

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐẶNG THU QUỲNH

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ ĐẶC TÍNH MỘT SỐ ENZYME
CHUYỂN HÓA LIGNOCELLULOSE TỪ NẤM VIỆT NAM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Đỗ Hữu Nghị – Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. Người hướng dẫn 2: TS. Nguyễn Ngọc Lan – Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Đại học Y Hà Nội

Phản biện 1: PGS. TS. Lê Thanh Hà – Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội

Phản biện 2: PGS. TS. Đoàn Văn Thước – Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, Bộ Giáo dục và Đào tạo

Phản biện 3: PGS. TS. Trần Văn Tuấn – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi... giờ..., ngày... tháng... năm...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Sinh khối thực vật, nguồn carbohydrate tái tạo lớn nhất trên trái đất, được quang tổng hợp 200 tỷ tấn mỗi năm, trong đó 60% là lignocellulose. Việt Nam sở hữu nguồn tài nguyên thực vật dồi dào, tạo ra lượng lớn phụ phẩm nông-lâm nghiệp giàu lignocellulose (gỗ, rơm rạ, bã mía...). Tuy nhiên, phần lớn lượng này bị đốt hoặc thải bỏ, gây ô nhiễm. Lignocellulose, với cấu trúc bền vững gồm cellulose (35–50%), hemicellulose (15–30%), và lignin (10–25%), có thể được tận dụng trong kinh tế sinh học và tuần hoàn như sản xuất nhiên liệu sinh học. Các phương pháp hóa-lý xử lý lignocellulose thường tiêu tốn năng lượng, tạo chất thải độc hại. Để khắc phục, nghiên cứu chuyển hóa sinh học với vi sinh vật, đặc biệt là nấm, đã nổi lên nhờ tính thân thiện môi trường và hiệu quả cao. Các loài nấm thuộc Basidiomycota và Ascomycota có khả năng sinh tổng hợp enzyme thủy phân (acetyl esterase...) và enzyme oxy hóa (lignin peroxidase, laccase, cellobiose dehydrogenase...). Những enzyme này phá vỡ lignin, tăng khả năng chuyển hóa cellulose, giải phóng các đơn vị cấu trúc như đường đơn và hợp chất hữu cơ, là nguyên liệu cho sản xuất bền vững. Trong nghiên cứu, các enzyme trên được gọi là nhóm enzyme tiền xử lý sinh khối từ nấm.

Đề tài luận án NCS. ***“Nghiên cứu thu nhận và đặc tính một số enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm Việt Nam”*** tập trung nghiên cứu về hệ nấm được phân lập từ rừng tự nhiên Việt Nam (Mường Phăng-Điện Biên, Cúc Phương-Ninh Bình), từ đó thu nhận, tinh sạch và khảo sát đặc tính cũng như nghiên cứu ứng dụng trong chuyển hóa sinh khối giàu lignocellulose.

❖ Mục tiêu nghiên cứu:

- Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm sinh enzyme chuyển hóa lignocellulose hoạt tính cao (lignin peroxidase, laccase, acetyl esterase, cellobiose dehydrogenase và unspecific peroxygenase);

- Tinh sạch, xác định đặc tính hoá lý, đặc hiệu cơ chất và tối ưu xúc tác chuyển hoá sinh khối lignocellulose các enzyme thu được.

❖ **Nội dung nghiên cứu:**

1. Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp enzyme tiền xử lý sinh khối lignocellulose.
2. Nghiên cứu tinh sạch và xác định đặc tính của các enzyme tiền xử lý sinh khối từ nấm.
3. Nghiên cứu khả năng chuyển hóa sinh khối lignocellulose bởi đơn enzyme và xúc tác hiệp đồng (“*enzyme cocktail*”).

❖ **Những đóng góp mới của luận án:**

- Phân lập và xây dựng được bộ sưu tập gồm 56 chủng nấm thuộc 19 họ ngành nấm đảm Basidiomycota và nấm túi Ascomycota; trong đó có một loài mới *Candolleomyces eurysporus* (thuộc họ Psathyrellaceae, bộ Agaricales);

- Tinh sạch 05 enzyme hoạt tính acetyl esterase (*LsAE*), lignin peroxidase (*LsLiP*) từ nấm *Lentinus squarrosulus* MPN12; Cellobiose dehydrogenase (*CauCDH*) từ *Coprinellus aureogranulatus* MPG14; Laccase (*PleuLac*) từ *Pleurotus pulmonarius* MPN18 và Unspecific peroxygenase từ *Candolleomyces eurysporus* CP22 (*CeuUPO*); Xác định đặc tính lý-hoá, đặc hiệu cơ chất và động học xúc tác của enzyme;

- Tối ưu thành phần hỗn hợp enzyme (enzyme cocktail) cho xúc tác chuyển hoá sinh khối lignocellulose (rơm) thành các đơn vị đường C-5, C-6 và axit gluconic.

❖ **Ý nghĩa khoa học thực tiễn của luận án:**

Với hệ sinh thái, môi trường và sinh vật đa dạng, Việt Nam là đại diện về “điểm nóng đa dạng sinh học” (biodiversity hotspot) có ý nghĩa toàn cầu, tuy nhiên, đang bị đe dọa do các hoạt động khai thác tài nguyên thiên nhiên và sự mất mát nguồn gen là vấn đề đáng quan tâm. Sàng lọc hoạt tính và thu nhận các enzyme từ 56 chủng nấm được phân lập tại các vùng sinh thái khác

nhau, kết quả nghiên cứu của đề tài luận án đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu về tiềm năng xúc tác sinh học từ nguồn đa dạng nấm Việt Nam. Ý nghĩa khoa học của luận án cũng bao gồm các nghiên cứu tinh sạch và đặc tính enzyme, trong đó có enzyme còn ít được biết đến như unspecific peroxygenase từ loài nấm mới phân lập ở Việt Nam, *Candolleomyces eurypous*.

Như một phần nội dung quan trọng của luận án, nghiên cứu đánh giá khả năng xúc tác và tối ưu hỗn hợp enzyme cocktail trên sinh khối giàu lignocellulose khó chuyển hoá (rom, lignin) cho thấy tiềm năng ứng dụng của các enzyme này trong sản xuất các hợp chất hữu cơ nền (ví dụ: carbohydrate, phenolic, alcohol, axit carboxylic...) và nhiên liệu sinh học (bioethanol).

PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về lignocellulose và vai trò của lignocellulose trong phát triển kinh tế sinh học

1.1.1. Cấu trúc lignocellulose

Lignocellulose là một polymer bền vững, phức tạp, nằm trong thành tế bào thực vật, gồm ba thành phần chính: cellulose (40–50%), hemicellulose (20–40%), và lignin (20–35%). Tỷ lệ các thành phần này thay đổi theo nguồn gốc, như gỗ cứng có 45–47% cellulose, trong khi rom lúa mì chỉ khoảng 30%. Hàm lượng hemicellulose chiếm 35–50% ở cỏ nhưng giảm xuống 25% trong rom rạ. Lignin dao động từ 30–60% ở gỗ mềm, nhưng chỉ còn 6–10% trong bột giấy. Sự khác biệt này ảnh hưởng đến tính chất vật lý, hóa học và quy trình xử lý, phù hợp với các ứng dụng như nhiên liệu sinh học, vật liệu composite và hóa chất sinh học.

1.1.2. Trữ lượng lignocellulose

Sinh khối lignocellulose đóng vai trò quan trọng trong kinh tế sinh học, làm nguyên liệu thô cho công nghệ sinh học và công nghiệp. Dựa trên nguồn gốc và thành phần, lignocellulose gồm gỗ cứng, gỗ mềm, cây trồng (ngũ cốc,

cỏ) và cây thảo. Việt Nam, với nền nông-lâm nghiệp phát triển, tạo ra hàng trăm triệu tấn lignocellulose mỗi năm từ sản xuất nông-lâm nghiệp.

1.1.3. Vai trò của lignocellulose trong phát triển kinh tế sinh học

Chuyển hóa lignocellulose đóng vai trò quan trọng trong phát triển kinh tế sinh học nhờ khả năng tận dụng các nguồn tài nguyên sinh học tái tạo để thay thế nhiên liệu hóa thạch và tạo ra các sản phẩm giá trị gia tăng.

1.2. Các enzyme chuyển hóa lignocellulose và nguồn vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme

Cấu trúc phức tạp của lignocellulose, với liên kết chặt chẽ giữa cellulose, hemicellulose và lignin, gây khó khăn cho quá trình chuyển hóa. Các enzyme chuyển hóa lignocellulose, gồm enzyme oxy hóa (laccase, lignin peroxidase, unspecific peroxygenase...) và enzyme thủy phân (cellulase, hemicellulase), đóng vai trò then chốt. Enzyme oxy hóa phá vỡ liên kết bền vững trong lignin, tạo điều kiện cho enzyme thủy phân phân giải cellulose và hemicellulose, giải phóng monosaccharide và oligosaccharide. Sự phối hợp giữa các enzyme này quyết định hiệu suất phân giải lignocellulose.

1.2.1. Nhóm enzyme oxy hóa

Laccase (EC 1.10.3.2) là một polyphenol oxidase chứa nhiều nguyên tử đồng trong trung tâm xúc tác và thường được gọi là polyphenol oxidase đa đồng [59].

Lignin peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) là các hemoprotein đơn phân, có vai trò quan trọng trong quá trình oxy hóa hợp chất lignin. Các isozyme LiP có thể oxy hóa trực tiếp nhiều loại chất hữu cơ.

Unspecific peroxygenase (EC 1.11.2.1), thường được gọi là UPO, là một enzyme oxy hóa thuộc nhóm heme-thiolate peroxidase, được biết đến với khả năng xúc tác phản ứng peroxygen hóa. UPO có khả năng trực tiếp oxy hóa lignin trong lignocellulose nhờ sử dụng hydrogen peroxide làm chất oxy hóa, không cần đến các chất trung gian như nhiều enzyme khác.

Cellobiose dehydrogenase (CDH, EC 1.1.99.18) là một enzyme ngoại bào được sinh tổng hợp bởi các loại nấm thoái hóa gỗ khác nhau. Enzyme này oxy hóa các cellodextrin hòa tan, mannodextrin và lactose một cách hiệu quả thành các lacton tương ứng của chúng bằng cơ chế riêng biệt sử dụng phổ rộng các chất nhận điện tử bao gồm quinone, phenoxyl radicals, Fe^{3+} , Cu^{2+} và ion triiodide. CDH hấp phụ mạnh và đặc biệt vào cellulose mang hai nhóm FAD và heme trong hai miền khác nhau có thể được tách ra sau khi phân giải protein giới hạn.

1.2.2. Nhóm enzyme thủy phân

1.2.2.1. Họ glycoside hydrolase

Glycoside hydrolase (hay glycosidase, glycosyl hydrolase; EC 3.2.1-) là nhóm enzyme lớn và phổ biến, xúc tác phản ứng thủy phân liên kết glycosidic giữa hai hay nhiều carbohydrate hoặc giữa một carbohydrate và phần non-carbohydrate. Trong họ này phải kể đến enzyme quan trọng là cellulase, một phức hệ gồm endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) và cellobiase (EC 3.2.1.21). Sự phân giải cellulose tự nhiên là một quá trình phức tạp đòi hỏi sự tham gia phối hợp của nhiều enzyme khác nhau. Các enzyme này xúc tác quá trình thủy phân cắt ngắn mạch cellulose.

Sự phân giải cellulose tự nhiên là một quá trình tham gia phối hợp của nhiều enzyme khác nhau. Các enzyme này xúc tác quá trình thủy phân cắt ngắn mạch cellulose. Hệ cellulase gồm các enzyme chính như: Endo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), còn gọi là cellulase này tác động thủy phân lên các liên kết phía trong mạch cellulose một cách tùy tiện làm trương phồng cellulose, dẫn đến làm giảm nhanh chiều dài mạch và tăng chậm các nhóm khử.

Exo-1,4 - glucanase (EC 3.2.1.91), còn gọi là cellobiohydrolase. Enzyme này giải phóng cellobiose hoặc glucose từ đầu không khử của cellulose. Enzyme này tác động yếu lên vùng vô định hình ở phía bên trong

của mạch, nhưng tác động mạnh lên mạch bên ngoài của cellulose kết tinh hoặc cellulose đã bị phân giải một phần.

β - 1,6 - glucosidase (EC 3.2.1.21), còn gọi là cellobiase. Enzyme này thủy phân cellobiose và các celloextrin hoà tan, chúng có hoạt tính thấp và giảm khi chiều dài của mạch cellulose tăng lên. Tùy theo vị trí mà β - glucosidase được coi là nội bào, ngoại bào hoặc liên kết với thành tế bào. Chức năng của β - glucosidase có lẽ là điều chỉnh sự tích lũy các chất cảm ứng của cellulose.

1.2.2.2. Nhóm carbohydrate esterase

Một mắt xích quan trọng tham gia vào quá trình thủy phân cấu trúc lignocelluloses là hệ carbohydrate esterase (CE), đại diện cho một nhóm lớn các hydrolase xúc tác đặc biệt cho sự phân tách hoặc hình thành các ester no và ester thơm. Trong đó, hai enzyme acetyl esterase (EC 3.1.1.6) và feruloyl esterase (EC 3.1.1.73) hoạt động trên các chuỗi nhánh của cấu trúc polysaccharide thành tế bào để phân cắt liên kết cầu nối giữa các chuỗi xylan và giữa xylan với lignin để tách riêng phần lignin ra khỏi cấu trúc lignocelluloses. Chúng đóng một vai trò quan trọng ở giai đoạn đầu quá trình thủy phân lignocelluloses.

Acetyl (xylan) esterase: Quá trình chuyển hóa lignocellulose cần hỗn hợp các enzyme thủy phân bao gồm các cellulase, xylanase, carbohydrate esterase... có thể hoạt động phối hợp với nhau để tấn công cấu trúc polymer. Một trong số các carbohydrate esterase tham gia vào chuyển hóa lignocellulose là acetyl esterase.

Feruloyl esterase (FAE, EC 3.1.1.73) hay còn gọi là ferulic axit esterase thuộc nhóm carboxylic este hydrolase là một loại enzyme từ vi sinh vật có khả năng tác dụng lên thành tế bào thực vật, phá vỡ cấu trúc thành tế bào, tạo điều kiện cho các enzyme khác tấn công, chuyển hóa các thành phần khác có trong tế bào thực vật.

1.3. Đặc điểm enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm

Enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm có tiềm năng lớn nhờ khả năng phân giải lignin, cellulose và hemicellulose hiệu quả hơn so với enzyme từ vi khuẩn hoặc thực vật. Nấm sản xuất đa dạng enzyme lignocellulolytic mạnh mẽ, đặc biệt các enzyme phân giải lignin, giúp xử lý lignocellulose thành sản phẩm giá trị. Dù vi khuẩn phát triển nhanh và sản xuất enzyme nhanh hơn, chúng thiếu sự đa dạng enzyme cần thiết để xử lý lignocellulose hiệu quả.

CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Mẫu Các mẫu quả thể nấm, thu hoạch vào mùa mưa (tháng 10) từ rừng quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mường Phăng (Điện Biên), được lưu trữ tại phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Mẫu rom được thu thập từ Củ Chi, TP. Hồ Chí Minh, mẫu sau thu hoạch đem rửa bằng nước sạch, phơi khô dưới nắng tới khi độ ẩm $\leq 15\%$, bảo quản tại nhiệt độ phòng (25-30°C) sau khi cắt thành các đoạn ngắn 0,5-2 mm.

Lignin được tách từ nguồn từ rom khô ở trên theo mô tả bởi Đỗ Hữu Nghị và cộng sự.

Enzyme thương mại thu nhận từ nguồn nấm *Trichoderma reesei* (cellulase và glucuronoxylanase; Cell/Xyl) cung cấp bởi AB Enzyme, Darmstadt, CHLB Đức, hoạt động tối ưu ở pH 5,0, và nhiệt độ ở 40°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm

2.2.2. Định danh nấm

- 2.2.3. Nghiên cứu sinh tổng hợp enzyme từ nấm
- 2.2.4. Ảnh hưởng một số yếu tố đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp enzyme của các chủng nấm chọn lọc
- 2.2.5. Phương pháp đo hoạt độ enzyme
- 2.2.6. Tinh sạch enzyme tự nhiên
- 2.2.7. Xác định đặc tính của enzyme tinh sạch
- 2.2.8. Xúc tác chuyển hóa sinh học vật liệu lignin
- 2.2.9. Xúc tác chuyển hóa sinh học vật liệu rơm bằng “enzyme cocktail”
- 2.2.10. Sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC)
- 2.2.11. Phương pháp tối ưu tỷ lệ phối trộn tạo hỗn hợp enzyme cocktail cho chuyển hóa rơm bằng quy hoạch thực nghiệm đáp ứng bề mặt (RSM).

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp enzyme tiền xử lý lignocellulose có hoạt tính cao

3.1.1. Phân lập nấm

Từ các mẫu quả thể nấm thu thập ở vùng sinh thái khu vực Vườn Quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mường Phăng (Điện Biên) đã phân lập được 56 chủng nấm thuộc ngành nấm đảm Basidiomycota và nấm túi Ascomycota. Các mẫu nấm đã được tinh sạch và phân loại thông qua đặc điểm hình thái và phương pháp sinh học phân tử.

3.1.2. Sàng lọc các chủng nấm sinh enzyme

Khả năng sinh tổng hợp nhóm enzyme bao gồm lignin peroxidase, cellobiose dehydrogenase, laccase, acetyl esterase, và unspecific peroxygenase của 56 chủng nấm lựa chọn đã được đánh giá dựa trên khả năng chuyển hóa cơ chất phù hợp của mỗi enzyme. Dịch chiết môi trường sau khi nuôi cấy được loại bỏ các thành phần tạp và sinh khối để xác định hoạt tính enzyme.

Khi so sánh kết quả đánh giá hoạt tính có thể nhận thấy sự khác biệt về khả năng sinh tổng hợp các enzyme giữa các chủng nấm phân lập được.

Nổi trội là chủng nấm MPN12 có khả năng sinh tổng hợp tốt nhất cả hai enzyme AE và LiP. Bên cạnh đó, chủng MPG14 và chủng MPN18 là hai chủng có khả năng sinh tổng hợp lần lượt các enzyme CDH và Lac tốt nhất. Trong khi đó enzyme UPO được sinh tổng hợp tốt nhất ở chủng CP22. Do vậy, bốn chủng MPN12, MPG14, MPN18 và CP22 được lựa chọn cho các nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thu nhận enzyme và xác định đặc điểm các enzyme tương ứng và ứng dụng của enzyme này trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose.

3.1.3. Định danh các chủng phân lập có hoạt tính enzyme cao

3.1.3.1. Kết quả xác định trình tự nucleotide của chủng nấm MPN12

Trình tự thu được từ chủng nấm MPN12 được kiểm tra tính tương đồng với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự mẫu nấm MPN12 tương đồng cao 99,76% với loài *Lentinus squarrosulus* GU001951. Thêm vào đó, sơ đồ mối quan hệ di truyền của một số loài thuộc chi *Lentinus* đã cũng đã được xây dựng theo phương pháp ML. Chủng nấm MPN12 và loài nấm *Lentinus squarrosulus* tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (99,76%) và có quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap trên 98%. Kết quả này cho phép nhận định chủng nấm MPN12 có chung nguồn gốc với loài *Lentinus squarrosulus*.

3.1.3.2. Kết quả xác định trình tự nucleotide của chủng nấm MPN18

Trình tự thu được từ chủng nấm MPN18 được kiểm tra tính tương đồng với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự mẫu nấm MPN18 tương đồng cao 100% với loài *Pleurotus pulmonarius* MH395979. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của một số loài thuộc chi *Pleurotus* đã được xây dựng theo phương pháp ML. Chủng nấm MPN18 và loài nấm *Pleurotus pulmonarius* tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (100%) và có quan hệ mật thiết

với nhau với giá trị bootstrap 99%. Kết quả này cho phép nhận định chủng nấm MPN18 có chung nguồn gốc với loài *Pleurotus pulmonarius*.

3.1.3.3. Kết quả xác định trình tự nucleotide của chủng nấm MPG14

Trình tự thu được từ chủng nấm MPG14 được kiểm tra tính tương đồng với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự mẫu nấm MPG14 tương đồng cao tương đồng cao 100% với loài *Coprinellus aureogranulatus* GQ249274. Kết quả này cho phép nhận định chủng nấm MPG14 có chung nguồn gốc với loài *Coprinellus aureogranulatus*.

3.1.3.4. Kết quả xác định trình tự nucleotide của chủng nấm CP22

Trình tự ITS của chủng nấm CP22 tương đồng cao 100% với loài *Candolleomyces euryspous* NR172427. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm CP22 và một số loài thuộc chi *Coprinellus* đã được xây dựng theo phương pháp ML. Chủng nấm CP22 và loài nấm *C. euryspous* tạo thành một nhóm riêng với giá trị bootstrap 100%. Kết quả này cho phép nhận định chủng nấm CP22 có chung nguồn gốc với loài *C. euryspous*. Như vậy, từ kết quả phân loại bằng phương pháp sinh học phân tử có thể kết luận mẫu nấm phân lập ký hiệu CP22 là loài nấm mục trắng *Candolleomyces euryspous* CP22 thuộc họ Psathyrellaceae.

3.1.4. Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy để thu nhận enzyme từ nấm

3.1.4.1. Ảnh hưởng nhiệt độ, pH đến khả năng sinh trưởng của nấm

Nhiệt độ và pH là hai yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm. Trong dải nhiệt độ 23–37°C, tất cả các chủng nấm đều sinh trưởng được, với nhiệt độ tối ưu cho MPN12, MPN18, MPG14 là 27°C và CP22 là 29°C. Về pH, các chủng nấm phát triển trong khoảng 4,0–8,0, với pH tối ưu cho MPN18, MPG14, CP22 là 6,0, và MPN12 là 5,5. Ở nhiệt độ hoặc pH ngoài khoảng tối ưu, tốc độ sinh trưởng giảm rõ rệt.

3.1.4.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp enzyme của nấm

Thí nghiệm xác định nguồn nitơ thích hợp cho sự phát triển sinh khối và sinh enzyme của các chủng nấm cho thấy, các môi trường chứa nitơ hữu cơ (peptone và cao nấm men) thúc đẩy sự sinh trưởng tốt hơn so với nguồn nitơ vô cơ (KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3). Chủng MPN12 phát triển tốt nhất trong cao nấm men, nhưng enzyme AE có hoạt độ cao nhất trong môi trường peptone. Chủng MPN18 có sinh khối cao nhất và hoạt độ enzyme laccase cao nhất trong môi trường cao nấm men. Chủng MPG14 phát triển tốt nhất trên cao nấm men, nhưng enzyme CDH đạt hoạt độ cao nhất trong môi trường peptone. Chủng CP22 có sinh trưởng tốt nhất trong peptone, nhưng enzyme UPO lại đạt hoạt độ cao nhất trong môi trường cao nấm men. Tóm lại, cao nấm men và peptone là nguồn nitơ phù hợp cho các chủng nấm tùy thuộc vào loại enzyme cần tổng hợp.

3.2. Nghiên cứu tinh sạch và xác định đặc tính của các enzyme lignin peroxidase, laccase, acetyl esterase, cellobiose dehydrogenase và unspecific peroxygenase từ nấm

3.2.1. Nghiên cứu tinh sạch các enzyme

3.2.1.1. Tinh sạch acetyl esterase từ *L. squarrosulus* MPN 12 (*LsAE*)

Sau quá trình tinh sạch đã thu được tổng lượng protein enzyme là 17,0 mg, tương đương 391 U, hoạt tính riêng đạt 23 U/mg và hiệu suất 7,5 % với độ tinh sạch 12,1 lần so với dịch thô ban đầu (Bảng 3.1). Phân đoạn enzyme tinh sạch này được bảo quản ở -20°C và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc tính protein enzyme cũng như nghiên cứu chuyển hóa *in vitro* vật liệu giàu lignocellulose. Điện di SDS-PAGE của phân đoạn có hoạt tính AE cao nhất qua các bước tinh sạch ở trên cho thấy vạch protein *LsAE* có $M_w = 41,4$ kDa.

Bảng 3.1. Tinh sạch enzyme *LsAE* từ dịch lên men *L. squarrosulus* MPN12.

Các bước tinh sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Hiệu suất (%)	Độ tinh sạch (lần)
Dịch chiết thô	2709	5214	1,9	100	1.0
DEAE Cellulose	210	2540	12,1	48,9	6,4
Sephadex G-100	57	789	13,8	15,2	7,3
HiTrap™ Q XL	17	391	23	7,5	12,1

3.2.1.2. Tinh sạch cellobiose dehydrogenase từ *C. aureogranulatus* MPG 14 (*CauCDH*)

Chúng năm nghiên cứu đã sinh tổng hợp được một lượng *CauCDH* đáng kể trong quá trình lên men rắn với rom để thu được một lượng dịch chiết thô chứa tổng hoạt độ *CauCDH* là 1817,1 U (được đo với chất nhận điện tử là DCIP) (Bảng 3.2). Trong suốt quá trình tinh sạch, hoạt tính enzyme sau từng bước đã được đánh giá và tính toán ra hoạt độ riêng, cũng như số lần tinh sạch ở bảng trên. Sau quy trình tinh sạch 3 bước (sắc ký trao đổi ion và sắc ký rây phân tử), hàm lượng *CauCDH* còn lại chỉ đạt 22,7% nhưng đã được tinh sạch tới 41,9 lần từ dịch lọc nuôi cấy thô với hoạt độ riêng 28,86 U/mg (tổng 411,8 U). Độ tinh khiết của *CauCDH* sau bước cuối cùng trên cột HiTrap Q FF được đánh giá bằng phân tích điện di SDS-PAGE, cho thấy một dải band rõ ràng với khối lượng phân tử là 109 kDa.

Bảng 3.2. Tinh sạch enzyme *CauCDH* từ dịch lên men *C. aureogranulatus* MPG14.

Các bước tinh sạch	Hoạt tính tổng, U	Protein tổng, mg	Hoạt tính riêng, U/mg	Hiệu suất, %	Độ tinh sạch, (lần)
--------------------	-------------------	------------------	-----------------------	--------------	---------------------

Dịch chiết thô	1817,1	2635,6	0,69	100	1,0
Siêu lọc 10 kDa	1687,1	2239,3	0,75	92,8	1,1
DEAE Sepharose	889,2	231,5	3,84	48,9	5,6
Superdex G100	549,2	25,7	21,33	30,2	30,9
HiTrap™ Q FF	411,8	14,3	28,86	22,7	41,9

3.2.1.3. Tinh sạch laccase từ *Pleurotus pulmonarius* MPN 18 (*PleuLac*)

Sau quá trình tinh sạch đã thu được lượng protein enzyme tinh sạch là 19 mg, tương đương 532,0 U và hiệu suất 8,3 % với độ tinh sạch 9,6 lần. Phân đoạn enzyme tinh sạch này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc tính protein enzyme (Bảng 3.3). Điện di SDS-PAGE của protein tinh sạch ở trên cho thấy vạch protein *PleuLac* có $M_w = 35$ kDa.

Bảng 3.3. Tinh sạch enzyme *PleuLac* từ dịch lên men *P. pulmonarius* MPN18.

Các bước tinh sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Hiệu suất (%)	Độ tinh sạch (lần)
Dịch chiết thô	2243	6432	2,9	100	1.0
Cột DEAE Cellulose	205	3011	14,7	46,8	5,1
Sephadex G-100	54	889	16,5	13,8	5,7
HiTrap™ Q XL	19	532	28	8,3	9,6

3.2.1.4. Tinh sạch lignin peroxidase từ *L. squarrosulus* MPN 12 (*LsLiP*)

Dịch chiết thô chứa enzyme *LsLiP* được tinh sạch qua ba bước sắc ký liên tiếp: trao đổi ion trên cột DEAE Cellulose, lọc gel trên cột Sephadex /G00, và cuối cùng là sắc ký trên cột HiTrap™ Q XL. Kết thúc quá trình tinh sạch, thu được 20 mg protein enzyme với tổng hoạt tính 566 U, hoạt tính

riêng đạt 28,3 U/mg, hiệu suất thu hồi đạt 15,7%, và độ tinh sạch tăng gấp 47,1 lần so với dịch thô ban đầu (Bảng 3.4). Protein tinh sạch được bảo quản ở -20°C, sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo. Kết quả tinh sạch sau 2 cột sắc ký trao đổi anion và 1 cột sắc ký lọc gel được thể hiện ở bảng protein có khối lượng phân tử xấp xỉ 53 kDa. Ở những loài nấm khác nhau thì *LsLiP* cũng có khối lượng phân tử khác nhau, tuy nhiên chủ yếu ở khoảng 38-50 kDa, như LiP của chủng *Loweporus lividus* MTCC-1178 có kích thước 43kDa, hay LiP từ chủng *Phanerochaete sordida* YK-624 có kích thước khoảng 50 kDa. Do vậy, *LsLiP* cũng có khối lượng phân tử tương tự như nhiều loài nấm khác.

Bảng 3.4. Tinh sạch enzyme *LsLiP* từ dịch lên men *L. squarrosulus* MPN12.

Các bước tinh sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Hiệu suất (%)	Độ tinh sạch (lần)
Dịch chiết thô	5400	3600	0.6	100	1.0
DEAE Cellulose	350	1250	4	35	6.7
Sephadex G-100	80	831	10.4	23	17.3
HiTrap™ Q XL	20	566	28.3	15.7	47.1

3.2.1.5. Tinh sạch *unspecific peroxygenase* từ *Candolleomyces euryspous* CP22 (*CeuUPO*)

Kết thúc quá trình tinh sạch, tổng lượng protein enzyme thu được là 19 mg, tương đương với tổng hoạt tính 534 U. Hoạt tính riêng của enzyme tăng lên 28,1 U/mg, hiệu suất tinh sạch đạt 23,2%, và độ tinh sạch tăng 45,3 lần so với dịch chiết ban đầu. Độ tinh sạch của protein được xác định bằng điện di cho thấy một band protein rõ nét xấp xỉ 40 kDa trên gel SDS-PAGE.

Bảng 3.5. Tinh sạch enzyme *CeuUPO* từ dịch lên men *C. euryspous* CP22.

Các bước tinh sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Hiệu suất (%)	Độ tinh sạch (lần)
Dịch chiết thô	3700	2300	0.62	100	1.0
DEAE Cellulose	280	1110	3.9	42.8	6.3
Sephadex G-75	83	787	9.5	34.2	15.3
Mono Q™	19	534	28.1	23.2	45.3

3.2.2. Xác định đặc tính của enzyme

3.2.2.1. Xác định đặc tính của *acetyl esterase (LsAE)* từ chủng nấm *Lentinus squarrosulus* MPN12

Ở pH 5.5 và 35°C, hoạt tính của *LsAE* sẽ đạt giá trị cao nhất. Độ bền hoạt tính AE phụ thuộc vào nhiệt độ được xác định ở pH 5.5 và 35°C trong khoảng ủ enzyme khác nhau (từ 0 tới 120 phút) ở những nhiệt độ khác nhau (4, 25, 40 và 60°C). Enzyme tương đối bền ở 4 và 25°C sau 1h ủ, tuy nhiên hoạt tính giảm dần ở 1h tiếp theo.. Enzyme tinh sạch cho thấy bền hoạt tính ở pH axit (pH 5.0), sau 6h ủ hoạt tính enzyme dường như không giảm so với ban đầu. Ở pH trung tính (pH 7.0), hoạt tính enzyme giảm dần đều từ 1 tới 6h ủ.

3.2.2.2. Xác định đặc tính của *cellobiose dehydrogenase (CauCDH)* từ chủng nấm *Coprinellus aureogranulatus* MPG14

Hoạt tính của *CauCDH* cao nhất ở 50°C và pH 5,5 khi so với những nhiệt độ khác lân cận. Độ bền hoạt tính CDH phụ thuộc vào nhiệt độ được xác định ở pH 5,5 và 50°C trong khoảng ủ enzyme khác nhau (từ 0 tới 120 phút) ở những nhiệt độ khác nhau (25, 40 và 70°C). Enzyme tương đối bền ở 25°C sau 12h ủ, tuy nhiên hoạt tính giảm dần ở 70°C. Enzyme tinh sạch

cho thấy bền hoạt tính ở pH axit (pH 4.0), sau 12h ủ hoạt tính enzyme dường như không giảm so với ban đầu. Ở pH trung tính (pH 8.0), hoạt tính enzyme giảm mạnh sau 2h ủ, và sau chỉ sau 8h ủ enzyme hầu như không còn hoạt tính.

3.2.2.3. Xác định đặc tính của laccase (*PleuLac*) từ chủng nấm *Pleurotus pulmonarius* MPN18

Hoạt tính của *PleuLac* cao nhất ở 40°C và pH 5,5 khi so với những nhiệt độ khác lân cận. Độ bền hoạt tính laccase phụ thuộc vào nhiệt độ được xác định ở pH 5,5 và 40°C trong khoảng ủ enzyme khác nhau (từ 0 tới 120 phút) ở những nhiệt độ khác nhau (25, 40 và 70 °C). Enzyme tương đối bền ở 25°C sau 120 phút ủ, tuy nhiên hoạt tính giảm dần ở 40 °C, và giảm mạnh ở nhiệt độ 70°C, sau 120 phút ủ thì hoạt tính giảm xuống tương ứng còn xấp xỉ 20% so với ban đầu. Bên cạnh đó, *PleuLac* cho thấy bền hoạt tính ở pH axit (pH 5.0), sau 6h ủ hoạt tính enzyme dường như không giảm so với ban đầu.

3.2.2.4. Xác định đặc tính của lignin peroxidase (*LsLiP*) từ chủng nấm *Lentinus squarrosulus* MPN12

Hoạt tính cao nhất của LiP cho thấy ở pH 5.0 và 35°C khi được so sánh với những nhiệt độ lân cận. Độ bền hoạt tính LiP phụ thuộc vào nhiệt độ được xác định ở pH 5.0 và 35 °C trong khoảng ủ enzyme khác nhau (từ 0 tới 120 phút) ở những nhiệt độ khác nhau (4, 25, 40 và 60 °C). Enzyme tương đối bền ở 4 và 25 °C sau 1h ủ, tuy nhiên hoạt tính giảm dần ở 1h tiếp theo. Sau 2h ủ thì hoạt tính giảm xuống xấp xỉ 60% so với ban đầu. Enzyme tinh sạch cho thấy bền hoạt tính ở pH axit (pH 4.0), sau 1h ủ hoạt tính enzyme dường như không giảm so với ban đầu, chỉ bắt đầu giảm nhẹ sau 3h ủ. Ở pH trung tính (pH 6.0), hoạt tính enzyme giảm dần đều từ 1 tới 6h ủ.

3.2.2.5. Xác định đặc tính của unspecific peroxygenase (*CeuUPO*) từ chủng *Candolleomyces euryspous* CP22

Để xác định pH tối ưu của *CeuUPO*, hoạt tính enzyme được khảo sát trong dải pH từ 2.0 đến 10.0 đối với ba cơ chất ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)], veratryl alcohol (VA), và 2,6-dimethoxyphenol (DMP). Kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme *CeuUPO* hoạt động tối ưu ở các pH khác nhau tùy thuộc vào cơ chất. Cụ thể, enzyme *CeuUPO* cho thấy hoạt tính mạnh mẽ nhất đối với ABTS ở pH axit (5,0), trong khi đối với VA và DMP, enzyme này lại hoạt động hiệu quả nhất trong khoảng pH trung tính (7,0). Điều này chỉ ra rằng *CeuUPO* có khả năng thích nghi tốt với môi trường pH khác nhau, và khả năng xúc tác của enzyme thay đổi theo từng cơ chất cụ thể.

3.2.3. Động học xúc tác của enzyme

3.2.3.1. Động học xúc tác của *LsAE*

Enzyme *LsAE* tinh sạch từ chủng *L. squarrosulus* MPN12 đã được xác định các hằng số động học đối với cơ chất *p*-nitrophenyl acetate thông qua phương trình Lineweaver-Burk. Các nồng độ *p*-nitrophenyl acetate khác nhau, từ 0,3 mM đến 1,5 mM được sử dụng để xác định vận tốc (V_{max}). Kết quả xác định được giá trị K_m là 4,03 μM và giá trị V_{max} là 312 $\mu\text{M/phút}$. Giá trị tốc độ xúc tác (k_{cat}) của phản ứng xúc tác là 10 s^{-1} , dẫn đến hiệu suất xúc tác (k_{cat}/K_m) là $2,48\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{ s}^{-1}$.

3.2.3.2. Động học xúc tác của *CauCDH*

Hằng số Michaelis-Menten (K_m từ 117,1 đến 1.354.000 μM) và hiệu suất xúc tác (giá trị k_{cat}/K_m từ $25,8 \times 10^4$ đến $21,7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ tương ứng với cellobiose và maltose) có thể được xác định cho tất cả các cơ chất thử nghiệm. Ái lực cao nhất ($K_m = 117,1\text{ }\mu\text{M}$) và hiệu suất xúc tác ($k_{cat}/K_m = 25,8 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) đã được quan sát đối với cellobiose, và đó là cơ chất tốt nhất của *CauCDH*. Điều này cho thấy enzyme *CauCDH* có khả năng nhận biết và xúc tác phân giải cellobiose hiệu quả hơn so với các cơ chất khác, phản ánh sự đặc hiệu cơ chất cao và hiệu quả xúc tác vượt trội trong quá trình chuyển hóa

disaccharide này. Kết quả này gợi ý tiềm năng ứng dụng của *CauCDH* trong các quy trình sinh học liên quan đến phân giải cellulose hoặc sản xuất bioethanol, nơi cellobiose là sản phẩm trung gian chính.

3.2.3.3. Động học xúc tác của *PleuLac*

Hằng số động học của *PleuLac* tinh sạch đã được xác định với ABTS làm cơ chất chính. Các nồng độ ABTS khác nhau, từ 0,1 mM đến 1 mM được sử dụng để xác định vận tốc (V_{max}). Kết quả xác định được giá trị K_m là 1,35 μ M, nhỏ hơn giá trị K_m của laccase từ các chủng khác, cho thấy *PleuLac* có ái lực cao hơn đối với cơ chất ABTS. Điều này cho thấy enzyme có khả năng xúc tác hiệu quả ngay cả ở nồng độ cơ chất thấp, làm nổi bật tiềm năng ứng dụng của nó trong các quy trình sinh học, đặc biệt là trong xử lý ô nhiễm môi trường và công nghiệp dệt nhuộm, nơi mà nồng độ cơ chất thường thay đổi và có thể rất thấp.

3.2.3.4. Động học xúc tác của *LsLiP*

Enzyme *LsLiP* có khả năng xúc tác oxy hóa hiệu quả các cơ chất như DCP, guaiacol, ferulic axit, veratryl alcohol, vanillic axit, và dimethoxyphenol. Kết quả cho thấy enzyme này đặc hiệu cao với cơ chất DCP trong số các hợp chất phenolic được khảo sát. Hoạt tính lên đến 240% đối với DCP và tiếp theo 180% đối với cơ chất veratryl alcohol. Tuy nhiên, *LsLiP* có hoạt tính thấp hơn nhiều so với các hợp chất thơm khác (guaiacol, ferulic axit và vanillic axit).

Hằng số động học của *LsLiP* tinh sạch đã được xác định với DCP làm cơ chất chính. Các nồng độ DCP khác nhau, từ 0,3 mM đến 1,5 mM được sử dụng để xác định vận tốc (V_{max}). Kết quả xác định được giá trị K_m là 2,45 μ M và giá trị V_{max} là 285 μ M/phút. Giá trị tốc độ xúc tác (k_{cat}) của phản ứng peroxidase *LsLiP* là 12 s^{-1} , dẫn đến hiệu suất xúc tác (k_{cat}/K_m) là 4,85 μ M $^{-1}$ s^{-1} .

3.2.3.5. Động học xúc tác của *CeuUPO*

Các hằng số động học xúc tác của enzyme *CeuUPO* tinh sạch đã được xác định đối với ba cơ chất: ABTS, VA, và DMP. Kết quả cho thấy enzyme *CeuUPO* có ái lực mạnh nhất đối với cơ chất ABTS, với giá trị K_m thấp nhất là 39 μM , tiếp theo là DMP với $K_m = 117 \mu\text{M}$, và VA với $K_m = 693 \mu\text{M}$. Điều này chứng tỏ *CeuUPO* có khả năng xúc tác hiệu quả nhất đối với ABTS, với ái lực cao và sự tương tác tốt hơn so với các cơ chất còn lại.

3.3. Nghiên cứu ứng dụng xúc tác sinh học enzyme trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose

3.3.1. Nghiên cứu xúc tác oxy hóa lignin bởi enzyme *LsLiP* tinh sạch từ nấm *L. squarrosulus*

Lignin có nguồn gốc từ rơm rạ ở dạng rắn, có màu nâu sẫm được sử dụng làm cơ chất chuyển hóa sinh học xúc tác bởi *LsLiP* từ *L. squarrosulus* MPN12.

Kết quả phân tích phổ FTIR của lignin trước và sau khi xử lý *LsLiP*. Theo đó, vùng fingerprint ($1600-1000 \text{ cm}^{-1}$) trong phổ của lignin đã thay đổi đáng kể sau khi xử lý enzyme, tương ứng với các dao động kéo dài của các nhóm khác nhau trong cấu trúc lignin. Cường độ đỉnh dao động kéo dài (1115 cm^{-1}) đặc trưng biến dạng phẳng của đơn vị syringyl của lignin giảm, cho thấy đại phân tử của lignin đã bị phân hủy. Sự hình thành đỉnh 1080 và 1039 cm^{-1} của mẫu sau xử lý là dấu hiệu của sự tạo thành liên kết C-O trong alcohol bậc 1.

Như vậy, kết quả phân tích FTIR cho thấy được vai trò quan trọng của *LsLiP* trong xúc tác chuyển hóa lignin từ sinh khối thực vật.

3.3.2. Chuyển hóa sinh khối rơm bởi hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”)

3.3.2.1. Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đơn đến hiệu quả chuyển hóa

Mục đích của đánh giá kết quả thực nghiệm nhằm tìm ra các giá trị tối ưu như tỷ lệ hoạt độ enzyme/cơ chất (U g^{-1}) của từng enzyme đơn trong hỗn hợp “enzyme cocktail” tham gia vào phản ứng chuyển hóa lignocellulose

thành các đường đơn. Kết quả thí nghiệm đã xác định vùng hoạt động thích hợp và tâm thí nghiệm cho mô hình tối ưu thực nghiệm đối với enzyme Cell/Xyl tương ứng là 12 – 24 U g⁻¹ và 18 U g⁻¹, đối với enzyme AE từ 25 – 45 U g⁻¹ và 35 U g⁻¹, và đối với enzyme CDH tương ứng là 40 – 60 U g⁻¹ và 50 U g⁻¹.

3.3.2.2. Tối ưu hóa nồng độ enzyme tham gia chuyển hóa bằng quy hoạch thực nghiệm

Mức và phạm vi cơ bản của các tham số phản ứng từ kết quả nghiên cứu với các hệ số đơn, trong đó tỷ lệ của từng hoạt độ của enzyme/cơ chất (Cell/Xyl, AE và CDH; U g⁻¹) được chọn là biến độc lập. Nhìn chung, sự gia tăng đáng kể nhất của các chất chuyển hóa (monosaccharide, carboxylic axit) được quan sát ở các tỷ lệ enzyme/cơ chất 18 U g⁻¹ đối với Cell/Xyl, 35 U g⁻¹ đối với AE và 50 U g⁻¹ đối với CDH. Ở tỷ lệ cao hơn dẫn đến kết quả chỉ tăng nhẹ các chất chuyển hóa được giải phóng như trình bày ở trên. Theo đó, ba tỷ lệ của mỗi loại enzyme được chọn làm vùng khảo sát các thông số đầu vào cho ma trận thiết kế thí nghiệm, đó là 12, 18, 24 U g⁻¹ đối với Cell/Xyl, 25, 35, 45 U g⁻¹ đối với AE và 40, 50, 60 đối với CDH, tương ứng với mức thấp (-1), đường cơ sở (0) và mức cao (+1), tương ứng (Bảng 3.6).

Bảng 3.6. Các biến độc lập và khoảng biến thiên của chúng.

Biến độc lập	Code	Miền biến thiên (Δ)	Mức		
			-1	0	1
Z ₁ : Cell/Xyl (hoạt độ/cơ chất, U g ⁻¹)	A	6	12	18	24
Z ₂ : AE (U g ⁻¹)	B	10	25	35	45
Z ₃ : CDH (U g ⁻¹)	C	10	40	50	60

Các biến phụ thuộc, hiệu suất/hàm lượng (Y) của sản phẩm glucose (mg g^{-1}), xylose (mg g^{-1}) và axit gluconic (mg g^{-1}) được xác định qua thực nghiệm thể hiện trong thiết kế ma trận. Kết quả mô hình từ phân tích phương sai (ANOVA) cho các hàm mục tiêu (lượng sản phẩm sau xúc tác chuyển hóa enzyme) được đánh giá qua giá trị F , giá trị p và giá trị R^2 . Các phản hồi dự đoán của ba hàm mục tiêu Y_1 , Y_2 và Y_3 và các biến độc lập liên quan đến phương trình đa thức bậc hai đã được xác định. Mô hình hồi quy bậc hai ANOVA đã chứng minh cả ba mô hình tương ứng với ba hàm mục tiêu đều phù hợp và có ý nghĩa cao. Giá trị F của Y_1 , Y_2 , và Y_3 lần lượt là 84,44, 110,35 và 38,60 và giá trị p nhỏ hơn 0,05 cho thấy tất cả các mô hình đều có ý nghĩa thống kê. Các hệ số xác định của mô hình (R^2) lần lượt là 0,9835, 0,9850 và 0,9858, cho thấy hầu hết sự thay đổi năng suất có thể được giải thích bằng dữ liệu thực nghiệm. Những dữ liệu này hỗ trợ độ chính xác của mô hình đã thiết lập cũng như xác nhận sự thống nhất cao giữa dữ liệu đo được và tính toán trên lý thuyết.

Bảng 3.7. Mô hình phương trình đa thức bậc hai, hàm lượng glucose (Y_1), xylose (Y_2) và axit gluconic (Y_3).

Đáp ứng	Phương trình mô hình	Giá trị R^2	Giá trị p
Y_1	$Y_1 = 159,54 + 5,56A + 16,48B + 6,29C - 7,13A^2 - 15,84B^2 - 6,52C^2$	0,9835	< 0,0001
Y_2	$Y_2 = 63,23 + 2,95A + 6,07B + 2,57C - 2,46A^2 - 7,08B^2 - 1,89C^2$	0,9850	< 0,0001
Y_3	$Y_3 = 5,01 + 0,71A + 0,48B + 0,17C - 0,21AB - 0,64A^2 - 0,33B^2 - 0,36C^2$	0,9858	0,0004

3.3.2.3. Phân tích đáp ứng bề mặt và xác minh mô hình

Mô hình tính toán bậc hai được phân tích và vẽ đồ thị bằng phần mềm Design Expert 7.0.0. Trục x và y đáp ứng bề mặt 3D thể hiện sự tương tác của các tham số quy trình, bao gồm sự tương tác của Cell/Xyl và AE (CDH, 50 U g⁻¹); Cell/Xyl và CDH (AE, 35 U g⁻¹); AE và CDH (Cell/Xyl, 18 U g⁻¹). Có thể nhận ra rằng tương tác hai chiều ảnh hưởng đến tất cả các hàm mục tiêu theo thứ tự giảm dần AB>BC>AC. Điều này phù hợp với ảnh hưởng giảm dần của các tham số đơn lẻ theo thứ tự B>A>C (tương ứng các biến được mã hóa lần lượt là AE, Cell/Xyl và CDH) như thể hiện trong các phương trình bậc hai, Bảng 3.7.

Tối ưu hóa và xác minh mô hình hàm mong muốn được sử dụng để tối ưu hóa hàm mục tiêu sau quá trình xúc tác enzyme với kỳ vọng Y₁, Y₂, và Y₃ có thể đạt giá trị cực đại. Kết quả là, 10 tùy chọn thử nghiệm đã được xác định, trong đó phương án tốt nhất để tối đa hóa hàm mục tiêu được dự đoán. Các giá trị thử nghiệm này được so sánh với các giá trị dự đoán để xác nhận tính hợp lệ của mô hình. Sự khác biệt giữa các giá trị hàm mục tiêu lý thuyết và thực nghiệm là không đáng kể. Điều này một lần nữa khẳng định mô hình xây dựng phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Sau khi tối ưu hóa ba biến phụ thuộc, các yếu tố tối ưu được xác định là 19,2 U g⁻¹ đối với Cell/Xyl, 38,8 U g⁻¹ đối với AE và 52,8 U g⁻¹ đối với CDH sau khi ủ cơ chất trong 48 giờ ở điều kiện 45°C và pH 5,0. Theo đó, các hàm mục tiêu được xác định là 165,18±3,19; 64,21±1,22 và 5,17±0,13 (mg g⁻¹) tương ứng với lượng (sản phẩm/cơ chất, w/w) là các đường C-5, C-6 (glucose, xylose) và gluconic axit.

Bảng 3.8. Giá trị của biến độc lập và biến thực.

Biến mã			Biến thực		
A	B	C	Cell/xyl	AE	CDH (U g ⁻¹)
0,2	0,38	0,28	19,2	38,8	52,8

Bảng 3.9. Giá trị đáp ứng và thực nghiệm nghiệm thu được ở điều kiện tối ưu.

Các biến phụ thuộc	Giá trị tối ưu	
	Thực nghiệm	Dự đoán lý thuyết
Y ₁ – Glucose (mg g ⁻¹)	165,18 ± 3,19	165,69
Y ₂ – Xylose (mg g ⁻¹)	64,21 ± 1,22	65,57
Y ₃ – Axit gluconic (mg g ⁻¹)	5,17 ± 0,13	5,26

Trong nghiên cứu này, áp dụng mô hình tối ưu thực nghiệm đã xác định được các điều kiện tối ưu của hỗn hợp “enzyme cocktail” (CDH, LsAE, và Cell/Xyl) trong chuyển hóa cơ chất rơm rạ nhằm nâng cao hiệu quả cho quá trình tạo thành các đường đơn C-5, C-6 (glucose, xylose). Một lần nữa khẳng định “enzyme cocktail” giúp cho quá trình thủy phân polysaccharide thành các mono và dimer xảy ra dễ dàng hơn, nhờ có các enzyme tiên phong (CDH & AE) mà enzyme chính Cell/Xyl dễ dàng bẻ gãy các polymer thành những phân tử oligosaccharide có mức độ trùng hợp nhỏ hơn trước khi Cell/Xyl hoàn tất quá trình chuyển hóa.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu của luận án có thể rút ra những kết luận sau:

1. Phân lập 56 chủng nấm thuộc Basidiomycota và Ascomycota, sàng lọc hoạt tính enzyme chuyển hóa lignocellulose: 38 chủng biểu hiện hoạt tính acetyl esterase (AE), 25 chủng biểu hiện hoạt tính lignin peroxidase (LiP), 35 chủng biểu hiện hoạt tính cellobiose dehydrogenase (CDH), 31 chủng biểu hiện hoạt tính enzyme laccase (Lac), 24 chủng biểu hiện hoạt tính enzyme unspecific peroxygenase (UPO). Các chủng hoạt tính cao được xác định đến loài cho nghiên cứu tiếp theo, bao gồm: MPN12 (hoạt tính AE và

LiP lần lượt 3.650,8 U/L và 39,3 U/mL), MPG14 (CDH, 77,4 U/L), MPN18 (Lac, 7.659 U/L), và CP22 (UPO, 41,2 U/mL).

2. Tinh sạch và xác định đặc tính hóa-lý (khối lượng phân tử, hoạt tính riêng, độ bền, điều kiện xúc tác tối ưu) và đặc hiệu cơ chất của 5 enzyme, gồm: AE và LiP từ *Lentinus squarrosulus* MPN12 (ký hiệu LsAE, 41,4 kDa; và LsLiP, 53 kDa); CDH từ *Coprinellus aureogranulatus* MPG14 (CauCDH, 109 kDa); Lac từ *Pleurotus pulmonarius* MPN18 (PleuLac, 35 kDa); và UPO từ *Candolleomyces eurypous* CP22 (CeUPO, 40 kDa).

3. Ứng dụng enzyme trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose: LsLiP xúc tác chuyển hóa lignin cho thấy thay đổi đáng kể cấu trúc ở vùng 1600–1000 cm^{-1} khi phân tích phổ FTIR. Tối ưu hóa xúc tác chuyển hóa sinh khối rom bằng hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”: CDH, AE, và Cell/Xyl) thành các sản phẩm chính gồm đường đơn C-5, C-6 (glucose, xylose) và axit gluconic. Mô hình tối ưu có độ tương hợp cao, với hoạt độ enzyme tối ưu được đề xuất là tỷ lệ (Cell/Xyl: AE: CDH) tương ứng 19,2: 38,8: 52,8 (U/g).

KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng rất lớn về nguồn sinh học nấm ở nước ta cho sinh tổng hợp các enzyme chuyển hóa sinh khối lignocellulose. Các chủng nấm đã được phân lập và định danh, mở ra tiềm năng khai thác hoạt tính của chúng trên các enzyme đích như lignin peroxidase, laccase, acetyl esterase, cellobiose dehydrogenase, và unspecific peroxygenase. Vì vậy, chúng tôi kiến nghị tiếp tục hướng nghiên cứu không chỉ khai thác các enzyme mới mà còn tối ưu hóa hỗn hợp enzyme nhằm nâng cao hiệu quả chuyển hóa sinh khối lignocellulose. Điều này sẽ cần được thực hiện ở quy mô pilot và lớn hơn, giúp đánh giá tính khả thi trong việc áp dụng công nghệ này vào sản xuất công nghiệp.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Do Huu Nghi, Harald Kellner, Enrico Büttner, Le Mai Huong, Le Xuan Duy, Vu Dinh Giap, **Dang Thu Quynh**, Tran Thi Nhu Hang, An Verberckmoes, Ludo Diels, Christiane Liers and Martin Hofrichter. Cellobiose dehydrogenase from the agaricomycete *Coprinellus aureogranulatus* and its application for the synergistic conversion of rice straw. Appl Biol Chem, 2021, 64-66. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00637-y>.
2. Dinh Giap Vu, Huu Nghi Do, Huu Cuong Le, **Thu Quynh Dang**. Lignin peroxidase from the white-rot fungus *Lentinus squarrosulus* MPN12 and its application in the biodegradation of synthetic dyes and lignin. BioResources, 2022, 17.3. Doi: 10.15376/biores.17.3.4480-4498.
3. Vũ Đình Giáp, **Đặng Thu Quỳnh**, và Đỗ Hữu Nghị. Sàng lọc và nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp lignin peroxidase (LIP) từ nấm trên môi trường lên men lỏng. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 19(4):771-778. Doi: 10.15625/1811-4989/15738.
4. **Dang Thu Quynh**, Nguyen Huy Hoang, Nguyen Ngoc Lan, Le Viet Hoang, Do Huu Nghi. Cloning, Expression, and Characterization of a Laccase from the White Rot Fungi *Pleurotus pulmonarius* MPN18. VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology, 2023. Doi: <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5312>.
5. Vũ Đình Giáp, **Đặng Thu Quỳnh**, và Đỗ Hữu Nghị. Sàng lọc hoạt tính enzyme carbohydrate esterase và oxidase từ nấm phân lập tại Cúc Phương (Ninh Bình) và Mùòng Phăng (Điện Biên). Proceedings of the 3rd national scientific conference of Vietnam Museum system, 2021.
6. Đỗ Hữu Nghị, **Đặng Thu Quỳnh**, Enrico Büttner, Christiane Liers, Harald Kellner, Martin Hofrichter. Nghiên cứu hệ enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm *Candolleomyces euryspous* và tinh chế thu nhận, xác định một số đặc tính của uspecific proxygenase từ nấm. Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2023.