbonyl, cacboxyl, hydroxit, v.v., được hình thành nhanh hơn và đây là điều kiện cho vi sinh vật dễ dàng tiếp cận để phân hủy tiếp. Quá trình phân hủy loại polyme này cũng gần giống như đối với lignoceluloza (lignin, hemixenluloza, xenluloza) chỉ khác là nguồn gốc và quá trình tạo ra các chất dẻo khác hoàn toàn với polyme tái tạo có nguồn gốc thiên nhiên. Tổ hợp chuỗi các phẩm ứng sinh hóa xảy ra cũng tương tự và tuân thủ theo các cơ chế mà ở đó các enzym ngoại bào, nội bào đều hoạt động.

Vậy sử dụng cùng một lúc tổ hợp của các chủng sinh laccaza để phân hủy polyme chỉ khác ở chỗ laccaza đóng vai trò là chất xúc tác mạnh hoạt động cần nguyên tử oxy và phản ứng oxy hóa cắt vòng xảy ra rất nhanh để sản phẩm cuối cùng do hoạt động của enzym thuộc họ oxidoreductaza này lại trở thành chất đầu vào rất khác nhau cho hoạt động của các nhóm vi sinh vật có trong môi trường. Còn đối với quá trình phân hủy kỵ khí thì mangan peoxidaza và lignin peoxidaza (MnP và LiP)

đóng vai trò xúc tác, nhưng cần có H_2O_2 và sản phẩm tạo ra chính dạng khí là H_2S . Cuối cùng tất cả mọi qui trình sinh học cũng đi vào chu trình Creb để khoáng hóa thành các axit béo, sinh khối vi sinh vật, CO_2 và nước.

Cho đến nay chưa có giải pháp nào mang tính khả thi cao cho các nước phát triển và đang phát triển về xử lý loại ô nhiễm rác thải chất dẻo, đặc biệt là chất dẻo sản xuất từ nguyên liệu hóa thạch và nhiều nhất là dầu mỏ. Còn rác thải từ chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học (bioplastic) đã không còn là vấn đề rất khó với quá trình phân hủy sinh học nhờ có giải pháp hữu hiệu xử lý bằng các công nghệ khác nhau, trong đó có xử lý bằng hệ enzym hay ủ compost với nhiệt độ cao được kiểm soát. Hiện nay số lượng rác thải là nhựa có thể phân hủy sinh học chiếm một thị phần rất khiêm tốn vì sản xuất với chi phí rất cao. Bốn thế kỷ qua các nghiên cứu phân hủy sinh học không ngừng tìm kiếm các con đường để xử lý rác thải là chất dẻo (nhựa, túi nilon, bao bì sử dụng trong công nghiệp, y tế, nông nghiệp và trong đời sống hàng ngày). Rác thải là chất dẻo chủ yếu vẫn đang được chôn lấp. Hệ lụy của việc này không chỉ tổn thất kinh tế mà gây nên ô nhiễm môi trường nước ngầm cũng như giảm chất lượng cuộc sống của cộng đồng sống quanh vùng chôn rác. Một trong các con đường để giảm tác động của rác thải chất dẻo là sử dụng tổ hợp vi sinh vật sống cùng với tạo điều kiện môi trường phù hợp để cho quá trình phân hủy sinh học chất dẻo có hiệu quả cao nhất có thể. Một con đường nữa là sử dụng hệ enzym từ nấm đảm, nấm sợi, xạ khuẩn và vi khuẩn sinh tổng hợp để xử lý. Cách này cần thêm các chuỗi kỹ thuật khác để sao cho enzym tạo ra bền, tiêu hao thấp nhất và hoạt động được trong các điều kiện môi trường sinh thái khác nhau. Hơn thế nữa có thể kết hợp với nhiệt độ và các tác nhân vật lý, cơ học khác nhằm tạo điều kiện thuận lợi để vi sinh vật có thể sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất với chất dẻo để cuối cùng khoáng hóa được chất dẻo mà sản phẩm ở điều kiện hiếu khí là CO_2 , H_2O , còn ở điều kiện kỵ khí là CO_2 , H_2O và CH_4 . Các quá trình phân hủy, chuyển hóa dẫn đến khoáng hóa hoàn toàn rất phức tạp và rất dài, tuy nhiên ở mỗi điều kiện môi trường và mỗi quần xã vi sinh

vật hay mỗi nhóm enzym không hoạt động giống nhau. Kết quả là chúng lại hỗ trợ cho nhau, cho nên các nhà khoa học công nghệ cần chọn được con đường phân hủy hiệu quả nhất đối với từng loại polyme và plastic. Các nghiên cứu đã sử dụng lên men trực tiếp các vi sinh vật sống với các loại chất dẻo nhưng cũng có thể sử dụng hỗn hợp enzym do chúng sinh tổng hợp trên môi trường rắn hoặc lỏng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của chúng (kể cả chất dẻo khó phân hủy và chất dẻo đã được cải biến exo-biodegradable và phân hủy sinh học). Thường thì, để dễ đánh giá hiệu quả cho công bố quốc gia và quốc tế thì chọn một hay hai enzym để khảo sát theo thời gian với các tiêu chí chuẩn để xác định khả năng phân hủy, chuyển hóa các loại chất dẻo có nguồn gốc và cách sản xuất khác nhau thường được lựa chọn đầu tiên. Cách này khó có thể làm cơ sở khoa học đủ mạnh để dẫn đến công nghệ khả thi nếu xét cả về mặt kỹ nghệ, kinh tế và bảo vệ môi trường.

Loại bỏ rác thải chất dẻo bằng phân hủy sinh học tập trung vào các polyme được tiêu thụ chủ yếu hiện nay như polyetylen, polypropylen, polyuretan và polystyren. Điều đáng tiếc là các polyme trên lại là những loại rất bền vững. Một trong các phương pháp thành công nhất có thể coi là giải pháp hàng đầu là phân hủy nhờ enzym và cần phải tăng cường tốc độ phân hủy chúng. Vậy các cơ sở khoa học có liên quan nằm ở đâu? Và tại sao sử dụng enzym đã trở thành một trong các giải pháp hàng đầu? Nhóm enzym nào cần nhất và quan trọng trong việc chuyển hóa phân hủy chất dẻo? Các nhóm enzym đó thuộc họ enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa lignoxenluloza và các enzym hoạt động giống như các chất xúc tác oxy hóa các hợp chất phenol và không phải phenol.

Địa điểm tốt nhất để lấy mẫu phân lập và lựa chọn các vi sinh vật sinh tổng hợp các enzym tham gia phân hủy chất dẻo là chỗ chôn lấp rác thải sinh hoạt, công nghiệp lẫn nhựa, túi nilon hay từ quá trình ủ compost mà nguyên liệu là lignoxenluloza v.v.. Khả năng chuyển hóa, phân hủy trong quá trình ủ compost cũng là một tiêu chí quan trọng của ASTM trong việc đánh giá khả năng phân hủy sinh học của chất dẻo. Trong

hàng loạt enzym tiềm năng cao để phân hủy chất dẻo thì laccaza vẫn được xếp vào vị trí ưu tiên do khả năng xúc tác và chỉ cần nguyên tử oxy. Vì vậy nếu kết hợp được những ưu thế này thì nghiên cứu để tạo ra một công nghệ xanh để xử lý rác chất dẻo sẽ có tính khả thi cao. Trong bài toán khó với lượng rác nhựa tăng dần mỗi năm trên toàn hành tinh của chúng ta và ở từng nước khác nhau, Việt Nam cũng không phải là ngoại lệ trong việc phải đối diện với vấn đề xử lý mà không gây ô nhiễm thứ cấp và ngoài ra, có thể tái sử dụng.

Enzym laccaza

Laccaza (benzenediol-oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) được nhận thấy ở thực vật, côn trùng, vi khuẩn và nấm và trong tự nhiên, enzym này phản ứng với các hợp chất phenol (Ramos *et al.*, 2011). Sự phân bố rộng rãi của laccaza ở nấm và sự đa dạng của chúng, đặc biệt là ở nấm đảm đã góp phần vào những nghiên cứu sâu về những nguồn enzym mới được cải tiến (Haibo *et al.* 2009). Mặc dù trung tâm xúc tác chứa đồng là tương tự nhau ở tất cả các laccaza của nấm nhưng những điểm khác nhau đáng kể đã được mô tả dựa trên các đặc tính động học và nhiệt học của chúng (de Oliveira *et al.* 2009).

Laccaza thuộc về nhóm enzym polyphenol oxidaza có chứa đồng trong trung tâm xúc tác và thường được gọi là enzym oxidaza đa đồng. Chúng sử dụng oxy phân tử để oxy hóa rất nhiều các hợp chất thơm và không thơm thông qua cơ chế xúc tác gốc tự do và tạo thành phân tử nước là sản phẩm phụ duy nhất. Do đó, chúng được coi là các chất xúc tác sinh học xanh và được quan tâm ngày càng nhiều. Thêm vào đó, laccaza từ nấm hầu hết là enzym ngoại bào nên dễ dàng được tinh chế. Hơn thế nữa, laccaza sử dụng đồng làm đồng tác nhân (cofactor) mà nguồn cung cấp chất này rất dễ dàng từ những muối đồng rẻ tiền. Tất cả những ưu thế này đã làm cho chất xúc tác laccaza có tiềm năng đối với các quá trình công nghiệp. Ứng dụng của laccaza có thể được chia thành 6 nhóm chính bao gồm bảo vệ môi trường, tổng hợp hữu cơ, cảm

biến sinh học và chất báo cáo sinh học (bioreporter), y tế, thực phẩm và các ngành kỹ thuật (Xu, 2005). Tuy nhiên, do giá thành thương mại của laccaza tinh sạch cao, việc khai thác nhằm ứng dụng chúng trong công nghiệp bị hạn chế.

Laccaza được phân lập từ nấm đảm (*Basidiomycetes*), nấm sợi (*Ascomycetes*), nấm bất toàn (*Deuteromycetes*) (Aisemberg et al, 1989). Đặc biệt, nấm đảm được coi là những sinh vật sản sinh ra laccaza có hiệu quả (Ravankar và Lele 2006, Sadhasivam et al. 2008) và cho đến nay cũng là sinh vật duy nhất có khả năng phân hủy các thành phần của gỗ như lignin, xenluloza, hemixenluloza. Hầu hết các loài nấm mục trắng được ghi nhận sản sinh laccaza ở các mức độ khác nhau (Hatakka 2001). Trong số này, *Trametes versicolor* (trước đây gọi là *Coriolus versicolor* hoặc *Polyporus versicolor* được nghiên cứu nhiều nhất về khả năng sản xuất laccaza ở mức công nghiệp. Ngoài ra, các loài khác trong chi này như *T. pubescens*, *R. hirsuta*, *T. gallica* (Galhaup et al. 2002; Rodríguez-Couto et al. 2003; Dong et al. 2005) cũng sinh tổng hợp laccaza với hoạt tính khác nhau.

Laccaza của nấm thường là những đa isoenzym được biểu hiện trong các vật chủ khác nhau dưới các điều kiện sinh trưởng khác nhau. Đã có rất nhiều các nghiên cứu được thực hiện để cải thiện việc sản xuất laccaza như tối ưu hóa điều kiện môi trường, phân lập và nhân giống những chủng có hoạt tính laccaza cao, sử dụng các chất cảm ứng và biểu hiện các gen laccaza đã được tái tổ hợp (Wang et al. 2013). Hơn nữa, hầu hết laccaza là những enzym cảm ứng ngoại bào, tốc độ tổng hợp và hoạt tính của chúng phụ thuộc rất lớn vào sự có mặt của các chất cảm ứng thích hợp làm tăng hiệu suất sinh enzym (Kocyigit et al. 2012). Laccaza được quan tâm đặc biệt về những ứng dụng công nghiệp tiềm năng của chúng do khả năng oxy hóa của chúng đối với hàng loạt các chất ô nhiễm và các chất độc bao gồm các hydrocacbon thơm mạch vòng có nguồn gốc từ dầu mỏ, thuốc nhuộm, thuốc bảo vệ thực vật, các chất ô nhiễm nồng độ thấp v.v.. Sinh tổng hợp laccaza được điều hòa cao bởi thành phần môi trường. Vì vậy, tối ưu hóa thành phần môi trường đã trở thành một trong những

phương pháp chính để tăng cường khả năng sản xuất laccaza. Nguồn cacbon và ion đồng là hai yếu tố quan trọng nhất trong quá trình cải thiện hoặc kích thích quá trình sinh tổng hợp laccaza (Wang *et al.* 2014; Passarini *et al.* 2015). Laccaza có thể oxy hóa hàng loạt các hợp chất hữu cơ và vô cơ bao gồm mono, di, polyphenol, aminophenol, methoxyphenol cũng như nhiều hỗn hợp của kim loại cho nên laccaza trở thành ứng cử viên nặng ký trong ứng dụng công nghệ sinh học. Nấm sinh trưởng ở các môi trường rất bất lợi nên chúng cũng sinh ra các enzym rất lạ có khả năng hoạt động trong các phản ứng hóa học rất khó xảy ra ở điều kiện bình thường. Ngoài những ứng dụng trên thì laccaza còn làm chất thêm cho sản xuất thực phẩm, đồ uống, chuẩn đoán bệnh trong y tế, và đóng vai trò là chất gắn trong kết cấu của sản xuất nhiên liệu. Laccaza, và LMCO (Laccaza-like multicopper oxidase) gen cùng với protein tương ứng đã được chứng minh tham gia sinh tổng hợp rất nhiều các chất phục vụ y tế, làm sạch môi trường ô nhiễm các chất vòng thơm và các chất không phải là hữu cơ, chính bản thân laccaza có thể tạo nên thuốc chữa ung thư, tạo các cảm biến (sensor) để phát hiện ma túy, các chất hữu cơ ô nhiễm, khử độc nhanh các chất hữu cơ nồng độ thấp (là các chất phá hỏng hệ nội tiết- dẫn đến giảm sức đề kháng) v.v.. Do laccaza có phổ cơ chất rất đa dạng và hoạt động như một chất xúc tác cần có O₂ và phản ứng cuối cùng tạo ra nước nên tiềm năng ứng dụng rất cao trong rất nhiều lĩnh vực của đời sống kinh tế. Laccaza được chú trọng nghiên cứu bởi nó được sử dụng hiệu quả trong phát triển các cảm biến sinh học (biosensor) và tế bào nhiên liệu. Hơn thế nữa, nhóm enzym laccaza còn là các chất xúc tác hiệu quả trong chuyển hóa các chất xenobiotic (chất khó phân hủy sinh học) trong tái tạo môi trường ô nhiễm bởi các chất nguy hiểm nêu trên. Đối với chất dẻo và chất dẻo cải biến thì những nghiên cứu sử dụng laccaza chưa nhiều.

Nấm đảm có phân hủy chất dẻo hay không? Câu trả lời là có, nhưng được công bố chưa nhiều. Trong một công trình của Sasek *et al.* 2006 đã chứng minh rằng việc sử dụng các loài nấm đảm thì *Pleurotus Ostreatus strains*, *Inonotus hispidus*,

Phanerochaete chrysosporium, *Irpex lacteus*, *Agaricus bisporus*, *Stropharia rugosoannulata*, *Polyporus squamosus* đã thể hiện khả năng phân hủy các polyme tổng hợp (Sasek V, Vitasek J, Chromcova D, Prokopova I, Brozeka J, Nahlik J (2006) Biodegradation of Synthetic Polymers by Composting and Fungal Treatment. *Folia Microbiol* 51(5):425–430) 2006;51(5):425-30. Chủng PV1 thuộc loài nấm đảm *Phanerochaete chrysosporium* cũng đã được chứng minh là có khả năng phân hủy màng film PVC (Ali M I, Perveen Q, Ahmad B, Javed I, Razi-Ul-Hussnain R, Andleeb S, Atique N, Ghumro P B, Ahmed S, Hameed A (2009) Biodegradation studies of cellulose blended polyvinyl chloride films. *Int J Agric Biol* 11: 577–580). Đáng chú ý là một số chủng thuộc chi *Earliella*, loài *Earliella Scabrosa* được thông báo có khả năng sinh laccasa và các hoạt chất có hoạt tính sinh học khác. Các hoạt chất đó có thể bào chế thuốc hay phẩm chức năng hay sử dụng để ức chế các loại nấm phá gỗ. Nói chung, chưa phát hiện được các loài khác thuộc chi nấm giống cái tai này. Theo những nghiên cứu đã công bố thì ở các nước khác nhau như Brazil, Malaysia, Venezuela, Hồng Kong, Pháp, Sri Lanka v.v., chúng được phân lập, nghiên cứu một số đặc tính và định danh. Các chủng phân lập từ các khu vực địa lý khác nhau có chung đặc tính di truyền và chỉ thuộc 1 loài, nhưng lại khác nhau về đặc tính sinh hóa. Loài nấm đảm *Earliella scabrosa* được phân lập từ rừng Malaysia có khả năng tạo các ức chế từ sinh khối lên men đối với các loại nấm đảm khác như *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune*, *Lentinus* sp., *Lentinus strigosus*, *Microporus affinis* và *Microporus xanthopus* phá hỏng gỗ là cây cao su với các giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) từ 0,61 đến 5µg/µl. (Antifungal Activity of In-vitro Grown *Earliella Scabrosa*, a Malaysian Fungus on Selected Wood-degrading Fungi of Rubberwood. Teoh Yi Peng and Mashitah Mat Don, *Journal of Physical Science*, Vol. 24(2), 21–33, 2013). Còn chủng nấm đảm FPT31 phân lập từ rừng nguyên sinh Phú Thọ, Việt Nam với khả năng sinh laccasa và các hoạt chất khác để tạo thực phẩm chức năng (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.* 2016). Chủng nấm của Việt Nam này thuộc chi *Earliella* và chi này thuộc họ *Polyporaceae* và tên chủng là *Earliella* sp. FPT31.

Earliella sp. FPT31 có khả năng sinh tổng hợp exopolysaccharit (EPS 3 g/l) và enzym laccasa (Lac) với hoạt tính hơn 10.606 U/l có nhiều ứng dụng để tạo thuốc, thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung cho người, vật nuôi và cây trồng.

Earliella là chi nấm thuộc họ *Polyporaceae*, đây là đơn chi, chỉ gồm duy nhất một loài là *Earliella scabrosa*. Chúng còn có các tên khác như *Trametes scabrosa* (Cunn, 1965), *Scindalma scabrosum* (Kuntze, 1898), *Ischnoderma scabrosum* (Zmitr, 2001), *Fomes scabrosus* (Cooke, 1885), *Pelloporus scabrosus* (Bondartsev, 1961). Theo mô tả của Gilbertson và Ryvardeen (1985), *Earliella* có quả thể mọc bung ngược, tỏa ra, đôi khi mọc xếp chồng lên nhau. Chúng thường mọc tỏa rộng dọc theo các khúc gỗ cây bị đổ, rụng là hay bị mục. Quả thể cứng và dai, bề mặt nhẵn, có cá khoanh màu đồng tâm tỏa rộng, đầu tiên có màu trắng đến kem, sớm bị bao phủ bởi một lớp biểu bì màu đỏ bắt đầu từ gốc. Ở các quả thể già, lớp biểu bì này gần như bao phủ toàn bộ bề mặt nhưng ở các mẫu nấm còn non, thì lớp này chỉ là một vùng rất hẹp bên cạnh lớp nền. Khi bị khô, lớp biểu bì thường bị hơi nhăn, cá biệt có những mũ dày tới 1 cm ở gốc, có khi rộng tới hơn 4 cm. Quả thể có chứa các lỗ, bề mặt lỗ màu trắng, các lỗ uốn lượn một cách khá phức tạp, đặc biệt phần nghiêng của mũ nấm dài 2-3 mm, cá biệt có những lỗ dài tới 6 mm, các ống đồng màu, dài tới 5 mm. Nền trắng, dày tới 3 mm, cách biệt với phần trong bằng một vạch màu đậm, phần phía trong này được bao phủ bởi một lớp biểu bì đỏ. Hệ sợi nấm khi còn non có dạng mảnh, mọc nhô lên, sau đó xẹp xuống và cuộn vào thân nấm. Hệ sợi nấm sinh sản với dạng kẹp, thành mỏng, rộng 1,5- 4 μm , thường khó gặp trong các mẫu nấm khô. Sợi nấm phân bố dạng vân chi, thành mỏng và rắn, trong suốt, rộng 3-6 mm, liên kết với các sợi nấm khung nhưng bị phân nhánh với các nhánh thon bên trong. Chúng phân bố ở hầu như toàn miền nhiệt đới.

Theo những tài liệu thu thập được, có rất ít các công bố về các đặc tính sinh học của chi nấm *Earliella*. Loài nấm *Earliella scabrosa* đã được công bố về khả năng sinh tổng hợp enzym laccasa và mangan peroxidaza. Trên môi trường nuôi cấy rắn

với thành phần là bã mía và amoni sulfat làm nguồn nitơ, *E. scabrosa* sinh tổng hợp mangan peroxidaza cao nhất là 3.692 U/g và sau 11 ngày lên men và 3.655 U/g sau 21 ngày. Cũng trên môi trường này, hoạt tính laccaza thu được cao nhất sau 11 ngày lên men là 44,3 U/g. Đồng thời nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng enzym thô thu từ chủng này sau 11 ngày lên men có khả năng loại màu thuốc nhuộm Navy FNB, Red FN-3G và Yellow P6GS với % loại màu lần lượt là 80; 45,9 và 60,9 % (Guerra *et al.*, 2008 Guerra, G., Domínguez, O., Ramos-Leal, M. et al. Sugar Tech (2008) 10: 260, “Production of laccase and manganese peroxidase by white-rot fungi from sugarcane bagasse in solid bed: Use for dyes decolourisation”)

Thêm nữa, theo nghiên cứu của Liew *et al.* (2015) đã cho thấy dịch chiết trong ethanol của *E. scabrosa* đặc tính chống oxy hóa với giá DPPH đạt 21,27 %. Dịch chiết này cũng có khả năng ức chế sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn kiểm định gây bệnh *Clostridium difficile*, *Streptococcus pyogenies*, *Pseudomonas aeruginos*, *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* với nồng độ vi sinh vật tối thiểu lần lượt là 225; 112,5; 28,13; 225 và 225 µg/mL. Tuy nhiên lại có rất ít các nghiên cứu đã công bố về khả năng sinh tổng hợp các enzym ngoại bào khác ngoài laccaza, MnP của các chủng nấm thuộc chi *Earliella* và dịch chiết thô có khả năng phân hủy chất dẻo. Vì vậy nghiên cứu tìm kiếm và khai thác để sử dụng chúng đã, đang và sẽ rất được rất quan tâm.

Một số loài nấm, nấm mốc, vi khuẩn, thực vật, v.v., đều có khả năng sinh tổng hợp laccaza và giống -laccaza (laccase-like multicuper oxidase), nhưng phải hiểu chính xác rằng ngoài laccaza ra chúng còn tạo ra rất nhiều enzym và các chất trao đổi chất khác khi sinh trưởng. Cho nên chính những enzym và các chất trao đổi chất được cùng tạo thành trong quá trình sinh trưởng đóng một vai trò không nhỏ cho việc áp dụng công nghệ trong xử lý ô nhiễm rác thải trong đó có chất dẻo. Như vậy có thể sử dụng nấm mốc để “lên men” tạo chế phẩm để phân hủy và tiến tới loại bỏ chất dẻo hay sử dụng dịch nuôi cấy nấm mốc (laccaza thô và các enzym khác cùng đồng hành)

với hoạt tính laccaza cao để xử lý rác polyme và plastic. Ngoài ra cũng có thể sử dụng sản phẩm lên men rắn các chủng nấm này dạng bào tử để tiến xử lý rác là túi nilon trước khi ủ compost bởi các vi sinh vật ưa nhiệt.

Bốn chủng thuộc chi *Earliella* trong sáng chế này không những có khả năng sinh tổng hợp enzym laccaza cũng với hoạt tính cao và các enzym ngoại bào khác như CMCaza, xylanaza, chitinaza, proteaza, lipaza, amylaza. Chế phẩm tạo ra từ hỗn hợp nuôi cấy của 4 chủng này có khả năng sử dụng để phân hủy chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học (được cấp chứng chỉ châu Âu có nguồn gốc từ Hà Lan) và polyme có nguồn gốc dầu mỏ ở mức độ khác nhau như polyetylen đã được cải biến.

Sáng chế này đề cập đến quá trình phân lập, phân loại 4 chủng nấm đảm thuộc chi *Earliella* từ gỗ mục thuộc các khu vực Trung bộ và tây Nam bộ khác nhau của Việt Nam và tạo chế phẩm dạng dung dịch hay dạng rắn từ tổ hợp sản phẩm nuôi cấy bởi 4 chủng nói trên để phân hủy polyme có nguồn gốc dầu mỏ và chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học ở mức độ khác nhau. Ví dụ màng polyme được tạo thành từ bổ sung kim loại xúc tiến oxy hóa mà nguyên liệu bao gồm 90% HDPE+LLDPE và 10 % của Mn (II), Fe (III) và Co (II) sterat tổng hợp thành chất dẻo đã được xúc tiến oxy hóa (dạng túi nilon) tại Việt Nam; túi nilon bán tại nước ngoài (Hà Lan được cấp chứng chỉ phân hủy sinh học của châu Âu) và túi nilon bán tại siêu thị Việt Nam được khuyến cáo là “tự phân hủy sinh học” tuy nhiên mới chỉ được cấp chứng nhận là túi “thân thiện môi trường”. Các chủng nấm đều được phân lập từ gỗ thân, cành gỗ mục của cây keo, cây cao su và các loại cây rừng khác. Vì một chủng không thể có nhiều loại laccaza và các enzym khác đi kèm (vì chúng luôn luôn hoạt động ở các giai đoạn khác nhau để tiến tới có thể khoáng hóa hoàn toàn polyme).

Tóm lại lý do để tạo nên sáng chế xét về khía cạnh sáng tạo từ nguồn nguyên liệu di truyền bản địa là:

Cho đến nay đã có tới hơn 100 loại laccaza được phát hiện và nghiên cứu. Trong đó, có hơn 90 laccaza đã được mô tả cấu trúc. Laccaza có rất nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực của đời sống kinh tế xã hội và có hiệu quả rõ rệt nhất được nghiên cứu ở lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường. Đặc biệt là các loại ô nhiễm xenobiotic và hợp chất hữu cơ đa vòng thơm đã được chứng minh là bị các enzym thuộc nhóm oxidoreductaza (laccaza, tyrosinaza và peroxidaza (MnP và LiP, v.v.)) xúc tác phân hủy và nhờ các nhóm vi sinh vật khác tiếp tục hoạt động để cuối cùng khoáng hóa (tạo CO₂, axit béo, sinh khối vi sinh vật và nước) được các chất ô nhiễm nêu trên;

Laccaza đã được biết tới với khả năng phân hủy lignin mà bản chất của chất dẻo có nguồn gốc dầu mỏ như PE chẳng hạn cũng có cấu trúc giống như lignin. Cho nên việc sử dụng tổ hợp laccaza là một định hướng mang lại hiệu quả cao cho việc phân hủy rác chất dẻo và thường được gọi là túi nilon (hay màng polyme);

Laccaza sinh tổng hợp từ các chủng vi sinh vật khác nhau có hoạt tính khác nhau phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như nguồn cơ chất (inducers), hệ thống chất gắn kết (mediators), các yếu tố môi trường khác như nhiệt độ, pH, các kim loại và nồng độ của chúng v.v., chính vì vậy để giải quyết vấn đề phân hủy rác thải rắn chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học nói chung và khó phân hủy sinh học nói riêng, cần một cách tiếp cận khác. Enzym ngoại bào và các enzym nội bào từ vi sinh vật khác đã được các nhà khoa học chứng minh rằng có khả năng phá cấu trúc polyme của chất dẻo (danh sách và nội dung chính của các bài báo liên quan được trích dẫn ở các trang cuối của bản mô tả này), cắt thành phân đoạn, phân hủy và tạo sản phẩm trao đổi chất được các nhóm vi sinh vật khác tiếp tục chuyển hóa chất dẻo thành các sản phẩm cuối cùng không độc cho môi trường.

Ngoài ra, 4 chủng nấm đảm được phân lập mới có khả năng sinh tổng hợp laccaza với hoạt tính cao và các enzym ngoại bào khác đồng hành cũng được phân loại định danh và tổ hợp laccaza của chúng có khả năng phân hủy chất dẻo được biết

đến với khả năng phân hủy sinh học ở mức độ khác nhau của các loại túi nilon hiện đang được sử dụng trong đời sống, sinh hoạt hàng ngày của người Việt và của người châu Âu để so sánh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh học chứa bào tử của 4 chủng nấm đảm mới phân lập tại Việt Nam thuộc chi *Earliella*, có khả năng phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học như túi nilon, chất dẻo (plastic), nhựa PE, nhựa PE đã được xúc tiến oxy hóa (exo-biodegradable plastic) và túi có khả năng phân hủy sinh học được cấp chứng chỉ của châu Âu. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme, plastic có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học chứa dịch enzym thu được từ môi trường nuôi cấy 4 chủng nấm đảm mới phân lập tại Việt Nam thuộc chi *Earliella* nêu trên.

Chế phẩm theo sáng chế chứa bào tử của 4 chủng nấm đảm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) được phân lập từ các tỉnh Bình Phước, Quảng Nam, Đà Nẵng, Việt Nam. Trong đó, trình tự đoạn ITS của các chủng này đã được đăng ký trên Genbank. Có các mã số lần lượt là: FBP11: MF521432.1; FBP13: MF521433.1; FQNa20: MF521434.1 và FQNa36: MF073283.1

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và nhựa phân hủy sinh học chứa dịch enzym thu được từ môi trường nuôi cấy 4 chủng nấm đảm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) này.

Bốn chủng *Earliella scabrosa* FBP11, *Earliella scabrosa* FBP13, *Earliella scabrosa* FQNa36 và *Earliella scabrosa* FDNa20 này sinh tổng hợp laccaza và một số enzym ngoại bào khác như CMCaza, xylanaza, chitinaza, proteaza, lipaza, amylaza với hoạt tính khác nhau. Enzym thô thu được từ môi trường nuôi cấy các chủng nấm này cũng có khả năng loại màu thuốc nhuộm thuộc nhóm anthraquinon RBBR và azo là NY7 với hiệu suất cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là biểu đồ thể hiện khả năng loại màu thuốc nhuộm NY7 khi không có mặt chất gắn kết VIO (A); khi có mặt chất gắn kết VIO (B) của dịch enzym thô thu được từ môi trường nuôi cấy 4 chủng nấm *Earliella scabrosa* FBP11, FBP13, FDNa20, FQNa36.

Hình 2 là biểu đồ thể hiện khả năng loại màu thuốc nhuộm RBBR khi không có mặt chất gắn kết VIO (C); khi có mặt chất gắn kết VIO (D) của dịch enzym thô từ 4 chủng nấm *Earliella scabrosa* FBP11, FBP13, FDNa20, FQNa36.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện hoạt tính laccaza theo thời gian.

Hình 4 là biểu đồ thể hiện hoạt tính CMCaza, xylanaza, chitinaza, proteaza, lipaza, amylaza theo thời gian

Hình 5 thể hiện phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của mẫu màng túi nilon VN1 ban đầu (A), sau 30 ngày xử lý (B).

Hình 6 thể hiện phổ FTIR của mẫu màng túi nilon Hà Lan ban đầu (A), sau 30 ngày xử lý (B).

Hình 7 thể hiện phổ FTIR của mẫu màng túi nilon VHL ban đầu (A), sau 30 ngày xử lý (B).

Hình 8 thể hiện hình thái bề mặt các loại túi nilon trước và sau 30 ngày xử lý.

Hình 9 thể hiện hình thái bốn chủng nấm phân lập được.

Hình 10 thể hiện cây phát sinh chủng loài của các chủng nấm theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và nhựa phân hủy sinh học theo sáng chế chứa bào tử của 4 chủng nấm đảm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) được phân lập từ các tỉnh Bình Phước, Quảng Nam, Đà Nẵng, Việt Nam. Các chủng nấm này đều là các chủng phân lập mới, được định danh và xác định đặc tính bởi các tác giả sáng chế.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành phân lập các chủng nấm đảm từ nhiều tỉnh, thành tại Việt Nam như Bình Phước, Quảng Nam, Đà Nẵng.

Môi trường PDA được dùng làm môi trường phân lập nấm có thành phần như sau (g/l): dịch chiết khoai tây 200; đường glucoza 10; thạch aga 18; độ pH 6,8. Các mẫu thu thập từ các địa phương khác nhau được cấy trên môi trường PDA, sau đó được nuôi ở 30⁰C trong buồng nuôi cấy vô trùng. Chỉ sau 72-96 giờ, các khuẩn lạc nấm được hình thành trên các đĩa thạch được tách và làm sạch. Sau thời gian dài nghiên cứu, các tác giả sáng chế đã xác định được các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học quan tâm, các chủng nấm này được kí hiệu lần lượt là FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36, hình thái khuẩn lạc của các chủng này được thể hiện trên Hình 8.

Bốn chủng nấm FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 được nuôi cấy trong môi trường lỏng riêng từng chủng trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO₄ 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày lên men trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30⁰C thu dịch enzym thô. Xác định hoạt tính một số enzym ngoại bào trong dịch như

laccaza, lipaza, CMCaza, Proteaza, chitinaza, xylanaza, amylaza. Hoạt tính một số enzym ngoại bào dễ dàng được xác định theo các phương pháp xác định hoạt tính đã biết trong lĩnh vực. Trong đó, hoạt tính laccaza được xác định định lượng dựa trên sự oxy hóa ABTS của enzym laccaza tạo thành hợp chất hấp thụ mạnh ở bước sóng 420 nm.

Để xác định định tính hoạt tính enzym lipaza ngoại bào, bốn chủng nấm được nuôi trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO_4 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30°C thu dịch enzym thô, xác định đường kính phân hủy trên đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất trybutirin khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ, kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Để xác định định tính hoạt tính enzym CMCaza ngoại bào, bốn chủng nấm được nuôi trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO_4 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30°C thu dịch enzym thô, xác định đường kính phân hủy trên đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất CMC khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ, kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Để xác định định tính hoạt tính enzym Proteaza ngoại bào, bốn chủng nấm được nuôi trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO_4 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30°C thu dịch enzym thô, xác định đường kính phân hủy trên đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất cazain khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ, kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Để xác định định tính hoạt tính enzym chitinaza ngoại bào, bốn chủng nấm được nuôi trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO_4 0,1 mM, độ pH = 6,5 –

6,8. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30⁰C thu dịch enzym thô, xác định đường kính phân hủy trên đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất chitin khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ, kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Để xác định định tính hoạt tính enzym xylanaza ngoại bào, bốn chủng nấm được nuôi trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO₄ 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30⁰C thu dịch enzym thô, xác định đường kính phân hủy trên đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất xylan khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ, kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Để xác định định tính hoạt tính enzym amylaza ngoại bào, bốn chủng nấm được nuôi trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO₄ 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30⁰C thu dịch enzym thô, xác định đường kính phân hủy trên đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất tinh bột khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ, kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Hoạt tính một số enzym ngoại bào của hỗn hợp dịch enzym được tạo thành từ bốn chủng nấm FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36

Tên chủng	Laccaza (U/l)	CMCaza (mm)	Proteaza (mm)	Chitinaza (mm)	Xylanaza (mm)	Amylaza (mm)	Lipaza (mm)
FBP11	27.013	+	++	+	+	+	++
FBP13	26.996	+	+	+	+	+	++
FDNa20	26.615	+	++	+	+	+	++
FQNa36	17.615	+	+	+	+	+	+

+ đường kính phân giải $d \leq 5mm$,

++ đường kính phân giải $5mm \leq d \leq 10mm$

Để xác định chính xác hơn 4 chủng nấm phân lập được, tiến hành phân loại các chủng nấm trên bằng cách xác định trình tự gen đoạn gen mã hóa vùng ITS (ITS1 – 5,8S – ITS2) và so sánh trình tự thu được với dữ liệu trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank).

ADN tổng số của chủng nấm thu được được tách chiết theo các bước sau:

Thu sinh khối nấm từ đĩa nuôi cấy, nghiền sinh khối nấm trong cối sứ đã khử trùng bằng nitơ thành bột mịn, thu mẫu vào ống eppendorf, bổ sung 600 μ l Lysis buffer, vortex, bổ sung 65 μ l lysozym, ủ 37°C trong 30 – 45 phút, bổ sung 50 μ l proteaza K ủ ở 56°C trong 2 giờ, bổ sung C:I (24:1) với tỷ lệ 1:1 về thể tích, vortex, ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu phần dịch nổi phía trên sang eppendorf mới, bổ sung isopropanol với tỉ lệ 1:1 về thể tích, ủ ở 4°C qua đêm, ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa, bổ sung etanol 100% tỷ lệ 1:1 (v:v), ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa, rửa tiếp bằng etanol 70%, làm khô tủa, hòa trong TE, bảo quản ở 4°C.

Sau khi thu được ADN tổng số, thực hiện khuếch đại đoạn trình tự ITS (ITS1 – 5,8S – ITS2) bằng cặp mồi

ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3'); và

ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') (White et al., 1990)

Thành phần phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μ l)	Nồng độ cuối
Đệm Taq 10X	2,5	1X
dNTPs 2 mM	2,5	0,2 mM
MgSO4 20 mM	2,5	2 mM

Môi 27F 10 μ M	1	0,4 μ M
Môi 1492R 10 μ M	1	0,4 μ M
Taq Polymeraza 5 U/ μ l	0,2	1 U/25 μ l
ADN khuôn	1	
ddH ₂ O	14,3	
Tổng thể tích	25 μ l	

Chu kỳ luân nhiệt của phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Chu kì luân nhiệt của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	94°C/5 phút	1
Biến tính	94°C/1 phút	30
Gắn mồi	55°C/1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C /1 phút 30 giây	
Kéo dài chuỗi	72 °C /7 phút	1
	4 °C	Giữ ổn định

Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1,5%, nhuộm bản gel với EtBr và quan sát dưới ánh sáng của đèn tử ngoại. Sau đó, trình tự gen mã hoá đoạn 16S rARN thu được sau phản ứng PCR được xác định trình tự trên máy xác định trình tự nucleotit tự động ABI3730XL. Trình tự các đoạn gen được xử lý bằng phần mềm FinchTV và so sánh với các chủng được công bố trên GenBank (NCBI database). Phần mềm MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại của các chủng nấm đảm này.

Quan hệ di truyền của 4 chủng nấm trong sáng chế này được thể hiện ở cây phát sinh chủng loài trên Hình 9.

Trình tự ITS1-5,8S rARN-ITS2 của cả 4 chủng với độ dài lần lượt FQNA36 (579 bp), FBP11(578bp), FBP13(575 bp) và FDNa20 (570 bp) trong sáng chế này đã được phân lập từ các địa điểm khác nhau miền Trung, Nam bộ trên gỗ mục. Các trình tự thu được có sự tương đồng 99 % với nhiều đại diện của chi *Earliella* và chi tiết hơn là loài *Earliella scabrosa*, có độ tương đồng thấp (66-98%) so với một vài chủng của *Earliella* và các đại diện khác thuộc họ nấm lỗ Polyporaceae đã phân lập và định danh và được công bố ở phạm vi quốc tế. Sự tương đồng của cả 4 chủng mô tả trong sáng chế này có trình tự tương đồng với các đại diện khác của *Ganoderrma*, nhưng các đặc điểm về hình thái và sinh tổng hợp enzym thì hoàn toàn không trùng. So với chủng FPT31 tuy cả 4 chủng có độ tương đồng của ITS1-5,8S rARN-ITS2 99%, tuy nhiên thể hiện sự khác nhau về đặc tính sinh hóa, các enzym và các chất tạo ra hướng cho sản xuất thực phẩm năng và thuốc chữa bệnh.

Cả 4 chủng đều có quan hệ gần gũi nhất với các chủng đã được phân lập tại Venezuela bao gồm các chủng *Earliella scabrosa* CR45m, *Earliella scabrosa* CR95 và *Earliella scabrosa* Criel; hai chủng từ rừng nước Pháp là *Earliella scabrosa* BRFM 1105, *Earliella scabrosa* BRFM 1106; từ vườn quốc gia Hồng Kông là *Earliella scabrosa* 489-YTM6; từ gỗ mục của Sri Lanka là *Earliella scabrosa* voucher UOC-DAMIA D37 và *Earliella scabrosa* voucher UOC-DAMIA D13b. Bốn chủng FQNA36, FBP11, FBP13 và FDNa20 có quan hệ xa hơn với *Earliella scabrosa* 216-TWTDW2 cũng được phân lập từ vườn quốc gia Hồng Kông. Bốn chủng trong sáng chế này cũng có mối quan hệ xa hơn với *Ganoderrma* sp. NIOCC 15V và *Earliella* BAB-4646 của Ấn Độ đã được phân lập được từ cây và *Earliella* sp GFM là nấm nội cộng sinh với củ riềng gió *Zingiber officinale* cũng từ Ấn Độ. Sự tương đồng của cả 4 chủng mô tả trong sáng chế này có trình tự tương đồng với các đại diện khác của chi *Ganoderrma*, nhưng các đặc điểm về hình thái và sinh tổng hợp enzym thì hoàn toàn không trùng.

Chi *Earliella* thuộc họ nấm lỗ *Polyporaceae*. Bốn chủng thuộc sáng chế này có quan hệ xa hơn với một số đại diện của *Ganoderma* thuộc họ *Ganodermataceae* và các chi *Coriolopsis* và *Trametes* bao gồm cả *Earliella* đều thuộc họ nấm lỗ *Polyporaceae*.

Các mã số trình tự ITS1-5,8S rARN-ITS2 của 4 chủng *Earliella scabrosa* đăng ký trên Genbank lần lượt như sau: FBP11: MF521432.1; FBP13: MF521433.1; FQNa20: MF521434.1 và FQNa36: MF073283.1

So với những thông tin từ các nghiên cứu của các quốc gia khác thì 4 chủng mô tả trong sáng chế này đều sinh tổng hợp laccaza và 6 enzym ngoại bào khác với hoạt tính khác nhau trên cùng một môi trường nuôi cấy. Khả năng phân hủy màng polyme ở mức độ khác nhau phụ thuộc vào bản chất hóa học của loại polyme được sử dụng trong sáng chế này. Cho đến nay chưa có thông tin về sử dụng *Earliella scabrosa* hay sản phẩm nuôi cấy để xử lý phân hủy polyme.

Bào tử của các chủng nấm này được bảo quản và lưu giữ trong 50% glyxerol ở -80°C hoặc trong dầu khoáng ở nhiệt độ $25 - 30^{\circ}\text{C}$ tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và plastic phân hủy sinh học theo sáng chế chứa bào tử của 4 chủng nấm đảm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) theo tỷ lệ FBP11:FBP13:FQNa36:FDNa20 là 1:1:1:1.

Để đánh giá khả năng sinh tổng hợp hệ enzym laccaza của bốn chủng nấm trong chế phẩm theo sáng chế, các tác giả thực hiện việc đánh giá khả năng loại màu các loại thuốc nhuộm hoạt tính thuộc nhóm azo hay anthraquinon rất cần thiết cho việc tìm kiếm khả năng oxy hóa của các enzym hướng đích cho ứng dụng để phân

hủy, phá cấu trúc các hợp chất là chuỗi polyme, vòng thơm chứa halogen hay không chứa halogen, v.v..

Bốn chủng nấm FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 được nuôi cấy lỏng riêng từng chủng trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO₄ 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30⁰C thu dịch enzym thô để xử lý loại màu thuốc nhuộm theo sáng chế.

Hai màu thuộc nhóm màu azo (NY7) và anthraquinon (RBBR) được sử dụng để đánh giá khả năng loại màu bằng laccaza thô của 4 chủng *Earliella scabrosa* FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 khi có hoặc không có chất gắn kết Violuric acid (VIO). Tổng thể tích phản ứng loại màu là 5 ml gồm: đệm natri axetat 100mM, ở pH 6, thuốc nhuộm (nồng độ 100 mg/l), dịch enzym thô (nồng độ cuối 1000 U/l) và chất gắn kết (CGK) với nồng độ cuối 200 µM. Nồng độ gốc của các thuốc nhuộm là 3g/l và nồng độ trong phản ứng loại màu là 100 ppm. Mẫu đối chứng có màu và đệm natri axetat có độ pH 4. Thành phần và thể tích phản ứng enzym được trình bày ở Bảng 4.

Hiệu quả loại màu thuốc nhuộm được đánh giá trong 24 giờ. Dịch phản ứng chứa lần lượt các màu được đo tại các bước sóng phù hợp. Khả năng loại màu được xác định bằng phần trăm hấp phụ của chất khử bằng công thức:

$$D = \frac{100 (A_i - A_t)}{A_i}$$

Trong đó D: phần trăm loại màu thuốc nhuộm (%)

A_i: Độ hấp thụ ban đầu

A_t: Độ hấp thụ tại thời gian t

Phương pháp này được áp dụng như nhau đối với hai màu được trình bày trong ví dụ này.

Bảng 4: Thành phần các chất tham gia loại màu thuốc nhuộm nhóm

Azo và Anthraquinon

Thành Phần Chủng nấm	Đệm axetat (ml)	Enzym (ml)	CGK (VIO) (ml)	Màu (ml)
FBP11	4,633	0,2	0	0,167
	4,433	0,2	0,2	0,167
FBP13	4,463	0,17	0	0,167
	4,263	0,17	0,2	0,167
FDNa20	4,503	0,33	0	0,167
	4,503	0,33	0,2	0,167
FQNa36	3,833	1	0	0,167
	3,833	1	0,2	0,167

Sau 24 giờ, hiệu suất loại màu bằng laccaza thô của 4 chủng *Earliella scabrosa* FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 đối với màu azo (NY7) khi có chất gắn kết lần lượt là 86, 86, 87 và 76 %. Đối với màu anthraquinon (RBBR) khả năng loại màu bằng laccaza thô của 4 chủng *Earliella scabrosa* FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 có hiệu suất lần lượt là 83, 97, 83 và 97%. Khả năng loại màu bởi laccaza thô của 4 chủng *Earliella scabrosa* FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 đều cần có sự có mặt của các chất gắn kết. Hiệu suất loại màu của 4 chủng *Earliella scabrosa* FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 được biểu diễn dưới dạng đồ thị ở Hình 1 và 2. Hiệu suất cụ thể được trình bày trong bảng 5. Khả năng loại 2 màu tổng hợp thuộc 2 nhóm thuốc nhuộm hoạt tính của laccaza của từng chủng cao nhưng không giống nhau mặc dù thí nghiệm ở cùng một điều kiện. Đặc điểm chung của laccaza từ 4 chủng nấm đảm này là cần có CGK để tăng hiệu suất loại màu đối với màu NY7 thuộc nhóm azo. Còn đối với RBBR thuộc nhóm anthraquinon, laccaza từ cả 4 chủng tạo ra không cần CGK.

Bảng 5: Khả năng loại màu của 4 chủng *Earliella sp.* FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 theo thời gian

Chủng nấm	TN ₀ TG (giờ)	NY7		RBBR	
		Không Vio (%)	Có Vio (%)	Không Vio (%)	Có Vio (%)
FBP11	5 phút	1	2,4	0	10
	½	1	48	70	82
	1	3	71	80	83
	2	4	79	88	83
	3	7	85	88	83
	24	13	86	88	83

FBP13	5 phút	1	1	0	0
	½	2,3	20	42	44
	1	4	51	56	56
	2	5	81	62	74
	3	5	86	71	84
	24	14	86	91	97
FDNa20	5 phút	3	6	16	0
	½	3	65	83	80
	1	5	74	82	82
	2	8	78	82	82
	3	13	85	82	82
	24	17	87	83	83
FQNa36	5 phút	2	5	2	1
	½	2	60	62	81
	1	3	65	73	82
	2	4	71	75	88
	3	4	72	76	90
	24	13	76	77	97

Chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học theo sáng chế chứa bào tử của 4 chủng nấm đảm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) với mật độ bào tử của

mỗi chủng nằm trong khoảng $10^7 - 10^8$ CFU/g chế phẩm, và chất mang nuôi cấy rắn và có độ ẩm là 15 – 19%.

Chế phẩm này được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy rắn 4 chủng nấm nêu trên để các chủng tạo lượng đủ bào tử, và sau đó môi trường lên men rắn sẽ được sấy khô để thu chế phẩm dạng rắn theo sáng chế.

Theo một phương án khác, chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và nhựa (plastic) phân hủy sinh học có nguồn gốc từ sinh khối theo sáng chế chứa dịch enzym thu được từ môi trường nuôi cấy 4 chủng nấm đằm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) với tỷ lệ FBP11:FBP13:FQNa36:FDNa20 là 1:1:1:1, trong đó mật độ vi sinh vật trong giống dạng lỏng của mỗi chủng nấm đạt khoảng $10^7 - 10^8$ MPN/ml chế phẩm với hoạt tính laccaza cao hơn 10.000 U/L chế phẩm.

Chế phẩm dạng lỏng này được điều chế bằng phương pháp nuôi cấy lỏng riêng từng chủng trong số 4 chủng nấm nêu trên, sau đó canh trường thu được chứa enzym thô của mỗi chủng được trộn lẫn theo tỷ lệ 1:1:1:1, tạo thành chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế.

Các chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học theo sáng chế có khả năng phân hủy các loại màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và không có nguồn gốc dầu mỏ như chất dẻo, túi nilon, màng bọc thực phẩm v.v. nêu trên ở các mức độ khác nhau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học (dạng rắn).

Chủng giống của 4 chủng nấm FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 được nuôi cấy trên môi trường rắn để thu chế phẩm theo sáng chế. Môi trường nuôi cấy rắn bao gồm rơm nghiền, thân và lõi ngô nghiền tới kích thước khoảng 0,3-0,4 cm và cám gạo với theo tỷ lệ rơm nghiền:thân và lõi ngô nghiền:cám gạo là 1:2:7. Chủng giống của 4 chủng nấm FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 theo tỷ lệ 1:1:1:1 được bổ sung vào môi trường nuôi cấy rắn thu được trên đây, bổ sung nguồn dinh dưỡng nitơ là muối nitrat 1%, đến độ ẩm 55 – 65 % và tiến hành lên men ở 30⁰C trong thời gian 12-15 ngày. Đây là thời gian thích hợp để chủng giống sinh trưởng, phát triển và tạo bào tử. Sau 12-15 ngày, khi bào tử đã được tạo thành, môi trường lên men rắn sẽ được sấy ở 30⁰C cho đến khi độ ẩm đạt từ 15-19%, thu được chế phẩm chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học theo sáng chế ở dạng rắn, trong đó mật độ vi sinh vật của mỗi chủng đạt khoảng 10⁷ -10⁸ MPN/g chế phẩm.

Ví dụ 2: Điều chế chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học dạng lỏng.

Bốn chủng nấm FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 được nuôi trên môi trường lỏng riêng từng chủng trên môi trường TSH1 có thành phần gồm: Dịch chiết khoai tây 200 g/l, Glucoza 10 g/l, Bột đậu tương 5 g/l, Cám gạo 1 g/l, CuSO₄ 0,1 mM, độ pH = 6,5 – 6,8. Sau 7 ngày lên men trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở 30⁰C thu dịch enzym thô, trộn dịch enzym thô của bốn chủng FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 theo tỷ lệ 1:1:1:1 tạo thành chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế.

Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng phân hủy màng polyme nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học (túi).

Các loại túi nilon phân hủy sinh học nguồn gốc khác nhau được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy bằng chế phẩm theo sáng chế. Trong đó, một loại túi nilon có nguồn gốc từ Hà Lan (được chứng nhận có khả năng phân hủy sinh học của châu Âu), một loại túi nilon do Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ

Việt Nam nghiên cứu chế tạo (VHL), một loại túi nilon được bán thương mại trong siêu thị ở Hà Nội được khuyến cáo thân thiện môi trường (VN1).

Các loại mẫu túi nilon có nguồn gốc khác nhau được cắt thành miếng có kích thước 2x10 cm, cho 1 g nilon mỗi loại riêng rẽ vào bình thủy tinh 250 ml chứa 150 ml chế phẩm theo sáng chế gồm dịch enzym thô của bốn chủng nấm *Earliella* sp. FBP11, FBP13, FDNa20 và FQNa36 theo tỷ lệ 1:1:1:1, thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25 – 30°C. Xác định độ giảm hoạt tính enzym ngoại bào trong chế phẩm theo thời gian (Kết quả chi tiết được thể hiện trong Bảng 7 và trên Hình 3 và 4).

Bảng 7: Hoạt tính enzym ngoại bào theo thời gian xử lý

Enzym	Laccaza (U/l)	CMCaza (mm)	Proteaza (mm)	Chitinaza (mm)	Xylanaza (mm)	Amylaza (mm)	Lipaza (mm)
Thời gian							
Ban đầu	24.500	++	++	+	+	+	++
7 ngày	6.700	+	+	+	+	+	+
14 ngày	4.000	+	+	+	+	+	+
21 ngày	1.620	+	+	+	+	+	+
30 ngày	985	+	+	+	+	+	+

+ đường kính phân giải $d \leq 5\text{mm}$,

++ đường kính phân giải $5\text{mm} \leq d \leq 10\text{mm}$

Sau 30 ngày xử lý, túi nilon được xác định mức độ phân hủy bằng các thiết bị chuyên dụng với các chỉ tiêu bắt buộc trong đánh giá khả năng phân hủy nilon như: độ giảm khối lượng, độ bền kéo đứt, sự thay đổi màu, sự thay đổi cấu trúc hóa học (xác định bằng máy ghi phổ hồng ngoại biến đổi Fourier), sự thay đổi hình thái cấu trúc bề

mặt của mẫu màng nylon được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét. Các phương pháp, thiết bị đo nêu trên và các kết quả được thể hiện như sau.

a) Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của các mẫu túi nylon được ghi trên máy phổ hồng ngoại biến đổi Fourier Nexus, thực hiện như sau: mẫu ở dạng màng mỏng hoặc màng vụn (màng vụn sẽ được ép thành viên với KBr) và quét phổ ở vùng 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} , độ phân giải 8 cm^{-1} , số lần quét 32 lần. Phổ FTIR được ghi dưới dạng đường cong phụ thuộc phần trăm truyền qua vào số sóng ($1/\lambda$) hay bước sóng của bức xạ, sau khi đã bù trừ phổ nền của không khí (hoặc KBr).

Chỉ số cacbonyl (CI) được sử dụng để đánh giá sự thay đổi hàm lượng nhóm cacbonyl hình thành do sự phân hủy oxy hóa quang màng polyme. Giá trị CI được tính theo công thức sau.

$$CI = \frac{I_{C=O}}{I_{CH_3}}$$

Trong đó, $I_{C=O}$ là cường độ dao động hóa trị của nhóm cacbonyl; I_{CH_3} là cường độ dao động biến dạng đối xứng của nhóm metyl.

b) Các tính chất cơ học

Các tính chất cơ học (độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt) của mẫu nylon được đo trên máy kéo dãn Zwick Z2.5 theo tiêu chuẩn ASTM D638, tốc độ kéo mẫu 50 mm/phút ở nhiệt độ phòng, mỗi loại mẫu được đo 3 lần để lấy giá trị trung bình. Mẫu sau khi cắt được xác định bề dày (d) bằng thước đo chuyên dụng và được đánh dấu khoảng cách l_0 (khoảng cách ban đầu). Sau đó, mẫu được kẹp lên máy kéo dãn để xác định được các đại lượng: độ bền kéo (MPa) và độ giãn dài khi đứt (%).

- *Độ bền kéo đứt*

Khi tác dụng một lực kéo F lên mẫu ở một thời điểm bất kỳ thì tạo ra một ứng suất tức thời ứng với lực F tại thời điểm đó.

Ứng suất ứng với lực F tại thời điểm mẫu bị đứt gọi là ứng suất khi đứt (σ_k), được xác định bằng công thức sau:

$$\sigma_k = \frac{F}{S}$$

Trong đó: F : lực kéo tác dụng lên mẫu (N).

S : tiết diện ngang ban đầu của mẫu (m^2).

- *Độ dẫn dài khi đứt*

Độ dẫn dài khi đứt của mẫu được xác định theo công thức sau:

$$\varepsilon = \frac{l_B - l_0}{l_0} \cdot 100\%$$

Trong đó: ε - % dẫn dài của mẫu.

l_0 - chiều dài của mẫu trước khi kéo (cm).

l_B - chiều dài của mẫu tại thời điểm mẫu đứt (cm).

- c) *Sự thay đổi màu sắc*

Xác định sự thay đổi màu sắc của mẫu màng polyme bằng số liệu hiển thị trên máy so màu. Bề mặt và màu sắc mẫu được xác định theo tiêu chuẩn ASTM D2244-89 trên máy ColorTec PCM (PSMTM, Mỹ) với L^* đo độ sáng và a^* , b^* là tọa độ màu. Trong đó: $+a^*$: là màu đỏ; $-a^*$: là màu xanh lá; $+b^*$: là màu vàng; $-b^*$: màu xanh dương; L^* thay đổi từ 100 (màu trắng) đến 0 (màu đen).

Giá trị ΔE_n dùng để tính toán sự thay đổi màu sắc bề mặt mẫu. Nó là một hàm theo thời gian chiếu tia cực tím với công thức:

$$\Delta E_n = \sqrt{(L^* - L_n)^2 + (a^* - a_n)^2 + (b^* - b_n)^2}$$

L^* , a^* , b^* là các giá trị màu tại thời điểm ban đầu.

L_n , a_n , b_n là các giá trị màu tại thời điểm n .

Nếu giá trị ΔE_n nhỏ, tương ứng với ít thay đổi màu sắc của vật liệu. Nếu giá trị ΔE_n lớn thể hiện sự thay đổi màu sắc lớn, vật liệu chịu ảnh hưởng lớn của các tác nhân tác động.

d) Phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM)

Hình thái cấu trúc của các mẫu được quan sát và ghi ảnh chụp trên thiết bị hiển vi điện tử quét (SEM) (JSM-6510 LV, Jeol, Japan). Mẫu được phủ một lớp platin mỏng để dẫn điện và chụp trong môi trường khí nitơ.

Độ giảm khối lượng của các mẫu sau 30 ngày xử lý được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây.

Bảng 8: Độ giảm khối lượng của các loại nilon sau 30 ngày xử lý

Tên mẫu	HL	VHL	VN1
Độ giảm khối lượng (%)	33 – 34,09	1,13 – 1,60	0,00

Kết quả xác định độ bền kéo đứt, độ giãn dài khi đứt, so màu và chỉ số CI của các mẫu sau 30 ngày xử lý được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9: Khả năng phân hủy túi nilon sau 30 ngày xử lý

Tên mẫu Chi tiêu	Nilon ban đầu			Nilon sau 30 ngày xử lý		
	HL	VHL	VN1	HL	VHL	VN1
Độ bền kéo đứt (MPa)	8,39	24,25	15,41	kxddd	kxddd	kxddd
Độ giãn dài	0	0	0	kxddd	kxddd	kxddd

khi đứt (%)						
So màu (ΔE)	0	0	0	7,21	8,14	1,56
CI	5,51	0,01	0,01	5,52	0,00	0,04

Kxđđ: không xác định được do mẫu bị nát vụn hoặc đứt gãy không thể xác định bằng máy đo chuyên dụng được

Sự thay đổi cấu trúc hóa học của các mẫu túi nylon có nguồn gốc từ dầu mỏ sau khi xử lý bằng chế phẩm sinh học theo sáng chế này được thể hiện trên Hình 5, 6 và 7.

Quan sát phổ FTIR của mẫu túi nylon siêu thị (VN1) trên Hình 5A, có thể thấy pic ở số sóng $3642,86\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm OH tự do. Pic ở $2926,15\text{ cm}^{-1}$ và $2851,28\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm CH no (CH, CH₂, CH₃). Pic đặc trưng cho dao động biến dạng và dao động ngoài mặt phẳng của nhóm CH no xuất hiện lần lượt ở $1464,84\text{ cm}^{-1}$ và $728,14\text{ cm}^{-1}$. Như vậy, dựa vào phổ FTIR có thể dự đoán thành phần chính của mẫu túi nylon VN1 là các polyme có cấu tạo mạch hydrocacbon như polyetylen, polypropylen v.v. Một số pic còn lại khó xác định đặc trưng cho các nhóm chức nào của mẫu nylon vì có thể là các pic đặc trưng của các chất phụ gia hỗ trợ phân hủy đưa vào mẫu nylon trong quá trình chế tạo. Phổ FTIR của mẫu màng nylon VN1 sau 30 ngày xử lý bằng chế phẩm sinh học theo sáng chế được thể hiện trên Hình 5B. Có thể thấy một số pic như pic đặc trưng cho phụ gia ở $2657,99$; $2512,08$; $1796,07\text{ cm}^{-1}$, pic đặc trưng cho dao động hóa trị đối xứng và dao động biến dạng của nhóm CH no ở $2851,28$ và $1464,26\text{ cm}^{-1}$ hầu như không thay đổi cả số sóng và cường độ. Tuy nhiên, vị trí một số pic đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm OH tự do, dao động hóa trị bất đối xứng và dao động ngoài mặt phẳng của nhóm CH no dịch chuyển từ $5-10\text{ cm}^{-1}$. Sự dịch chuyển một số pic trên cho thấy các laccasa đã tác động vào cấu trúc của các đại phân tử polyme, chất dẻo trong mẫu túi nylon VN1, đặc biệt là sự tác động tới

các nhóm OH tự do và các nhóm CH no làm dịch chuyển vị trí các pic tương ứng của chúng trong mẫu nylon trước khi xử lý.

Quan sát phổ FTIR của mẫu màng túi nylon Hà Lan ban đầu trên Hình 6A, có thể thấy mẫu túi nylon của Hà Lan có cấu trúc pic rộng, từ ở $3367,50\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động hóa trị của nhóm OH liên kết hydro hoặc nhóm CONH hoặc NH hoặc $\text{C}\equiv\text{C-H}$ trong phân tử chất dẻo. Pic ở $2955,56\text{ cm}^{-1}$, $1389,45\text{-}1455,11\text{ cm}^{-1}$ và $730,29\text{ cm}^{-1}$ lần lượt đặc trưng cho dao động hóa trị, dao động biến dạng và dao động ngoài mặt phẳng của nhóm CH no trong các đại phân tử polyme, chất dẻo. Dao động hóa trị của nhóm C=O trong axit hoặc xeton trong chất dẻo được tìm thấy ở $1716,96\text{ cm}^{-1}$. Pic đặc trưng cho dao động hóa trị bất đối xứng và đối xứng của các nhóm C-O trong chất dẻo xuất hiện trong khoảng $1026,12\text{ cm}^{-1}$ đến $1273,04\text{ cm}^{-1}$. Pic ở $1577,96\text{ cm}^{-1}$ có thể đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm NH trong các đại phân tử polyme, chất dẻo. Một số pic còn lại có thể đặc trưng cho các chất phụ gia hỗ trợ phân hủy đưa vào mẫu nylon trong quá trình chế tạo. Sau 30 ngày xử lý mẫu nylon, hiệu quả xử lý thể hiện rõ ràng thông qua sự thay đổi vị trí và cường độ một số nhóm chức trong các đại phân tử polyme, chất dẻo (Hình 6B) như sau: pic đặc trưng cho nhóm OH liên kết hydro hoặc nhóm CONH hoặc NH hoặc $\text{C}\equiv\text{C-H}$ trong các đại phân tử polyme, chất dẻo thay đổi từ $3367,50\text{ cm}^{-1}$ lên $3420,85\text{ cm}^{-1}$ và cường độ pic giảm $\frac{3}{4}$ so với ban đầu. Bên cạnh đó, cường độ pic đặc trưng cho dao động hóa trị đối xứng của nhóm C-O ở $1026,79\text{ cm}^{-1}$ cũng giảm đáng kể, tới 80% so với pic ban đầu. Một số pic đặc trưng cho cấu trúc hóa học của phụ gia ở $579,43$ và $527,59\text{ cm}^{-1}$ biến mất hoàn toàn sau quá trình xử lý. Kết quả này chứng tỏ các laccasa đã tác động vào cấu trúc của mẫu túi nylon trên trong quá trình xử lý. Chúng tác động vào các nhóm OH liên kết hydro hoặc nhóm CONH hoặc NH hoặc $\text{C}\equiv\text{C-H}$ và nhóm C-O trong các đại phân tử polyme, chất dẻo làm thay đổi cường độ và vị trí của chúng. Các chất phụ gia hỗ trợ phân hủy thêm vào có thể đã bị hòa tan và thoát ra khỏi mẫu màng túi nylon trong quá trình xử lý.

Phổ FTIR của mẫu màng túi nilon có xuất xứ từ Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VHL) được thể hiện trên hình 7A. Có thể thấy pic ở $3600,68\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm OH tự do. Pic ở $2928,67\text{ cm}^{-1}$ và $2851,40\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm CH no. Pic đặc trưng cho dao động biến dạng và dao động ngoài mặt phẳng của nhóm CH no xuất hiện lần lượt ở $1466,54\text{ cm}^{-1}$ và $727,95\text{ cm}^{-1}$. Như vậy, dựa vào phổ FTIR có thể dự đoán thành phần chính trong mẫu túi nilon VHL tương tự như chất dẻo trong mẫu túi nilon VN1, đều là các polyme có cấu tạo mạch hydrocacbon như polyetylen, polypropylen v.v. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa mẫu túi VHL và VN1 trên phổ FTIR ở chỗ mẫu túi nilon của VHL có các pic đặc trưng cho các chất phụ gia hỗ trợ phân hủy đưa vào mẫu túi trong quá trình chế tạo nhiều hơn so với mẫu túi nilon VN1. Hình 7B là phổ FTIR của mẫu màng túi nilon VHL sau 30 ngày xử lý bằng chế phẩm theo sáng chế. So sánh với kết quả phân tích phổ FTIR của mẫu túi nilon VHL ban đầu trên hình 7A, có thể thấy các pic đặc trưng cho dao động hóa trị và dao động biến dạng của nhóm OH tự do và nhóm CH no hầu như không thay đổi. Tuy nhiên, có thể quan sát thấy trên phổ IR của mẫu túi VHL sau xử lý xuất hiện 1 pic mới ở số sóng $1626,98\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị của các liên kết C=C liên hợp hoặc không liên hợp với nhân thơm hoặc vòng lactam ≥ 6 cạnh trong chất dẻo. Minh chứng này cho thấy chất dẻo đã bị laccaza tác động và phân hủy tạo thành các nhóm như lacton hay alken v.v. Đồng thời, từ kết quả phân tích phổ IR cũng thấy sự dịch chuyển số sóng của các pic đặc trưng cho các chất phụ gia hỗ trợ phân hủy từ $4-22\text{ cm}^{-1}$ gây ra bởi sự phân hủy một phần các chất phụ gia đưa vào mẫu nilon trong quá trình chế tạo. Như vậy, mặc dù cấu trúc polyme, chất dẻo của mẫu túi nilon VHL và VN1 tương tự nhau nhưng nhờ có phụ gia đưa vào, mạch hydrocacbon của polyme, chất dẻo VHL bị laccaza tấn công mạnh hơn và dễ phân hủy thành các alken hoặc lacton.

So sánh các kết quả trên, có thể thấy laccaza đã tấn công vào các nhóm OH liên kết hydro hoặc nhóm CONH hoặc NH hoặc C≡C-H hoặc CH trong phân tử polyme và plastic dưới tác dụng của các chất phụ gia hỗ trợ phân hủy đưa vào.

Chỉ số cacbonyl (CI) của các mẫu màng túi nylon sau xử lý được tính theo công thức (1) và trình bày trong Bảng 9. Có thể thấy chỉ số CI của các mẫu trước và sau xử lý thay đổi không đáng kể. Minh chứng thu được này có thể do nhóm C=O chưa bị tác động bởi laccaza trong quá trình xử lý. Kết quả này phù hợp với kết quả phổ FTIR trình bày ở trên.

Sau 30 ngày xử lý bằng chế phẩm theo sáng chế, các mẫu nylon được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM), cấu trúc của các mẫu nylon đều thay đổi so với ban đầu, trong đó cấu trúc mẫu HL và VHL thay đổi nhiều nhất, còn mẫu VN1 thay đổi ít nhất. Rõ ràng là các laccaza đã tác động mạnh đến cấu trúc chất dẻo của mẫu HL làm cho hình thái của nó thay đổi hoàn toàn với sự đứt gãy các mạch polyme và xuất hiện nhiều vết nứt dài trong cấu trúc chất dẻo với đường kính khoảng 1 μm (hình 8 A và B). Trong khi đó, trên bề mặt mẫu VHL sau 30 ngày xử lý xuất hiện các vết nứt ngắn hơn với đường kính cũng khoảng 1 μm (hình 8 C và D). Mẫu VN1 sau 30 ngày xử lý không xuất hiện vết nứt, tuy nhiên có thể quan sát thấy sự xuất hiện của nhiều vi lỗ với kích thước khoảng 1-2 μm trong cấu trúc của chúng (hình 8 E và G). Sự xuất hiện các vết nứt và các vi lỗ là bằng chứng chứng tỏ các mẫu nylon polyme, chất dẻo đã bị phân hủy bởi laccaza. Chính những khuyết tật này là các điểm tập trung ứng suất lực khi kéo và làm cho mẫu dễ bị kéo đứt hơn. Tính chất này lý giải cho sự khó xác định được tính chất cơ học của vật liệu như đề cập ở trên.

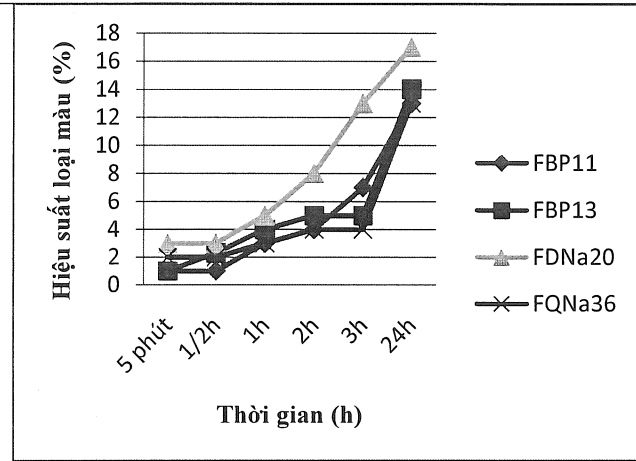
Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đưa ra được chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme và plastic có nguồn gốc từ dầu mỏ và sinh khối đã được cấp chứng chỉ phân hủy sinh học của châu Âu từ các chủng nấm đảm từ gỗ mục của các loại cây khác nhau thuộc các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam sinh tổng hợp được laccasa cao trên môi trường đơn giản và các enzym ngoại bào khác để tạo chế phẩm xử lý rác chất dẻo. Bốn chủng nấm đảm thuần khiết về mặt sinh học được định danh thuộc chi *Earliella* và có tên là *Earliella scabrosa* FBP11, *Earliella scabrosa* FBP13, *Earliella scabrosa* FQNa36, *Earliella scabrosa* FDNa20. Khả năng phân hủy những loại polyme và plastic khó phân hủy (túi nilon là rác) và chất dẻo có khả năng phân hủy sinh học được tạo nên từ polyetylen đã được cải biến khi bổ sung chất xúc tiến oxy hóa (exo-biodegradable plastic). Đây là chế phẩm để cung cấp cho các quy trình công nghệ phân hủy, chuyển hóa rác thải là polyme và plastic an toàn và đi theo con đường hoàn toàn sinh học. Quan trọng hơn cả là cung cấp cho khâu tiền xử lý, sau đó xử lý phân hủy vi sinh túi nilon có nhiệt độ cao do các nhóm vi khuẩn, xạ khuẩn ưa nhiệt thực hiện. Hiệu quả rõ nhất là không những không gây hiệu ứng nhà kính do đốt hay chôn lấp làm lãng phí quỹ đất và giảm nghiêm trọng chất lượng cuộc sống như hiện nay. Hiệu quả của sáng chế là mang lại một cách tiếp cận mà có thể khai thác hiệu quả nguồn nguyên liệu di truyền bản địa và là nền tảng nhằm tạo thêm các chuỗi công nghệ mới để xử lý rác thải chất dẻo với chi phí thấp và góp phần giảm thiểu ảnh hưởng của rác chất dẻo lên môi trường đất, nước và đời sống của động thực vật hoang dã.

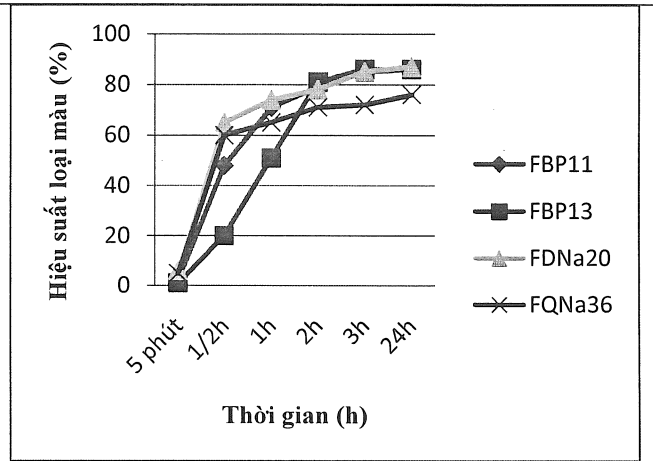
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học chứa bào tử của 4 chủng nấm đảm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) với mã số đăng ký trên GenBank lần lượt là FBP11: MF521432.1; FBP13: MF521433.1; FQNa20: MF521434.1 và FQNa36: MF073283.1 có mật độ bào tử của mỗi chủng nằm trong khoảng 10^7 - 10^8 CFU/g chế phẩm, và chất mang lên men rắn, và có độ ẩm là 15 – 19%.

2. Chế phẩm sinh học phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và chất dẻo phân hủy sinh học chứa dịch enzym thu được từ môi trường nuôi cấy 4 chủng nấm đảm *Earliella scabrosa* FBP11 (FBP11), *Earliella scabrosa* FBP13 (FBP13), *Earliella scabrosa* FQNa36 (FQNa36) và *Earliella scabrosa* FDNa20 (FDNa20) với tỷ lệ FBP11:FBP13:FQNa36:FDNa20 là 1:1:1:1, trong đó mật độ vi sinh vật trong giống dạng lỏng của mỗi chủng nấm đạt khoảng 10^7 - 10^8 MPN/ml chế phẩm với hoạt tính laccasa cao hơn 10.000 U/L chế phẩm.

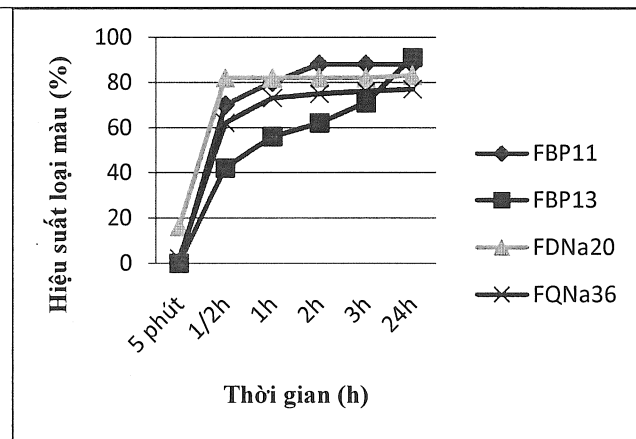


(A)

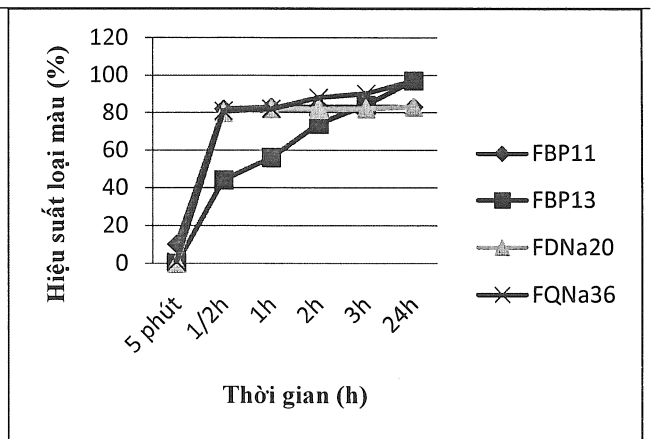


(B)

Hình 1

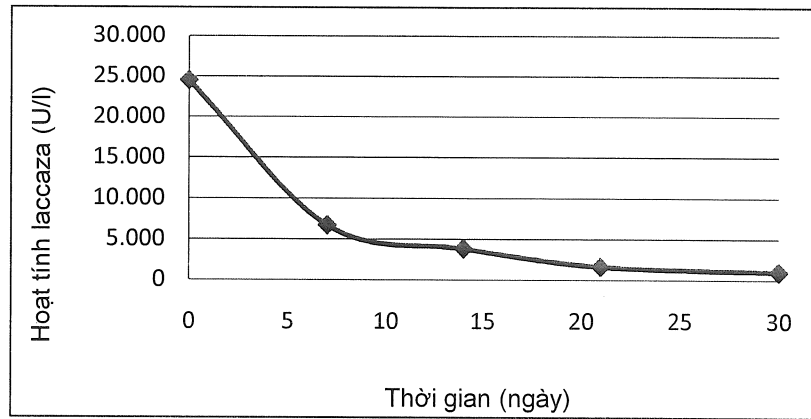


(C)

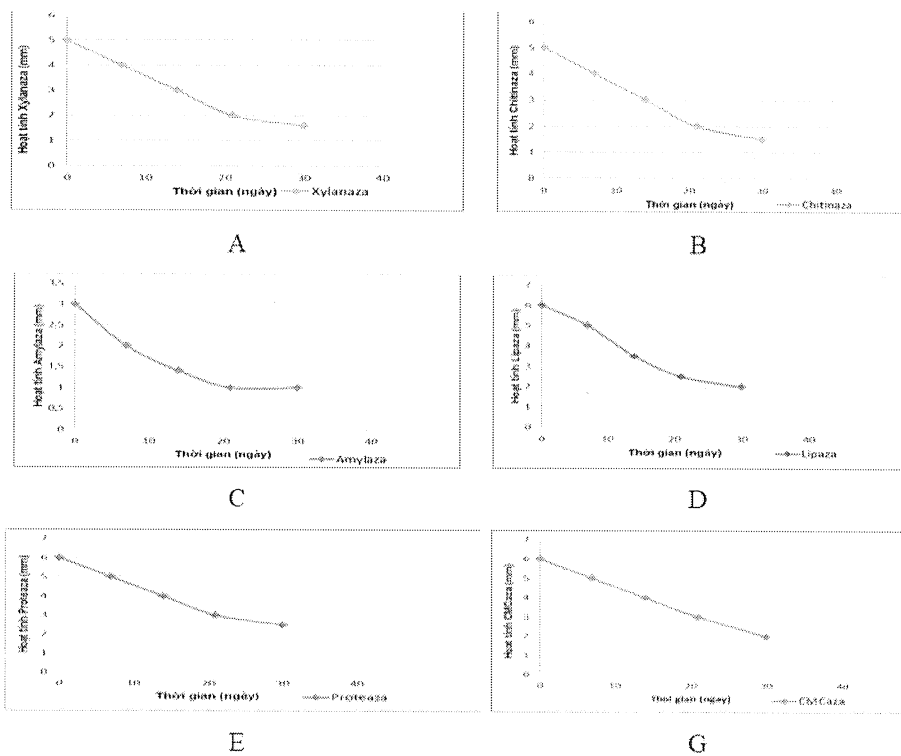


(D)

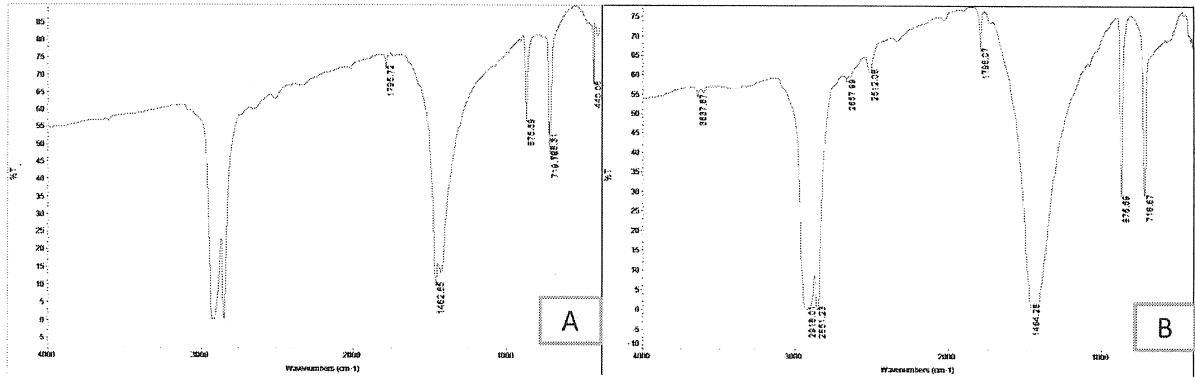
Hình 2



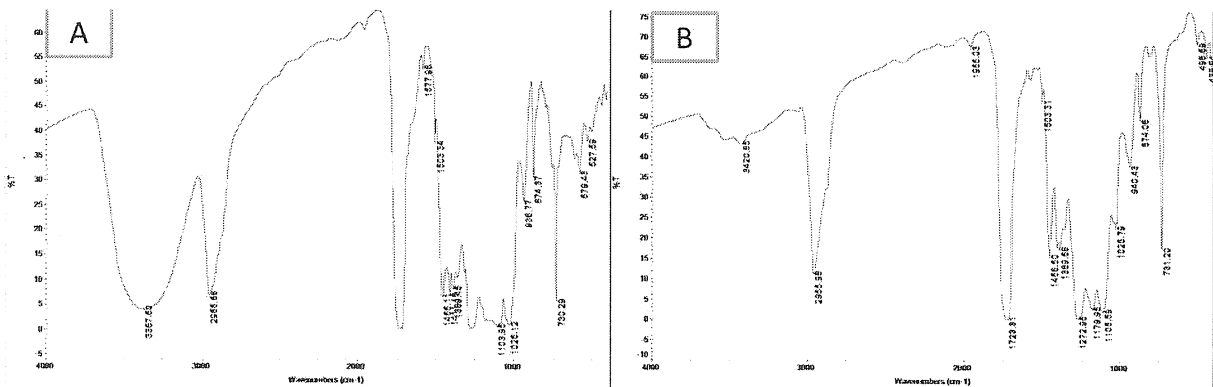
Hình 3



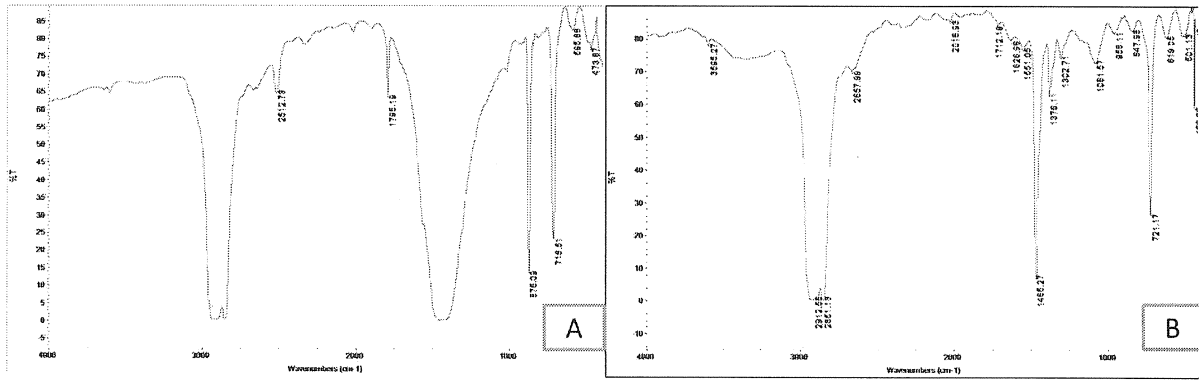
Hình 4



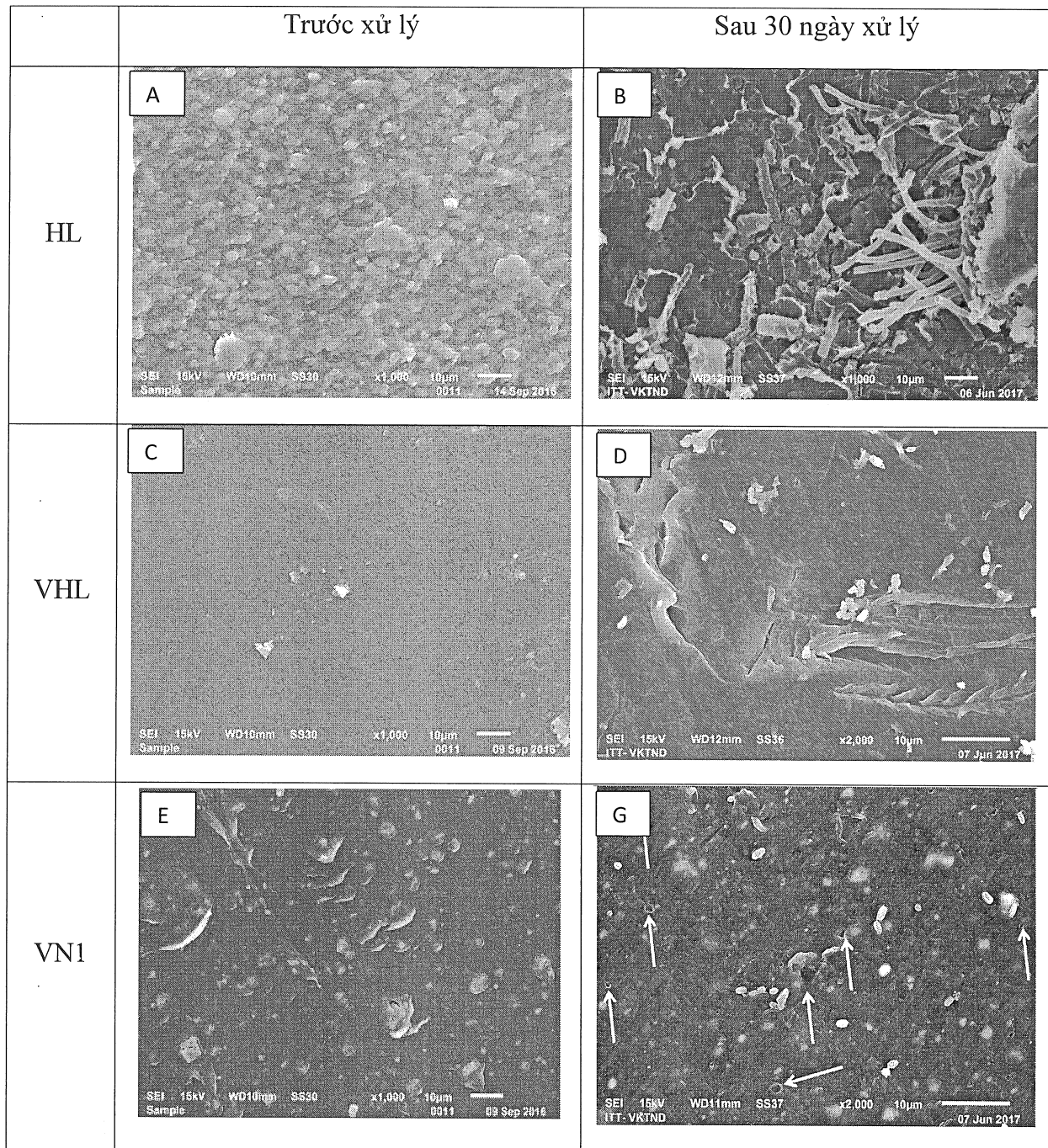
Hình 5



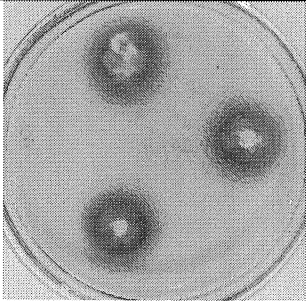
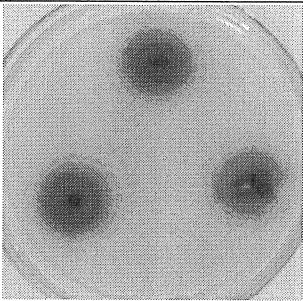
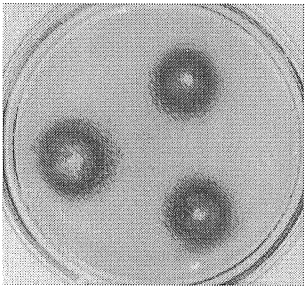
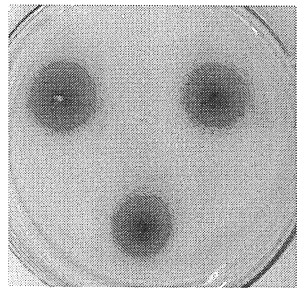
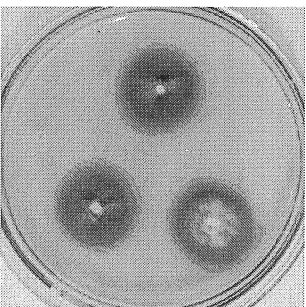
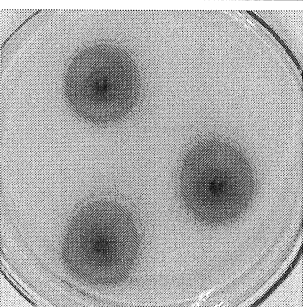
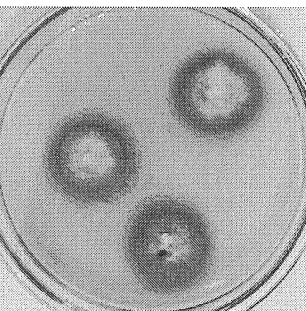
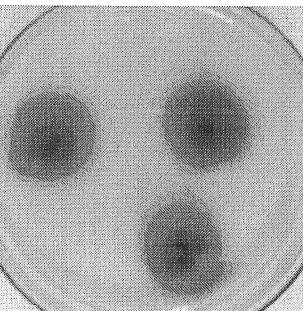
Hình 6



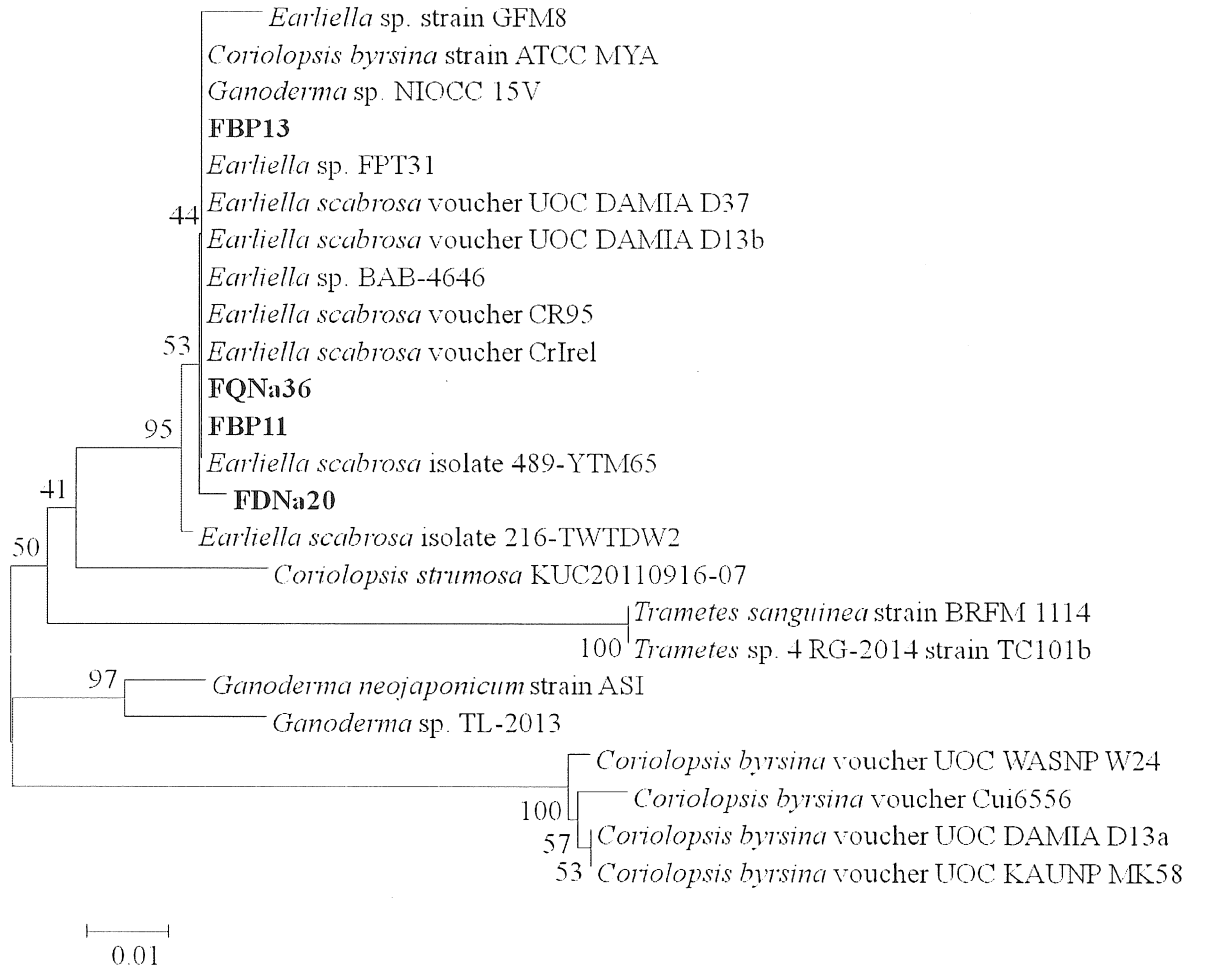
Hình 7



Hình 8

Stt	Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc mặt trước	Hình thái khuẩn lạc mặt sau
1	FBP11		
2	FBP13		
3	FDNa20		
4	FQNa36		

Hình 9



Hình 10