

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội – 2025

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ



Nguyễn Thị Trung

Người hướng dẫn 1

PGS. TS. Đỗ Hữu Nghị

Người hướng dẫn 2

TS. Nguyễn Ngọc Lan

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “Nghiên cứu thu nhận và đặc tính một số enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm Việt Nam” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Nghiên cứu này bao gồm một phần kết quả của đề tài cấp quốc gia: “Nghiên cứu phát hiện và khai thác một số enzyme chuyển hóa hiệu quả lignocellulose từ nấm Việt Nam trên cơ sở ứng dụng genomics và secretomics” (NĐT.45.GER/18) mà tôi là thành viên tham gia chính. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 15 tháng 08 năm 2025

Tác giả luận án



Đặng Thu Quỳnh

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin được bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc của mình tới PGS.TS. Đỗ Hữu Nghị, Viện Hóa học – Viện Hàn lâm KHCNVN và TS. Nguyễn Ngọc Lan, Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein – Đại học Y Hà Nội, đã tận tình định hướng nghiên cứu, hướng dẫn, sửa luận án và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành được bản luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới tập thể Phòng Sinh học thực nghiệm – Viện Hóa học, phòng Hệ gen học chức năng – Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN đã chỉ bảo và giúp đỡ tận tình cho tôi trong thực nghiệm và chuyên môn.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban Giám đốc, tập thể những cán bộ giảng viên Khoa Công nghệ sinh học, phòng đào tạo Học viện, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo nhiều điều kiện thuận lợi trong quá trình thực hiện luận án.

Nội dung nghiên cứu của đề tài luận án được hỗ trợ kinh phí từ Đề tài Nghị định thư Việt Nam - CHLB Đức, mã số: NDT.45.GER/18 do PGS.TS. Đỗ Hữu Nghị làm chủ nhiệm. Tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Martin Hofrichter, Phó Hiệu trưởng Trường quốc tế Zittau - Đại học công nghệ Dresden, CHLB Đức (TUD-IHIZ) đã giúp đỡ tận tình trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Cuối cùng là cảm ơn tới người thân trong gia đình, bạn bè đã giúp đỡ và động viên tôi trong thời gian thực hiện luận án.

Hà Nội, ngày 15 tháng 08 năm 2025

Tác giả luận án



Đặng Thu Quỳnh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC HÌNH.....	x
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tổng quan về lignocellulose	4
1.1.1. Cấu trúc lignocellulose.....	4
1.1.2. Trữ lượng lignocellulose	8
1.1.3. Vai trò của lignocellulose trong phát triển kinh tế sinh học	10
1.2. Một số enzyme chuyển hóa lignocellulose và nguồn sinh tổng hợp enzyme	12
1.2.1. Nhóm enzyme oxy hóa	13
1.2.1.1. Laccase	13
1.2.1.2. Lignin peroxidase.....	15
1.2.1.3. Unspecific peroxygenase	16
1.2.1.4. Cellobiose dehydrogenase.....	17
1.2.2. Nhóm enzyme thủy phân	19
1.2.2.1. Họ glycoside hydrolase	19
1.2.2.2. Họ carbohydrate esterase	21
1.2.3. Xúc tác hiệp đồng bởi hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”) trong chuyển hóa hiệu quả vật liệu lignocellulose.	25
1.3. Tình hình nghiên cứu và đặc điểm enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm.....	27
1.3.1. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	27
1.3.2. Đặc điểm enzyme từ nấm.....	30
1.4. Sơ lược về <i>Lentinus squarrosulus</i> , <i>Coprinellus aureogranulatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> và <i>Candolleomyces eurysporus</i>	32
1.5. Sơ lược tình hình nghiên cứu nấm lớn ở Việt Nam.....	36
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
2.1. Nguyên vật liệu	39
2.1.1. Vật liệu và hóa chất.....	39

2.1.2. Thiết bị	40
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	40
2.2.1. Phân lập nấm	40
2.2.2. Định danh nấm	40
2.2.2.1. Định danh nấm bằng phương pháp hình thái giải phẫu	40
2.2.2.2. Định danh nấm bằng phương pháp sinh học phân tử	41
2.2.3. Nghiên cứu sinh tổng hợp enzyme từ nấm	42
2.2.4. Ảnh hưởng một số yếu tố đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp enzyme của các chủng nấm chọn lọc	42
2.2.4.1. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng nấm chọn lọc	42
2.2.4.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng của các chủng nấm chọn lọc.....	43
2.2.5. Phương pháp đo hoạt độ enzyme	43
2.2.5.1. Acetyl esterase (EC 3.1.1.6).....	43
2.2.5.2. Cellobiose dehydrogenase (EC 1.1.99.18).....	43
2.2.5.3. Laccase (EC 1.10.3.2)	44
2.2.5.4. Lignin peroxidase (EC 1.11.1.14).....	44
2.2.5.5. Unspecific peroxygenase (UPO, EC 1.11.2.1)	44
2.2.6. Tinh sạch enzyme tự nhiên	45
2.2.6.1. Tách chiết dịch enzyme thô bằng siêu lọc	45
2.2.6.2. Tinh sạch protein enzyme bằng sắc ký lỏng (FPLC).....	45
2.2.6.3. Xác định nồng độ protein.....	47
2.2.6.4. Xác định độ sạch của enzyme bằng điện di gel polyacrylamide (SDS-PAGE)	47
2.2.7. Xác định đặc tính của enzyme tinh sạch.....	48
2.2.7.1. Xác định nhiệt độ và pH tối ưu của enzyme tinh sạch.....	48
2.2.7.2. Xác định độ bền nhiệt và độ bền pH của enzyme tinh sạch	48
2.2.7.3. Xác định hằng số động học xúc tác.....	49
2.2.8. Xúc tác chuyển hóa sinh học vật liệu lignin	49
2.2.9. Xúc tác chuyển hóa sinh học vật liệu rơm bằng “enzyme cocktail”	49
2.2.10. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).....	50
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)	50

2.2.12. Phân tích số liệu	51
2.2.13. Sơ đồ quá trình nghiên cứu	51
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	53
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	53
3.1.1. Phân lập nấm	53
3.1.2. Sàng lọc các chủng nấm sinh enzyme.....	54
3.1.3. Định danh các chủng phân lập có hoạt tính enzyme cao	59
3.1.3.1. Tách chiết DNA hệ gen và khuếch đại đoạn gen ITS.....	59
3.1.3.2. Giải trình tự ITS và xây dựng cây phát sinh chủng loài	59
3.2. Nghiên cứu tinh sạch và xác định đặc tính của các enzyme từ nấm lựa chọn..	63
3.2.1. Nghiên cứu tinh sạch các enzyme.....	64
3.2.1.1. Tinh sạch acetyl esterase từ <i>L. squarrosulus</i> MPN 12 (<i>LsAE</i>).....	64
3.2.1.2. Tinh sạch cellobiose dehydrogenase từ <i>C. aureogranulatus</i> MPG 14 (<i>CauCDH</i>)	66
3.2.1.3. Tinh sạch laccase từ <i>Pleurotus pulmonarius</i> MPN 18 (<i>PleuLac</i>)	68
3.2.1.4. Tinh sạch lignin peroxidase từ <i>L. squarrosulus</i> MPN 12 (<i>LsLiP</i>).....	70
3.2.1.5. Tinh sạch unspecific peroxygenase từ <i>Candolleomyces euryspous</i> CP22 (<i>CeuUPO</i>).....	71
3.2.2. Xác định đặc tính của enzyme	73
3.2.2.1. Đặc tính của acetyl esterase (<i>LsAE</i>) từ chủng nấm <i>Lentinus squarrosulus</i> MPN12	73
3.2.2.2. Xác định đặc tính của cellobiose dehydrogenase (<i>CauCDH</i>) từ <i>Coprinellus aureogranulatus</i> MPG14	74
3.2.2.3. Xác định đặc tính của laccase (<i>PleuLac</i>) từ chủng <i>Pleurotus pulmonarius</i> MPN18.....	76
3.2.2.4. Xác định đặc tính của lignin peroxidase (<i>LsLiP</i>) từ chủng <i>Lentinus squarrosulus</i> MPN12	77
3.2.2.5. Xác định đặc tính của unspecific peroxygenase (<i>CeuUPO</i>) từ chủng <i>Candolleomyces euryspous</i> CP22	78
3.2.3. Động học xúc tác của enzyme.....	79
3.2.3.1. Động học xúc tác của <i>LsAE</i>	79
3.2.3.2. Động học xúc tác của <i>CauCDH</i>	80

3.2.3.3. Động học xúc tác của <i>PleuLac</i>	81
3.2.3.4. Động học xúc tác của <i>LsLiP</i>	82
3.2.3.5. Động học xúc tác của <i>CeuUPO</i>	84
3.3. Nghiên cứu ứng dụng xúc tác sinh học enzyme trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose.	85
3.3.1. Nghiên cứu khả năng oxy hóa lignin bởi <i>LsLiP</i> từ nấm <i>L. squarrosulus</i> MPN12	85
3.3.2. Chuyển hóa sinh khối rơm bởi hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”) .	86
3.3.2.1. Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đơn đến hiệu quả chuyển hóa	86
3.3.2.2. Tối ưu hóa nồng độ enzyme tham gia chuyển hóa bằng quy hoạch thực nghiệm.....	89
3.3.2.3. Phân tích đáp ứng bề mặt và xác minh mô hình	93
CHƯƠNG IV: THẢO LUẬN	96
4.1. Khả năng sinh tổng hợp các enzyme của các chủng nấm.....	96
4.2. Đặc tính các enzyme từ các chủng nấm tiềm năng	98
4.2.1. Enzyme acetyl esterase từ <i>L. squarrosulus</i> MPN12 (<i>LsAE</i>)	98
4.2.2. Enzyme cellobiose dehydrogenase từ <i>C. aureogranulatus</i> MPG 14 (<i>CauCDH</i>)	100
4.2.3. Enzyme laccase từ <i>Pleurotus pulmonarius</i> MPN 18 (<i>PleuLac</i>)	101
4.2.4. Enzyme lignin peroxidase từ <i>L. squarrosulus</i> MPN 12 (<i>LsLiP</i>)	102
4.2.5. Enzyme unspecific peroxygenase từ <i>Candolleomyces euryspous</i> CP22 (<i>CeuUPO</i>).....	105
4.3. Xúc tác hiệp đồng bởi hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”) trong chuyển hóa hiệu quả vật liệu lignocellulose	107
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	113
KẾT LUẬN	113
KIẾN NGHỊ	114
DANH SÁCH CÔNG BỐ KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	115
TÀI LIỆU THAM KHẢO	116
PHỤ LỤC	a

DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AE	Acetyl esterase	Acetyl esterase
Asp	Aspartic acid	Axit aspartic
BLAST	Basic local alignment search tool	Công cụ so sánh chuỗi sinh học
bp	Base pair	Cặp base
CDH	Cellobiose dehydrogenase	Cellobiose dehydrogenase
Cell/Xyl	Carboxymethyl cellulase/ Glucuronoxylanase	Carboxymethyl cellulase/ Glucuronoxylanase
CE	Carboxylesterase	Carboxylesterase
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
EF	Isoelectric focusing	Điểm đẳng điện
FAE	Feruloyl esterase	Feruloyl esterase
FPLC	Fast protein liquid chromatography	Sắc ký lỏng protein nhanh
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
HRP	Horseradish peroxidase	Horseradish peroxidase
ITS	Internal transcribed spacer	Vùng phiên mã nội tại
kb	Kilo base	Nghìn base
kDa	Kilo dalton	Nghìn dalton
LiP	Lignin peroxidase	Lignin peroxidase
M	Marker	Thang (DNA, protein) chuẩn
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PDA	Potato dextrose agar	Môi trường thạch khoai tây
rpm	Revolutions per minute	Số vòng/phút
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di trên gel polyacrylamide SDS

XRD	X-ray diffraction	Nhiều xạ tia X
UPO	Unspecific peroxygenase	Unspecific peroxygenase
wt	Weight	Khối lượng

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần một số nguồn vật liệu giàu lignocellulose.....	4
Bảng 1.2. Sinh khối lignocellulose từ phụ phẩm nông-lâm nghiệp tại Việt Nam năm 2020	9
Bảng 3.1. Hoạt tính enzyme của những chủng nấm nghiên cứu.	55
Bảng 3.2. Tinh sạch enzyme <i>LsAE</i> từ dịch lên men <i>L. Squarrosulus</i> MPN12.	65
Bảng 3.3. Tinh sạch enzyme <i>CauCDH</i> từ dịch lên men <i>C. aureogranulatus</i> MPG14.	67
Bảng 3.4. Tinh sạch enzyme <i>PleuLac</i> từ dịch lên men <i>P. pulmonarius</i> MPN18.	69
Bảng 3.5. Tinh sạch enzyme <i>LsLiP</i> từ dịch lên men <i>L. squarrosulus</i> MPN12.	70
Bảng 3.6. Đặc hiệu cơ chất của enzyme <i>CauCDH</i>	81
Bảng 3.7. Các thông số động học xúc tác của <i>CeuUPO</i>	85
Bảng 3.8. Các biến độc lập và khoảng biến thiên của chúng.	90
Bảng 3. 9. Thiết kế thực nghiệm và các giá trị tương ứng.....	91
Bảng 3.10. Hệ số hồi quy của các mô hình đa thức bậc hai được dự đoán cho hàm lượng glucose (Y1), hàm lượng xylose (Y2) và hàm lượng axit gluconic (Y3)	92
Bảng 3.11. Mô hình phương trình đa thức bậc hai, hàm lượng glucose (Y1), xylose (Y2) và axit gluconic (Y3).....	92
Bảng 3.12. Giá trị của biến độc lập và biến thực.....	94
Bảng 3.13. Giá trị đáp ứng và thực nghiệm nghiệm thu được ở điều kiện tối ưu.....	95

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc lignocellulose	5
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của galactoglucomannan	7
Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của lignin	8
Hình 1.4. Một số enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa lignocellulose.	13
Hình 1.5. Mô tả vai trò của CDH trong chuyển hóa lignocellulose.	19
Hình 1.6. Hệ cellulase tham gia chuyển hóa mạch cellulose	21
Hình 1.7. Đích tác động của enzyme acetyl (xylan) esterase và feruloyl esterase.	22
Hình 1.8. Đích tác động của enzyme feruloyl esterase và các liên kết dạng cầu nối của axit ferulic và dimer với arabinoxylan và lignin.	24
Hình 1.9. Loài nấm <i>Lentinus squarrosulus</i>	33
Hình 1.10. Loài nấm <i>Coprinellus aureogranulatus</i>	34
Hình 1.11. Loài nấm <i>Pleurotus pulmonarius</i>	35
Hình 1.12. Loài nấm <i>Candolleomyces eurysporus</i>	36
Hình 2.1. Mẫu lignin sử dụng cho nghiên cứu chuyển hóa sinh học.....	39
Hình 2.2. Sơ đồ quá trình nghiên cứu các nội dung trong luận án.	52
Hình 3.1. Đặc điểm hình thái của loài mới <i>Candolleomyces eurysporus</i> , phân lập tại Cúc Phương. Hình bên trái: Quả thể nấm, Bar = 1 cm. Hình phải: A: Hệ sợi, B: Liệt bào đỉnh, C: Liệt bào cuống, D: Bào tử ba lỗ mầm. Bar = 50 μ m (A), 10 μ m (B-D).....	54
Hình 3.2. Điện di đồ phân tích DNA tổng số sau tách chiết (A), sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS của các chủng nấm trên gel agarose (B).	59
Hình 3.3. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm MPN12 với các loài trong chi <i>Lentinus</i> xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).....	60
Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm MPN18 với các loài/thứ trong chi <i>Pleurotus</i> xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).....	61
Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm MPG14 với các loài trong chi <i>Coprinellus</i> xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).....	62

Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm CP22 với các loài trong chi <i>Candolleomyces</i> xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).....	63
Hình 3.7 . Tinh sạch enzyme <i>LsAE</i> từ <i>L. squarrosulus</i> MPN 12 qua cột HiTrap™ Q XL. Trong đó: (—) độ hấp thụ ở $\lambda=280$ nm và (●) hoạt tính <i>LsAE</i>	64
Hình 3.8. Điện di đồ protein sau tinh sạch <i>LsAE</i>	65
Hình 3.9. Tinh sạch enzyme <i>CauCDH</i> từ <i>Coprinellus aureogranulatus</i> MPG14.	66
Hình 3.10. Điện di đồ protein sau tinh sạch <i>CauCDH</i>	67
Hình 3.11. Tinh sạch enzyme <i>PleuLac</i> từ <i>Pleurotus pulmonarius</i> MPN18 qua cột HiTrap™ Q XL.	68
Hình 3.12. Điện di đồ protein sau tinh sạch <i>PleuLac</i>	69
Hình 3.13. Tinh sạch <i>LsLiP</i> qua cột HiTrap™ Q XL	71
Hình 3.14. Điện di đồ protein sau tinh sạch <i>LsLiP</i>	71
Hình 3.15. Tinh sạch <i>CeuUPO</i> với cột Mono Q™.	72
Hình 3.16. Điện di đồ protein sau tinh sạch <i>CeuUPO</i>	73
Hình 3.17. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới hoạt tính của enzyme <i>LsAE</i> . .	74
Hình 3.18. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới hoạt tính của <i>CauCDH</i>	75
Hình 3.19. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới hoạt tính của <i>PleuLac</i>	77
Hình 3.20. Ảnh hưởng pH và nhiệt độ tới hoạt tính <i>LsLiP</i>	78
Hình 3.21. Ảnh hưởng pH tới hoạt tính <i>CeuUPO</i> đối với ABTS (A), veratryl alcohol (B) và 2,6-DMP (C).	79
Hình 3.22. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của <i>LsAE</i> đối với cơ chất <i>p</i> -nitrophenyl acetate.	80
Hình 3.23. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của <i>CauCDH</i> đối với cơ chất cellobiose.	81
Hình 3.24. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của <i>PleuLac</i> đối với cơ chất ABTS.	82
Hình 3.25. Đặc hiệu cơ chất của enzyme <i>LsLiP</i>	83
Hình 3.26. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của <i>LsLiP</i> đối với cơ chất DCP.	83

Hình 3.27. Động học xúc tác của <i>CeuUPO</i>	84
Hình 3.28. Phổ FTIR của các mẫu lignin. Đối chứng (đường màu đỏ) và sau khi xử lý với enzyme <i>LsLip</i> (đường màu đen).....	86
Hình 3.29. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng đơn yếu tố.....	89
Hình 3.30. Biểu đồ tương tác của các thông số của hiệu suất sản phẩm	94
Hình 3.31. Điều kiện tối ưu bằng giải pháp đường dốc.....	94
Hình 4.1. Cấu trúc tinh thể của LiP từ <i>P. chrysosporium</i> (PDB: 1LGA).....	104
Hình 4.2. Cấu trúc enzyme UPO (PDB ID: 2YOR từ loài nấm <i>Agrocybe aegerita</i> (https://www.rcsb.org)).....	107

MỞ ĐẦU

Sinh khối thực vật, nguồn carbohydrate tái tạo lớn nhất trên trái đất, được quang tổng hợp khoảng 200 tỷ tấn mỗi năm, trong đó lignocellulose chiếm tới 60%. Việt Nam có nguồn tài nguyên thực vật phong phú và sản lượng cây trồng dồi dào, tạo ra lượng lớn phụ phẩm nông-lâm nghiệp giàu lignocellulose như gỗ, rơm rạ, bã mía, mây tre... Tuy nhiên, chỉ một phần nhỏ trong số này được tái sử dụng, phần còn lại thường bị đốt hoặc thải bỏ, gây lãng phí và ô nhiễm môi trường. Lignocellulose có cấu trúc bền vững và phức tạp, thành phần chủ yếu là cellulose (35–50%), hemicellulose (15–30%) và lignin (10–25%), nhưng có thể tận dụng làm nguyên liệu cho các ứng dụng trong kinh tế sinh học và kinh tế tuần hoàn như sản xuất nhiên liệu sinh học và các hợp chất hữu cơ nền.

Để khắc phục những hạn chế của phương pháp hóa-lý (tiêu tốn năng lượng, hoá chất độc hại cho môi trường và sức khỏe con người), các phương pháp sinh học sử dụng vi sinh vật, nấm, và các enzyme của chúng cho chuyển hoá lignocellulose là hướng triển vọng, phù hợp với xu thế phát triển xanh. Nấm, đặc biệt là các loài thuộc nhóm Basidiomycota và Ascomycota, có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme thủy phân ngoại bào (như cellulase, xylanase, esterase...) và enzyme oxy hóa (như peroxidase, peroxygenase, phenol oxidase...). Khác với vi khuẩn, nấm có khả năng sinh tổng hợp các enzyme khử mạch, phân hủy lignin và chuyển hóa cellulose như lignin peroxidase (Lip), laccase (Lac), acetyl esterase (AE), cellobiose dehydrogenase (CDH) và unspecific peroxygenase (UPO) cao. Các enzyme này đóng vai trò quan trọng trong xúc tác phản ứng oxy hoá-khử cellulose vùng tinh thể, phá vỡ cấu trúc lignin, ... giúp các enzyme khác có thể tiếp cận và chuyển hóa lignocellulose giải phóng các đơn vị cấu trúc (*building blocks*) là các chất thơm và các hợp chất hữu cơ nền. Đây là nguồn nguyên liệu thiết yếu cho các ứng dụng công nghiệp, bao gồm sản xuất nhiên liệu sinh học, hóa chất tinh chế hay vật liệu sinh học, đáp ứng yêu cầu phát triển kinh tế tuần hoàn và bảo vệ môi trường. Hơn nữa, enzyme từ nấm thường có hoạt tính cao ngay cả trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt như pH thấp, nhiệt độ cao, điều mà enzyme từ vi khuẩn thường khó đạt được. Với ưu thế sinh tổng hợp đa dạng và số lượng lớn các enzyme ngoại bào, enzyme từ nấm có những

thuận lợi khi tối ưu quy trình tinh chế, thu nhận cho sản xuất ở quy mô công nghiệp. Với tính cấp thiết, ý nghĩa và tiềm năng trên đây, đề tài luận án **“Nghiên cứu thu nhận và đặc tính một số enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm Việt Nam”** được thực hiện và hoàn thành với mục tiêu và những nội dung nghiên cứu sau:

❖ **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, 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 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:**

- Xây dựng bộ sưu tập gồm 56 chủng nấm thuộc ngành nấm đảm Basidiomycota và nấm túi Ascomycota, phát hiện loài mới *Candolleomyces eurysporus* (thuộc họ Psathyrellaceae, bộ Agaricales);
- Tinh sạch 05 enzyme acetyl esterase, lignin peroxidase từ *Lentinus squarrosulus* MPN12; Cellobiose dehydrogenase từ *Coprinellus aureoconulus* MPG14; Laccase từ *Pleurotus pulmonarius* MPN18 và unspecific peroxygenase từ *Candolleomyces eurysporus* CP22; Xác định đặc tính, đặc hiệu cơ chất và động học xúc tác của enzyme.
- Tối ưu enzyme cocktail để xúc tác chuyển hoá sinh khối lignocellulose (rơm) thành các đơn vị đường glucose, xylose 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 (rơm, 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).

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

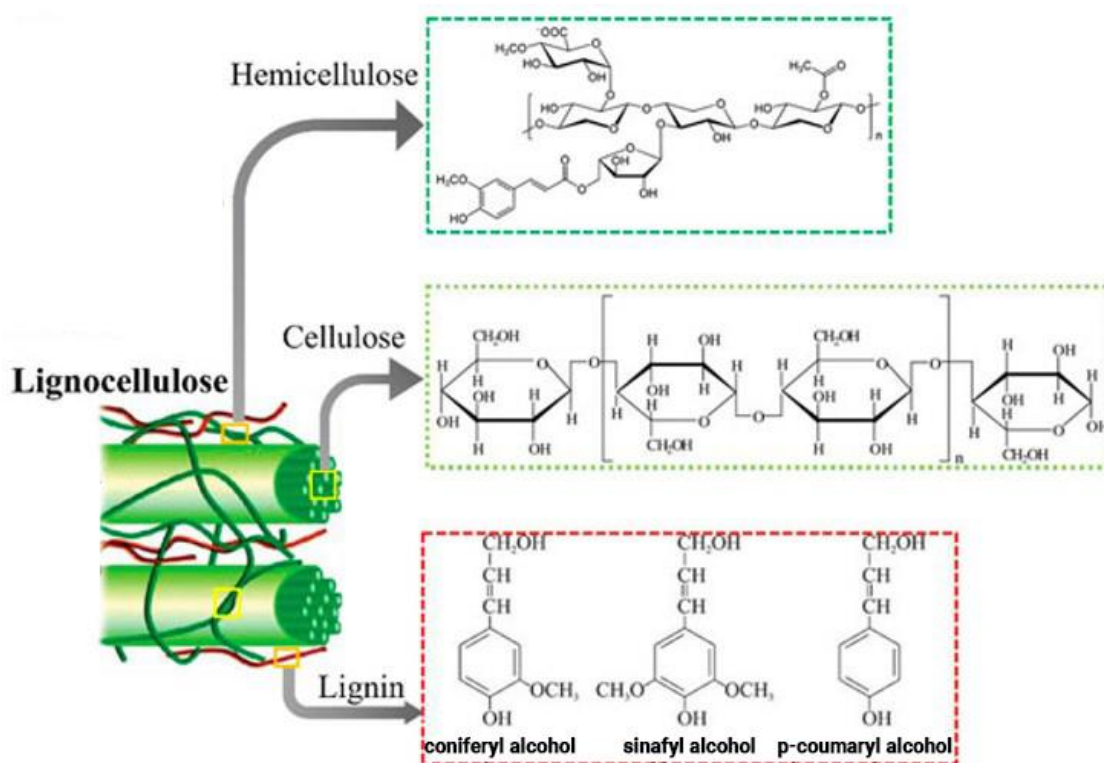
1.1. Tổng quan về lignocellulose

1.1.1. Cấu trúc lignocellulose

Lignocellulose là một polymer có cấu trúc phức tạp và bền vững, được tìm thấy trong thành tế bào của thực vật. Thành phần của nó bao gồm ba hợp phần chính: cellulose, hemicellulose, và lignin (Hình 1.1) [1, 2]. Cellulose chiếm khoảng 40–50% trọng lượng khô của lignocellulose, trong khi hemicellulose chiếm 20–40% và lignin chiếm 20–35% [3]. Thành phần cấu trúc của lignocellulose thay đổi tùy thuộc vào nguồn gốc. Ví dụ, trong gỗ cứng, cellulose chiếm khoảng 45–47%, trong khi ở rơm lúa mì chỉ chiếm khoảng 30%. Hemicellulose chiếm 35–50% ở các loại cỏ, nhưng chỉ chiếm 25% trong rơm rạ. Tương tự, hàm lượng lignin cũng có sự khác biệt lớn: ở gỗ mềm, lignin chiếm 30–60%, nhưng trong bột giấy, hàm lượng này giảm xuống chỉ còn khoảng 6–10% (Bảng 1.2). Điều này cho thấy, sự đa dạng về nguồn gốc lignocellulose không chỉ ảnh hưởng đến tỷ lệ các thành phần chính mà còn tác động đến các tính chất vật lý và hóa học của chúng. Các đặc điểm này đóng vai trò quan trọng trong việc lựa chọn nguyên liệu đầu vào và điều chỉnh quy trình xử lý để tận dụng hiệu quả lignocellulose trong các ứng dụng khác nhau, chẳng hạn như sản xuất nhiên liệu sinh học, vật liệu composite hoặc hóa chất sinh học.

Bảng 1.1. Thành phần một số nguồn vật liệu giàu lignocellulose [3].

Nguồn Lignocellulose	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Gỗ cứng	45-47	25-40	20-25
Gỗ mềm	40-45	25-29	30-36
Cỏ	25-40	35-50	-
Bã mía	40	24	25
Lõi ngô	45	35	15
Rơm rạ	35	25	12
Bột giấy	50-70	12-20	6-10
Rơm lúa mì	30	50	20



Hình 1.1. Cấu trúc lignocellulose [4].

Cellulose là một polymer có dạng mạch thẳng có công thức là $(C_6H_{10}O_5)_n$, được cấu tạo từ các đơn phân tử đường D-glucose có số lượng lên tới hơn 8000-12000 đơn vị, liên kết với nhau bởi liên kết β -1,4- glucoside (Hình 1.2) [5-7]. Mức độ trùng hợp của cellulose có thể đạt 10.000-14.000 đơn vị glucose trên phân tử, đạt khối lượng tương ứng là 1,5 triệu dalton với chiều dài phân tử có thể lớn hơn hoặc bằng 5 m [8]. Giữa các chuỗi cellulose có nhiều gốc -OH tạo thành rất nhiều liên kết hydro giúp sợi cellulose có cấu trúc chắc chắn, rất bền và khó thủy phân.

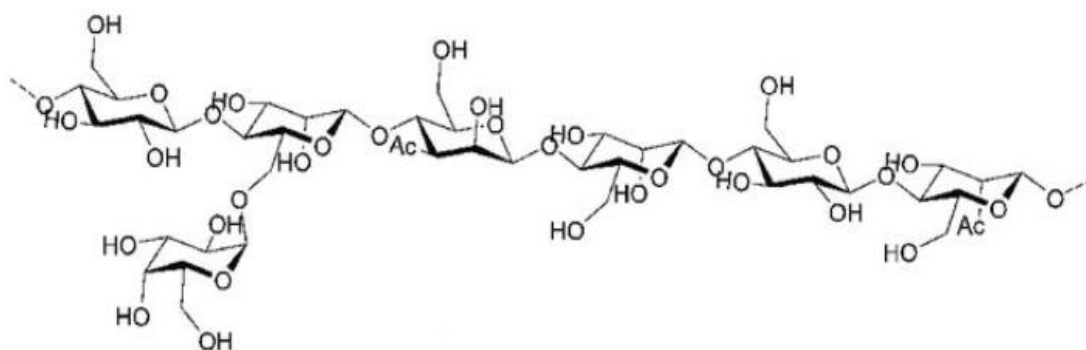
Các sợi cellulose kết hợp với nhau rất chặt chẽ, hình thành nên vùng có cấu trúc tinh thể. Tuy nhiên, cũng có một số sợi cellulose kết hợp với nhau một cách ngẫu nhiên tạo thành vùng có cấu trúc vô định hình [9]. Do đó, các dung môi hóa học rất khó để có thể xâm nhập vào vùng tinh thể này. Mặt khác, cellulose được bao bọc bởi hemicellulose và lignin, do vậy cellulose khá bền vững dưới tác động của hóa chất [8].

Hemicellulose là một loại polysaccharide có cấu trúc không đồng nhất và phức tạp, bao gồm các đơn vị đường như D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-xylose và L-arabinose [10-12]. Thành phần chính của hemicellulose là β -D-xylopyranose, được liên kết với nhau thông qua liên kết

β -1,4-glucoside. Cấu trúc của hemicellulose rất đa dạng và thay đổi tùy theo nguồn nguyên liệu. Mạch chính của hemicellulose hình thành từ các liên kết β -1,4-glucoside, trong đó xylose đóng vai trò thành phần quan trọng nhất. Nhóm thế phổ biến nhất là nhóm acetyl-O, thường gắn vào vị trí 2 hoặc 3 trên mạch chính. Các mạch nhánh của hemicellulose thường được tạo thành từ các đơn vị disaccharide hoặc trisaccharide, giúp nó liên kết với các polysaccharide khác và lignin. Hemicellulose có cấu trúc phân nhánh và vô định hình, làm cho nó ít cứng hơn và kém bền vững hơn so với cellulose, nhưng đặc tính này lại giúp nó dễ phân hủy và xử lý hơn trong các quá trình sinh học hoặc hóa học.

Tùy theo từng loại gỗ (gỗ cứng hay gỗ mềm) mà hemicellulose của chúng có đặc điểm cấu tạo khác nhau. Gỗ cứng được cấu tạo bởi chủ yếu hai loại hemicellulose. Loại thứ nhất là acetyl-4-O-methylglucuronoxylan, một loại polymer có mạch chính được tạo thành từ β -D xylopyranose liên kết với nhau bằng liên kết β -D xylopyranose (1,4). Trong đó 70% các nhóm -OH ở vị trí C2 và C3 bị acetyl hóa, và 10% các nhóm ở vị trí C2 liên kết với axit 4-O-methyl-D-glucuronic. Loại thứ hai có mạch chính là β -D-galactopyranose, hình thành liên kết -O tại nhóm OH ở vị trí C6 với α -L-arabinose, β -D-galactose hoặc axit β -D-glucuronic [13]. Gỗ cứng còn chứa glucomannan, polymer này được cấu tạo bởi β -D-glucopyranose và β -D-mannopyranose. Gỗ mềm cũng bao gồm hai loại hemicellulose chính. Loại quan trọng nhất là galactoglucomannan, được cấu thành từ các phân tử D-mannopyranose liên kết với D-glucopyranose bằng liên kết β -(1,4) với tỉ lệ hai monomer tương ứng là 3:1 (Hình 1.2). Tuy nhiên, tùy từng loại gỗ mà tỉ lệ này có thể bị thay đổi. Loại hemicellulose thứ hai là arabino-4-O-methylglucuronoxylan, có cấu tạo từ các D-xylopyranose. Những monomer này bị thay thế ở vị trí 2 bằng axit 4-O-methyl-glucuronic, ở vị trí 3 bằng α -larabinofuranose [14].

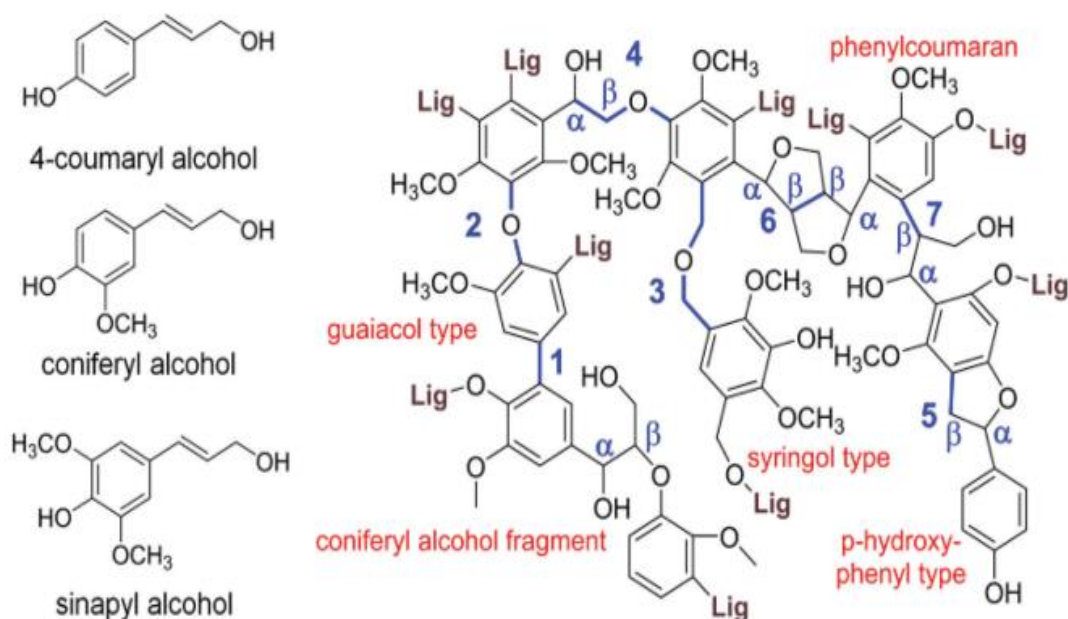
Ở cỏ, khoảng 20-40% hemicellulose cấu tạo từ arabinoxylan, chúng có thành phần chủ yếu từ các D-xylopyranose, ở vị trí C2, OH bị thay thế bởi axit 4-O-methylglucuronic, ở vị trí C3 sẽ tạo mạch nhánh với α -L-arabinofuranose. Do vậy hemicellulose có cấu tạo phức tạp tạo cho các loài thực vật có nhiều tính chất hóa sinh và lý sinh [13].



Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của galactoglucomannan [15].

Lignin là polymer có cấu trúc bền vững, được cấu thành từ các đơn vị phenylpropene: guaiacyl (G), syringyl (S) và *p*-hydroxyphenyl (H) [16, 17]. Lignin là một hợp chất cao phân tử cấu trúc vô định hình, có chứa các nhóm hydroxyl (-OH), nhóm methoxyl (-OCH₃) và nhân benzen, bao gồm các đơn vị cơ bản: coniferyl alcohol, sinapyl alcohol và *p*-coumaryl alcohol, tỉ lệ ba nhóm alcohol này là khác nhau trong mỗi loại thực vật (Hình 1.3). Do cấu thành từ những phân tử được nối với nhau bởi các liên kết este và liên kết carbon, tạo thành một mạng lưới liên kết ngang bền vững và rộng rãi trong các tế bào của thực vật, vậy nên lignin đặc biệt khó phân hủy [13]. Cấu trúc của lignin rất đa dạng, tùy thuộc vào loại gỗ (gỗ mềm và gỗ cứng). Gỗ mềm thành phần chủ yếu là guaiacyl, trong khi đó gỗ cứng chứa chủ yếu là syringyl. Nghiên cứu chỉ ra rằng guaiacyl hạn chế sự trương nở của xơ sợi hơn là syringyl, vì vậy loại nguyên liệu này khó bị phân hủy bởi enzyme hơn.

Nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng, cấu trúc của lignin hoàn toàn không đồng nhất. Lignin bao gồm các vùng vô định hình, vùng có cấu trúc hình thoi hoặc hình cầu. Lignin có liên kết hóa học chặt chẽ với các thành phần của hemicellulose và cellulose, độ bền của những liên kết này phụ thuộc vào những đơn vị đường tham gia liên kết. C_α trong cấu trúc phenyl propane có khả năng tạo liên kết bền chặt nhất với khối hemicellulose. Trong khi đó, các loại đường nằm ở mạch nhánh của hemicellulose như galactose, arabinose và axit 4-O-methylglucuronic là nhóm thường liên kết với lignin, tạo thành các liên kết hóa học hoặc tương tác thông qua cầu nối hydro hoặc liên kết ester với lignin.



Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của lignin [18].

Cấu trúc hóa học của lignin dễ bị phá vỡ ở nhiệt độ cao và pH thấp, như quá trình xử lý bằng hơi nước hoặc ở môi trường axit và kiềm [19]. Ở nhiệt độ cao hơn 200°C, lignin bị kết khối tạo thành những phần riêng biệt và bị tách ra khỏi cellulose [20, 21].

1.1.2. Trữ lượng lignocellulose

Sinh khối lignocellulose ngày càng đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy phát triển nền kinh tế sinh học, đặc biệt khi được sử dụng làm nguyên liệu thô cho các ứng dụng trong công nghệ sinh học và công nghiệp. Dựa trên nguồn gốc, thành phần và mức độ polymer hóa, lignocellulose có thể được phân loại thành các nhóm chính, bao gồm: từ cây gỗ cứng, gỗ mềm, và các loại cây trồng (đặc biệt là cây ngũ cốc, các loại cỏ) cũng như cây thảo. Với lợi thế là một quốc gia có nền nông nghiệp và lâm nghiệp phát triển từ lâu đời, Việt Nam sở hữu nguồn nguyên liệu lignocellulose phong phú. Mỗi năm, hàng trăm triệu tấn sinh khối này được tạo ra từ các hoạt động sản xuất nông-lâm nghiệp [22, 23]. Các nguồn sinh khối lignocellulose chính ở Việt Nam được tổng hợp trong Bảng 1.1 [24].

Bảng 1.2. Sinh khối lignocellulose từ phụ phẩm nông-lâm nghiệp tại Việt Nam năm 2017 [24].

Nguồn	Khối lượng (triệu tấn/năm)
Rơm rạ	61,9
Trấu	5,6
Lõi ngô	4,8
Phế thải trồng mía	1,5
Bã mía	5,0
Lá và xơ dừa	5,8
Thân cây mì	4,6
Rừng tự nhiên	6,8
Rừng trồng	3,7
Đất không rừng	3,9
Cây trồng phân tán	6,1
Cây công nghiệp và cây ăn quả	2,4
Phế liệu gỗ	1,6

Rơm rạ là nguồn lignocellulose phụ phẩm nông nghiệp lớn nhất, ước tính đạt 61,9 triệu tấn mỗi năm (chiếm 54,4%), tiếp theo là trấu với 5,6 triệu tấn và bã mía với 5 triệu tấn (Bảng 1.1). Mặc dù các nguồn lignocellulose khác không dồi dào như rơm rạ, chúng vẫn đóng góp đáng kể. Phần lớn phụ phẩm nông nghiệp sau thu hoạch chỉ được tái sử dụng một phần, trong khi phần còn lại thường bị phân hủy tự nhiên hoặc xử lý bằng các phương pháp truyền thống như làm thức ăn gia súc, ủ phân compost, hoặc đốt bỏ. Những cách xử lý này không chỉ hiệu quả thấp mà còn gây lãng phí một lượng lớn các chất hữu cơ có giá trị. Tuy nhiên, nếu được khai thác và sử dụng hợp lý, các nguồn phụ phẩm này có thể mang lại lợi ích to lớn. Điều này đã mở ra ý tưởng tận dụng các nguồn tài nguyên tái tạo phong phú để nghiên cứu và phát triển các sản phẩm sinh học, đáp ứng nhu cầu hiện tại và tương lai của con người, đồng thời góp phần đảm bảo an ninh lương thực, bảo vệ môi trường và bảo tồn tài nguyên thiên nhiên. Ví dụ, các phụ phẩm này có thể được sử dụng để sản xuất nhiên liệu sinh học và hóa chất [25]. Việc ứng dụng phụ phẩm

nông nghiệp trong các quá trình sinh học không chỉ tạo ra các sản phẩm có giá trị mà còn góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường, đặc biệt quan trọng đối với các quốc gia đang phát triển như Việt Nam.

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, dưới đây là những điểm nổi bật đáng kể đến [26, 27].

Tạo ra nguyên liệu tái tạo giá trị cao: Thứ nhất phải kể đến đó là sản xuất nhiên liệu sinh học như ethanol sinh học thế hệ thứ hai. Lignocellulose từ các phụ phẩm nông nghiệp (rơm, bã mía, vỏ trấu...) có thể được thủy phân thành đường đơn, các loại đường này được lên men chuyển hóa thành ethanol sinh học, giảm phát thải khí nhà kính so với nhiên liệu hóa thạch [28, 29]. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc thủy phân cơ chất lignocellulose. Andreza và cộng sự (2018) đã mô tả chi tiết về ứng dụng chuyển hóa sinh khối lignocellulose, cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho sự phát triển của ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học [30]. Nghiên cứu của Marknoah (2021) cho thấy hiệu suất tạo glucose từ quá trình thủy phân bã mía tăng đáng kể sau 72 giờ và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất bioethanol [31]. Từ các kết quả nghiên cứu đã được công bố, có thể thấy rằng việc chuyển hóa sinh khối lignocellulose để tạo ra ethanol sinh học thế hệ thứ hai là một hướng đi đầy tiềm năng, đặc biệt trong ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học. Ngoài ethanol, các loại nhiên liệu sinh học khác như biodiesel và biogas cũng nhận được sự quan tâm lớn. Biodiesel là một loại nhiên liệu thân thiện với môi trường, có thể được sử dụng thay thế hoặc pha trộn với dầu diesel thông thường, góp phần giảm phát thải khí độc hại như SO_2 và CO_2 [32]. Trong khi đó, biogas như khí metan (CH_4), có thể được khai thác để sản xuất điện hoặc sử dụng làm nhiên liệu cho các phương tiện giao thông [33].

Ngoài ra, sản phẩm hóa chất sinh học cũng nguyên liệu tái tạo quan trọng trong các ngành công nghiệp. Lignocellulose là nguồn nguyên liệu để sản xuất các hóa chất sinh học như furfural, axit levulinic, xylitol và các monomer sinh học. Những hóa chất này là các thành phần chính trong sản xuất nhựa sinh học, dung môi, dược phẩm và các sản phẩm công nghiệp khác

[4, 27]. Gần đây, tác giả Yeong Wu và cộng sự (2020) đã nghiên cứu và tối ưu hóa các điều kiện phản ứng để chuyển đổi sinh khối lignocellulose thành furfural với hiệu suất cao và chi phí thấp, mở ra tiềm năng trở thành một giải pháp thay thế bền vững cho các sản phẩm hóa dầu hiện nay [34]. Hướng đi này được xem là một bước tiến quan trọng trong nỗ lực giảm thiểu tác động môi trường của các ngành công nghiệp dựa vào hóa dầu, đồng thời tận dụng nguồn nguyên liệu sinh khối sẵn có và phong phú. Sự kết hợp giữa nghiên cứu khoa học và công nghệ sản xuất sẽ là chìa khóa để phát triển các giải pháp hóa chất bền vững, đáp ứng nhu cầu của xã hội hiện đại.

Thúc đẩy kinh tế tuần hoàn: Việc tái sử dụng chất thải nông nghiệp và công nghiệp, tận dụng phế phẩm như rơm rạ, bã mía, vỏ trấu, và mùn cưa không chỉ giúp giảm ô nhiễm môi trường mà còn tối ưu hóa việc sử dụng tài nguyên sinh học. Ngoài ra, lignocellulose sau quá trình chuyển hóa có thể được xử lý để sản xuất phân bón hữu cơ, góp phần cải thiện độ phì nhiêu của đất nông nghiệp và nâng cao hiệu quả sử dụng tài nguyên, qua đó thúc đẩy kinh tế tuần hoàn. Mới đây, Grzegorz và cộng sự (2024) đã nghiên cứu quá trình chuyển hóa sinh khối lignocellulose thành phân bón giàu dinh dưỡng. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh tiềm năng vượt trội của phân bón lignocellulose so với phân bón truyền thống trong việc thúc đẩy tăng trưởng cây trồng, cải thiện đất, và giảm thiểu thất thoát chất dinh dưỡng [35].

Đẩy mạnh nghiên cứu và đổi mới công nghệ: Quá trình chuyển hóa lignocellulose đòi hỏi sự ứng dụng các công nghệ tiên tiến sử dụng enzyme thủy phân và oxy hóa, hoặc vi sinh vật tái tổ hợp [36, 37]. Điều này không chỉ thúc đẩy sự phát triển của ngành công nghệ sinh học mà còn tạo việc làm và nâng cao năng lực khoa học. Trong những năm gần đây, nhiều nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu phát triển các enzyme và chủng vi sinh vật mới nhằm tối ưu hóa quá trình chuyển hóa lignocellulose. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu tiêu biểu đã đạt được những kết quả đáng chú ý. Chẳng hạn, tác giả Nguyễn Thị Xuân Sâm (Đại học Bách khoa Hà Nội) đã tinh sạch enzyme β -glucosidase từ nấm *Aspergillus niger* để thủy phân bã mía [38]. Tác giả Đặng Tất Thành (Viện Công nghệ Thực phẩm, Hà Nội) đã tiến hành phân lập và đánh giá đặc tính của chủng *A. brunneoviolaceus* có khả năng sinh tổng hợp hệ enzyme thủy phân lignocellulose [39]. Ngoài ra, trên thế giới, các nghiên

cứu về enzyme liên quan đến chuyển hóa lignocellulose cũng không ngừng mở rộng. Ví dụ, Zhichao Deng và cộng sự (2019) đã phân tích đặc tính và vai trò của enzyme laccase trong việc chuyển hóa lignin từ phế thải lúa mì [40]. Nghiên cứu của Raulo và cộng sự (2021) mô tả chi tiết sự phối hợp hiệu quả giữa nhiều enzyme mới trong quá trình thủy phân lignocellulose, với các enzyme quan trọng như endoglucanases, cellobiohydrolases, và β -glucosidase đóng vai trò then chốt trong việc phá vỡ cấu trúc lignocellulose [41]. Việc đầu tư vào nghiên cứu và phát triển các quy trình chuyển hóa sẽ mở rộng các ngành liên quan khác như nông nghiệp, năng lượng, và hóa học sinh học.

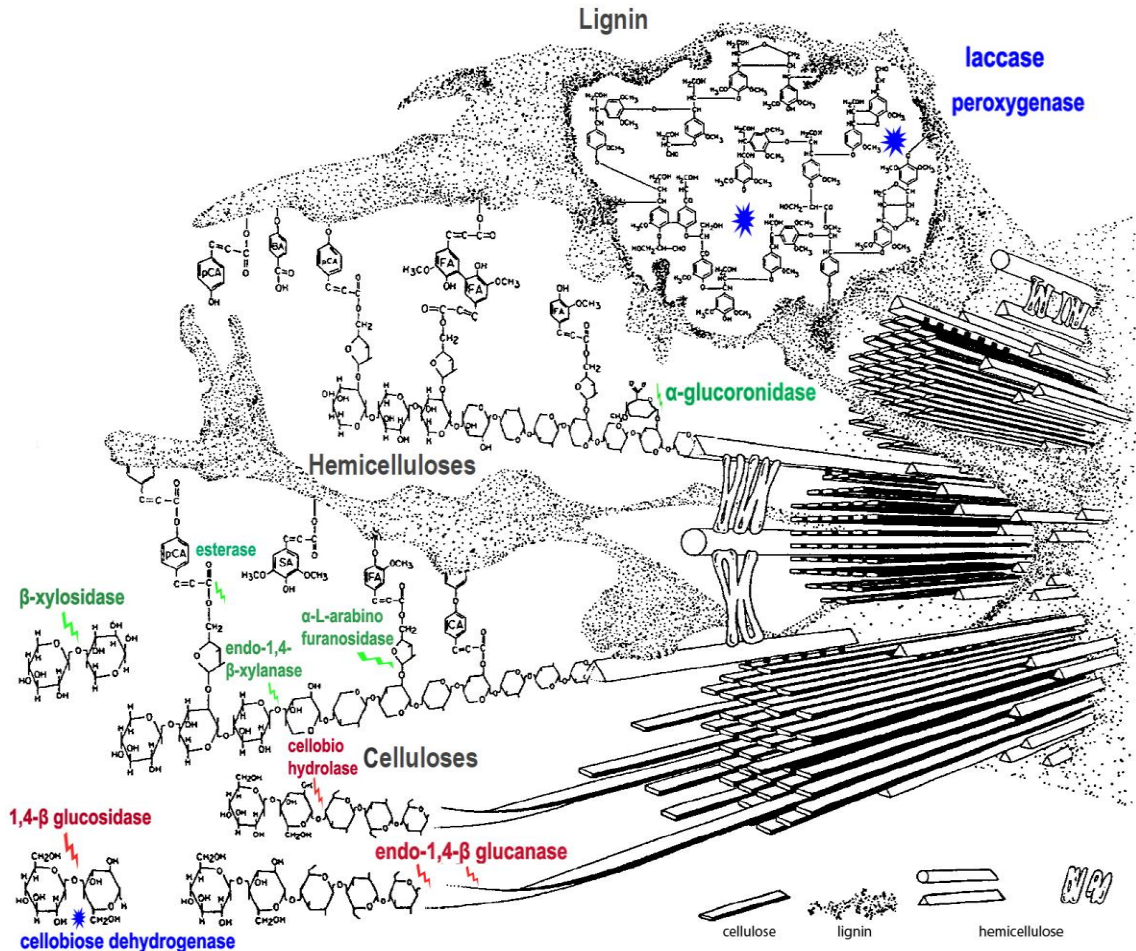
Giảm phụ thuộc vào tài nguyên không tái tạo: Các sản phẩm từ lignocellulose có khả năng thay thế nguyên liệu hóa thạch, chẳng hạn như nhựa từ dầu mỏ hoặc các hóa chất công nghiệp truyền thống, qua đó giảm áp lực lên các tài nguyên không thể tái tạo. Đồng thời, đáp ứng xu hướng tiêu dùng bền vững, các sản phẩm như bao bì sinh học từ lignocellulose ngày càng trở nên phù hợp với lối sống thân thiện với môi trường [29].

Chuyển hóa lignocellulose không chỉ mang lại giá trị kinh tế cao mà còn hỗ trợ bảo vệ môi trường, đóng vai trò nền tảng trong phát triển kinh tế sinh học bền vững. Việc đầu tư vào công nghệ và chính sách khuyến khích sử dụng tài nguyên này là hướng đi chiến lược để đảm bảo sự phát triển dài hạn.

1.2. Một số enzyme chuyển hóa lignocellulose và nguồn sinh tổng hợp enzyme

Cấu trúc phức tạp của lignocellulose là một thách thức lớn trong việc chuyển hóa sinh khối này, do sự liên kết chặt chẽ giữa cellulose, hemicellulose và lignin tạo nên một mạng lưới bền vững và kháng lại các tác nhân phân giải. Chính vì vậy, các enzyme chuyển hóa lignocellulose đóng vai trò quan trọng trong việc phân giải cấu trúc này. Các enzyme này bao gồm hai nhóm chính: enzyme oxy hóa và enzyme thủy phân (Hình 1.4). Các enzyme oxy hóa đóng vai trò quan trọng trong việc xúc tác các phản ứng oxy hóa-khử để phá vỡ các liên kết hóa học trong lignin, đặc biệt là các liên kết C-C và C-O, vốn có độ bền cao, giúp mở đầu cho quá trình phá vỡ lignin. Quá trình này tạo điều kiện cho các enzyme thủy phân dễ dàng tiếp cận và phân giải cellulose cùng hemicellulose. Trong khi đó, enzyme thủy phân, bao gồm cellulase và hemicellulase, xúc tác quá trình cắt đứt các liên kết glycosidic

trong cellulose và hemicellulose, giải phóng các đơn vị monosaccharide và oligosaccharide cần thiết trong ứng dụng công nghiệp. Tuy nhiên, sự phối hợp hiệu quả giữa các enzyme này là yếu tố quyết định hiệu suất của quá trình phân giải lignocellulose.



Hình 1.4. Một số enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa lignocellulose [42].

1.2.1. Nhóm enzyme oxy hóa

1.2.1.1. Laccase

Laccase (EC 1.10.3.2) là enzyme thuộc polyphenol oxidase hay oxidoreductase, chứa các nguyên tử đồng trong trung tâm xúc tác và hay được gọi là polyphenol oxidase đa đồng [43]. Bởi vì trong cấu trúc có chứa 4 nguyên tử đồng nên laccase sử dụng oxy làm chất nhận điện tử khi oxy hóa cơ chất. Laccase có thể oxy hóa cơ chất rất đa dạng, bao gồm các dẫn xuất

diphenol, polyphenol, phenol, amine thơm, diamine, dioxin, benzenethiol và cả các hợp chất vô cơ [44].

Cơ chế tác dụng của enzyme laccase dựa trên phản ứng oxy hóa-khử, trong đó enzyme sử dụng oxy phân tử (O_2) làm chất nhận electron và chuyển đổi nó thành nước (H_2O). Quá trình bắt đầu khi laccase liên kết với cơ chất, thường là các hợp chất phenolic, amin thơm hoặc các chất có khả năng cho electron. Nhờ các ion đồng trong trung tâm hoạt động, enzyme nhận electron từ cơ chất, dẫn đến việc oxy hóa cơ chất thành các sản phẩm như quinon. Đồng thời, các electron được chuyển tới oxy phân tử tại trung tâm hoạt động của enzyme để tạo ra nước [45]. Với khả năng xúc tác đa dạng và không đặc hiệu, laccase có thể xử lý nhiều loại cơ chất khác nhau, bao gồm các hợp chất hữu cơ phức tạp như lignin, phá vỡ các liên kết phenolic và ether trong cấu trúc lignin, làm giảm độ bền vững của nó. Quá trình này không chỉ giải phóng cellulose và hemicellulose để các enzyme khác tiếp tục xử lý, mà còn tạo ra các hợp chất giá trị gia tăng từ lignin, như oligomer và monomer phenolic [43, 45].

Laccase là enzyme đặc biệt được quan tâm bởi những ứng dụng hữu ích trong các ngành công nghiệp đang phát triển như: tẩy màu của thuốc nhuộm vải, tẩy trắng giấy, loại bỏ hợp chất phenol dư trong rượu, sản xuất nhiên liệu sinh học, khử độc môi trường ...[46, 47]. Laccase có thể thu nhận từ vi khuẩn như *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*... Tuy nhiên, laccase từ vi khuẩn thường có hoạt tính rất thấp và khó có khả năng ứng dụng trong thực tiễn sản xuất. So với enzyme tổng hợp từ thực vật, vi khuẩn hay côn trùng, thì enzyme có nguồn gốc từ nấm biểu hiện nhiều ưu thế hơn cả như có tính ổn định hơn, tính không đặc hiệu cơ chất và khả năng oxy hóa các hợp chất phenol đa dạng. Laccase thu nhận từ nấm men thường không thể hiện hoạt tính cao như laccase từ nấm sợi. Điều này chủ yếu liên quan đến yêu cầu glycosyl hóa đặc trưng của laccase từ các nguồn gốc khác nhau. Do vậy, laccase thu được từ nấm mốc được quan tâm nhiều hơn. Laccase đã được phát hiện chủ yếu từ các loài nấm như *Botrytis cinerea*, *Chaetomium thmophilum*, *Coptius cinereus*, *Neurospora crassa*, *Phlebia radiatre*, *Pleurotus otreatus*, *Pycnoporus cinnabarius* và *Trametes versicolor* [45, 48-50].

1.2.1.2. Lignin peroxidase

Lignin peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) là enzyme thuộc nhóm peroxidase, được tìm thấy chủ yếu ở các loài nấm phân giải gỗ, đặc biệt là *Phanerochaete chrysosporium* [51, 52]. Enzyme này có khả năng oxy hóa các hợp chất phức tạp như lignin thông qua việc sử dụng hydrogen peroxide (H_2O_2) làm chất xúc tác để nhận electron.

Cơ chế tác động của LiP lên lignocellulose diễn ra thông qua quá trình oxy hóa các liên kết hóa học phức tạp trong lignin. LiP sử dụng hydrogen peroxide để kích hoạt trung tâm heme, tạo ra các trạng thái oxy hóa cao (Compound I và Compound II) [53]. Enzyme này tạo ra các gốc tự do, chẳng hạn như gốc phenoxy hoặc cation radical, tại các vị trí hoạt động của lignin. Các gốc này không ổn định và trải qua hàng loạt phản ứng hóa học, dẫn đến phá vỡ các liên kết C-C và C-O trong cấu trúc lignin. Sự phân hủy lignin bởi LiP làm giảm tính kháng phân giải của lignocellulose, giải phóng cellulose và hemicellulose, giúp các enzyme khác như cellulase và hemicellulase dễ dàng tiếp cận và phân giải. Nhờ đó, LiP đóng vai trò quan trọng trong việc xử lý sinh khối thực vật, sản xuất nhiên liệu sinh học và các ứng dụng tái chế sinh học khác [54, 55].

Lignin peroxidase thường được tìm thấy trong các loại nấm mục trắng, chẳng hạn như *P. chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* và *Phlebia radiata* [56-58]. Enzyme LiP từ các loài nấm này có khả năng oxy hóa-khử vượt trội hơn so với laccase, vì nó có thể oxy hóa cả các cấu trúc phenolic và dẫn xuất phenolic của lignin mà không cần sự hỗ trợ của chất trung gian. Nhờ đặc điểm này, LiP có khả năng phân hủy lignin hiệu quả hơn laccase, góp phần quan trọng vào quá trình tái chế và chuyển hóa lignocellulose. Tuy nhiên, không phải tất cả các loài nấm mục trắng đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP. Sự biểu hiện của LiP phụ thuộc vào loài nấm, điều kiện môi trường, và nguồn carbon có sẵn. Một số loài nấm mục trắng chỉ sản xuất mangan peroxidase (MnP) hoặc các enzyme khác trong quá trình phân giải lignin. Điều này phản ánh sự đa dạng sinh học và tính chuyên biệt của các enzyme trong việc thích nghi với môi trường và phân hủy các chất hữu cơ phức tạp [18]. Hơn nữa, hiệu suất hoạt động của LiP còn chịu ảnh hưởng bởi nồng độ hydrogen peroxide, pH, và nhiệt độ. Các nghiên cứu hiện

đang tập trung vào việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nấm và thiết kế biến đổi enzyme nhằm tăng cường tính ổn định và hiệu quả xúc tác của LiP, phục vụ cho các ứng dụng công nghiệp và môi trường.

Enzyme LiP thường được sử dụng trong các ứng dụng làm sạch nguồn chất thải có hàm lượng phenol cao, bao gồm các độc tố phenol halogen và các chất gây ô nhiễm có khả năng rối loạn nội tiết như t-octylphenol, bisphenol A, estrone, và ethinylestradiol [59]. Những hợp chất này thường chứa các nhóm hydroxyl phenolic, vốn có độ độc cao và khó phân hủy. Thông qua phản ứng trùng hợp, LiP biến đổi các hợp chất phenolic thành các sản phẩm ít phản ứng hơn và kém hòa tan, dẫn đến kết tủa và giảm đáng kể độc tính của chúng. Ngoài ra, LiP còn được ứng dụng trong quá trình khử màu của các loại thuốc nhuộm tổng hợp. Theo nghiên cứu của Ollikka và cộng sự, peroxidase lignin từ *P. chrysosporium* đã được chứng minh có khả năng khử màu các loại thuốc nhuộm như azo, triphenyl methane, heterocyclic, và polymer. Quá trình này có thể được tăng cường với sự hiện diện của các cơ chất khác nhau đóng vai trò chất trung gian, giúp cải thiện hiệu quả phản ứng [60]. Bên cạnh xử lý chất thải và thuốc nhuộm, enzyme LiP cũng được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp giấy và bột giấy. Nó được sử dụng để khử lignin trong quá trình làm trắng bột giấy, thay thế các hóa chất độc hại như clo [55]. Việc này không chỉ làm giảm tác động xấu đến môi trường mà còn tiết kiệm chi phí xử lý nước thải và nâng cao chất lượng sản phẩm. LiP đang ngày càng khẳng định vai trò quan trọng trong các ngành công nghiệp hiện đại, đặc biệt là trong xử lý môi trường, sản xuất giấy bền vững và tái chế tài nguyên, góp phần giảm thiểu ô nhiễm và thúc đẩy các giải pháp công nghệ xanh.

1.2.1.3. Unspecific peroxygenase

Unspecific peroxygenase (UPO, EC 1.11.2.1) là 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. UPO có cấu trúc giống cytochrome P450 và là một thành viên trong họ peroxidase chứa heme, với một ion sắt ở trung tâm [61, 62]. Cấu trúc này cho phép nó thực hiện phản ứng oxy hóa đa dạng. Enzyme này có thể xúc tác quá trình oxy hóa không đặc hiệu, nghĩa là nó có

thể chuyển hóa nhiều loại cơ chất khác nhau như alkane, alkene, alcohol, ether, và thậm chí các hợp chất thơm [63]. UPO thực hiện các phản ứng hydroxyl hóa, epoxide hóa, và một số phản ứng khác một cách hiệu quả mà không cần đến sự tham gia của NADPH như các enzyme cytochrome P450.

Cơ chế tác động của UPO đối với lignocellulose chủ yếu dựa trên khả năng oxy hóa các liên kết phức tạp trong lignin – thành phần chính làm lignocellulose trở nên kháng phân hủy. Enzyme này oxy hóa các nhóm chức trong lignin, bao gồm các liên kết C-H và C=C, tạo ra các gốc tự do phenoxy hoặc cation radic. Các gốc tự do này kích hoạt một chuỗi phản ứng tự do, phá vỡ cấu trúc polymer của lignin. Quá trình này làm giảm sự bao bọc chặt chẽ của lignin quanh cellulose và hemicellulose, giải phóng các polysaccharide để các enzyme khác như cellulase và hemicellulase tiếp cận dễ dàng hơn [64]. Không chỉ tác động đến lignin, UPO còn có khả năng biến đổi các cấu trúc phức tạp khác trong lignocellulose thông qua việc thêm oxy vào các phân tử hữu cơ không no. Điều này giúp phân giải lignocellulose hiệu quả hơn, mở đường cho việc chuyển hóa thành các sản phẩm có giá trị như đường, ethanol sinh học, và các hóa chất nền tảng khác [65].

Nhờ tính đa dạng trong khả năng xúc tác, UPO được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, bao gồm như sản xuất các hợp chất oxy hóa quan trọng trong ngành hóa dược và hóa mỹ phẩm, ứng dụng trong quá trình biến đổi sinh học của các hợp chất hữu cơ, xử lý các chất gây ô nhiễm hữu cơ, đặc biệt là các chất gây ô nhiễm khó phân hủy sinh học trong nước thải. UPO được tìm thấy chủ yếu trong các loại nấm mốc và nấm sợi (fungi), đặc biệt là các loại nấm thuộc chi *Agrocybe*, *Marasmius* và *Cylindrobasidium* [23, 66]. Các nấm này sản sinh ra enzyme UPO như một cơ chế để phân hủy lignocellulose trong tự nhiên. Enzyme unspecific peroxygenase được nghiên cứu rộng rãi không chỉ vì tiềm năng ứng dụng công nghiệp của nó mà còn bởi khả năng thực hiện các phản ứng hóa học một cách hiệu quả và thân thiện với môi trường.

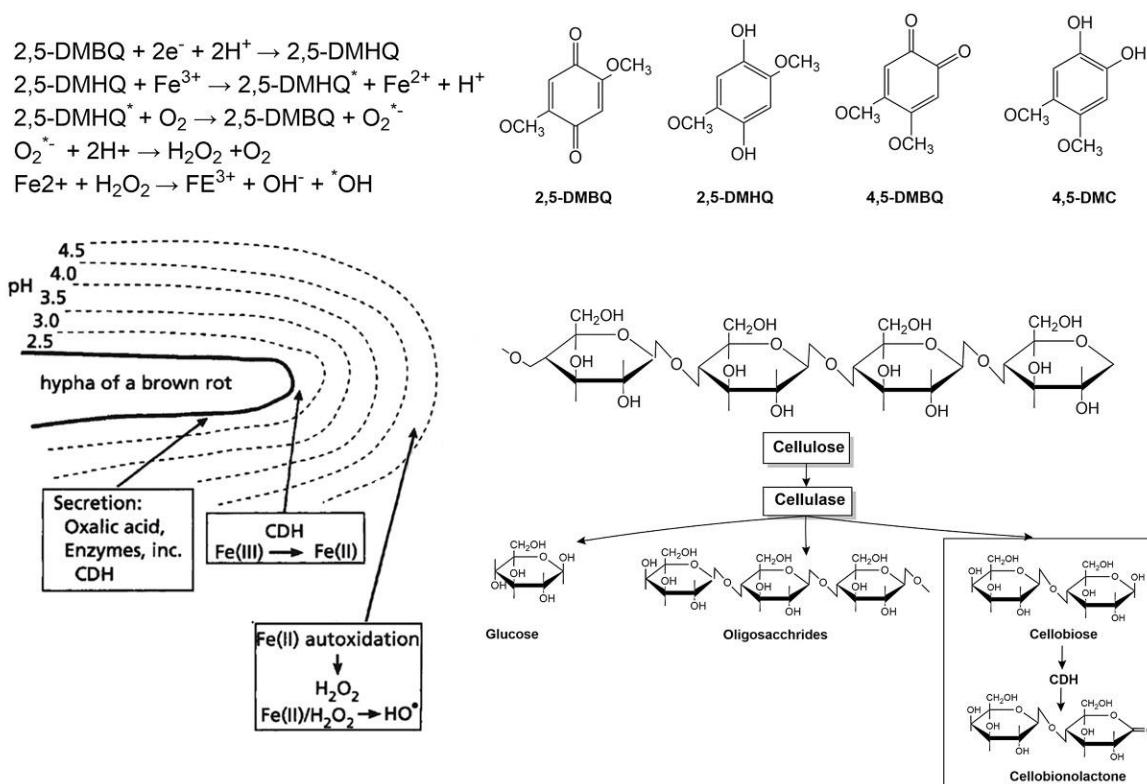
1.2.1.4. Cellobiose dehydrogenase

Cellobiose dehydrogenase (CDH, EC 1.1.99.18) là enzyme thuộc nhóm oxidoreductase, có khả năng xúc tác quá trình oxy hóa cellobiose (một disaccharide) thành cellobionolactone, đồng thời chuyển điện tử tới các chất

nhận như oxy, quinone, hoặc ferrocenium ion [67, 68]. Enzyme này thường được tìm thấy trong các loại nấm mốc và nấm sợi, chẳng hạn như *Trametes* và *Phanerochaet*, đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy cellulose trong tự nhiên [69, 70].

CDH có cấu trúc gồm hai miền chức năng chính: miền FAD (flavin adenine dinucleotide) và miền heme [71]. Miền FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) thực hiện quá trình oxy hóa cellobiose và các oligosaccharide tương tự, chuyển chúng thành cellobiono-1,5-lactone, quá trình này kèm theo việc giải phóng các electron. Trong khi miền heme thực hiện nhiệm vụ chuyển electron từ miền FAD đến các chất nhận điện tử khác như cytochrome, quinone, và oxy [72]. Sự phối hợp giữa hai miền này tạo ra khả năng tương thích cao với nhiều loại chất nhận điện tử, giúp CDH linh hoạt trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau.

CDH có vai trò quan trọng trong việc phân hủy lignocellulose nhờ khả năng tương tác với cả cellulose và lignin (Hình 1.5). Enzyme này không chỉ oxy hóa các sản phẩm từ quá trình thủy phân cellulose, chẳng hạn như cellobiose, mà còn tạo ra các gốc tự do và hydrogen peroxide. Những sản phẩm này là tác nhân hỗ trợ hoạt động của các enzyme oxy hóa khác, bao gồm laccase, lignin peroxidase (LiP), và manganese peroxidase (MnP). Các gốc tự do và hydrogen peroxide do CDH tạo ra tham gia vào quá trình phá vỡ cấu trúc lignin, lignin bị phân mảnh, làm lộ diện các chuỗi cellulose và hemicellulose ẩn bên trong, tạo điều kiện để các enzyme thủy phân như cellulase và xylanase tiếp cận dễ dàng hơn.



Hình 1.5. Mô tả vai trò của CDH trong chuyển hóa lignocellulose.

Nhờ vào các đặc tính xúc tác mạnh mẽ, CDH đang được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, bao gồm sản xuất nhiên liệu sinh học, xử lý chất thải sinh học và tổng hợp các hợp chất sinh học có giá trị cao. Trong sản xuất nhiên liệu sinh học, CDH góp phần làm tăng hiệu suất chuyển hóa lignocellulose thành các loại đường đơn, từ đó cải thiện quy trình sản xuất bioethanol. Ngoài ra, khả năng tạo ra các gốc tự do và hydrogen peroxide cũng giúp CDH trở thành một công cụ hữu ích trong các quy trình xử lý ô nhiễm và phát triển các cảm biến sinh học. Nhờ hoạt động của CDH và các enzyme phân giải cellulose khác, các vi sinh vật có thể sử dụng cellulose như một nguồn carbon và năng lượng. Bên cạnh đó, CDH còn có nhiều tiềm năng trong ứng dụng công nghiệp như sản xuất nhiên liệu sinh học, biosensor, ...[73, 74].

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 một nhóm enzyme quan trọng có vai trò trong quá trình phân giải các liên kết glycoside giữa carbohydrate hoặc giữa carbohydrate và các phân tử không phải carbohydrate [75]. Chúng phân hủy polysaccharide (như cellulose, chitin

và glucan) thành các oligosaccharide và monosaccharide. Họ enzyme GH rất đa dạng và được phân loại thành nhiều họ khác nhau dựa trên cấu trúc và cơ chế hoạt động của chúng. Các enzyme trong cùng một họ thường có cấu trúc ba chiều và cơ chế xúc tác tương tự nhau, mặc dù chúng có thể khác nhau về độ đặc hiệu cơ chất. Hiện nay, dựa vào cơ sở dữ liệu CAZy (Carbohydrate-Active enZymes), GH được chia thành hơn 170 họ khác nhau.

Enzyme quan trọng trong họ glycoside hydrolase là cellulase, một phức hệ gồm endo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.91) và β -glucosidase (EC 3.2.1.21) [76]. Các enzyme này xúc tác thúc đẩy quá trình thủy phân phân cắt mạch cellulose thành những đoạn ngắn (Hình 1.6) [77, 78].

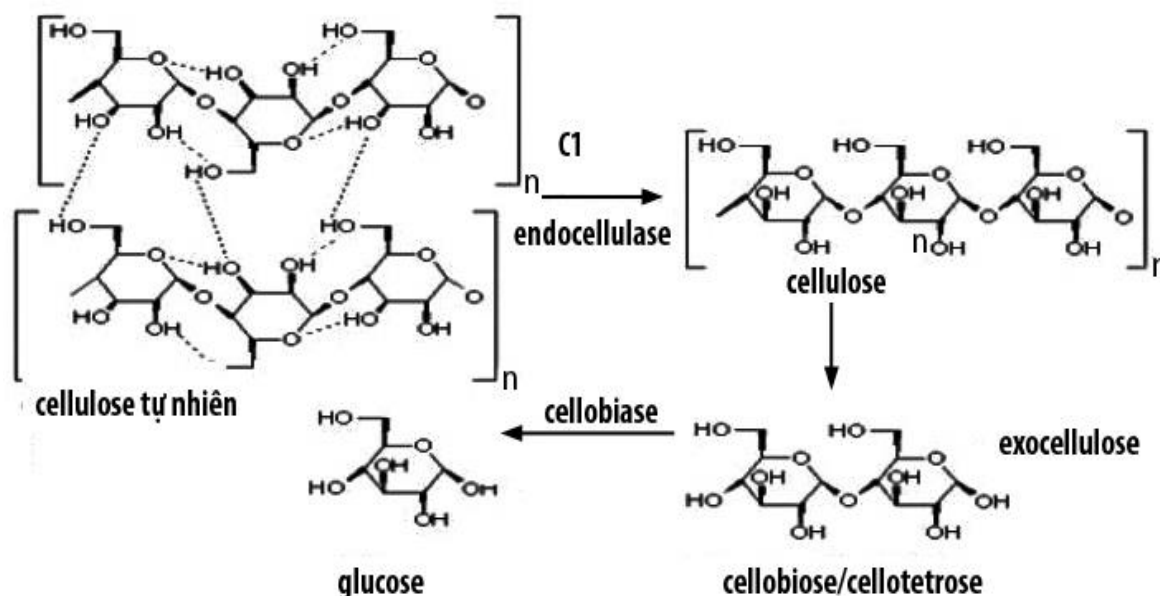
Endo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) là một enzyme có chức năng phân cắt ngẫu nhiên các liên kết β -1,4-glycoside trong chuỗi cellulose hoặc các polysaccharide tương tự. Enzyme này hoạt động bằng cách nhắm vào các vị trí bất kỳ trong chuỗi cellulose, phân cắt thành các đoạn ngắn hơn như oligosaccharide và cellodextrin, đồng thời tạo ra các điểm đứt gãy trên sợi cellulose, giúp các enzyme khác dễ dàng tiếp cận và tiếp tục phân giải. Endo-1,4-glucanase được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp giấy để xử lý sợi cellulose, tăng hiệu suất sản xuất, cũng như ở bước đầu của quá trình phân hủy cellulose nhằm sản xuất bioethanol [79].

Exo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.91), còn được gọi là cellobiohydrolase, là một enzyme có chức năng phân cắt các liên kết β -1,4-glycoside tại các đầu tận cùng của chuỗi cellulose, tạo ra sản phẩm chính là cellobiose. Enzyme này hoạt động chủ yếu trên các đầu không khử của chuỗi cellulose, phân cắt từng đơn vị disaccharide (cellobiose) từ chuỗi cellulose hoặc từ các đoạn ngắn được tạo ra bởi endoglucanase. Exo-1,4-glucanase phối hợp chặt chẽ với endoglucanase để tối ưu hóa quá trình phân giải cellulose. Enzyme này thường được ứng dụng trong phân giải các sợi cellulose dài thành các phần dễ xử lý hơn trong quá trình sản xuất ethanol sinh học.

β -glucosidase (EC 3.2.1.21) còn được gọi là cellobiase, là một enzyme thủy phân liên kết β -glycoside giữa các phân tử đường trong các oligosaccharide hoặc disaccharide như cellobiose, chuyển hóa chúng thành glucose – dạng đường đơn dễ hấp thụ và sử dụng. Enzyme này hoạt động ở

giai đoạn cuối của quá trình phân hủy cellulose; do đó, hoạt tính của nó giảm khi chiều dài của chuỗi cellulose tăng lên. Vai trò chính của β -glucosidase là chuyển hóa cellobiose thành đường đơn glucose, ngăn chặn sự tích tụ các sản phẩm trung gian như cellobiose, vốn có thể ức chế hoạt động của các enzyme phân giải cellulose khác. Enzyme này có nhiều ứng dụng quan trọng, bao gồm sản xuất glucose làm nguyên liệu lên men ethanol trong ngành công nghiệp năng lượng sinh học. Trong y học, β -glucosidase được sử dụng để cải thiện tiêu hóa và hỗ trợ điều trị các rối loạn liên quan đến chuyển hóa carbohydrate [80, 81].

Tùy thuộc vào các chủng vi sinh vật cũng như các điều kiện môi trường nuôi cấy, tỷ lệ các thành phần trong hệ enzyme cellulase là khác nhau, tuy nhiên để phân giải hoàn toàn cellulose cần có sự tác dụng hiệp đồng của cả ba enzyme trong hệ cellulase [80]. Từ các nghiên cứu về ba enzyme trong hệ cellulase các nhà khoa học đều kết luận rằng các loại enzyme cellulase có tác dụng hiệp đồng sẽ thay phiên nhau thủy phân cellulose để tạo thành sản phẩm cuối cùng là đường glucose [82].



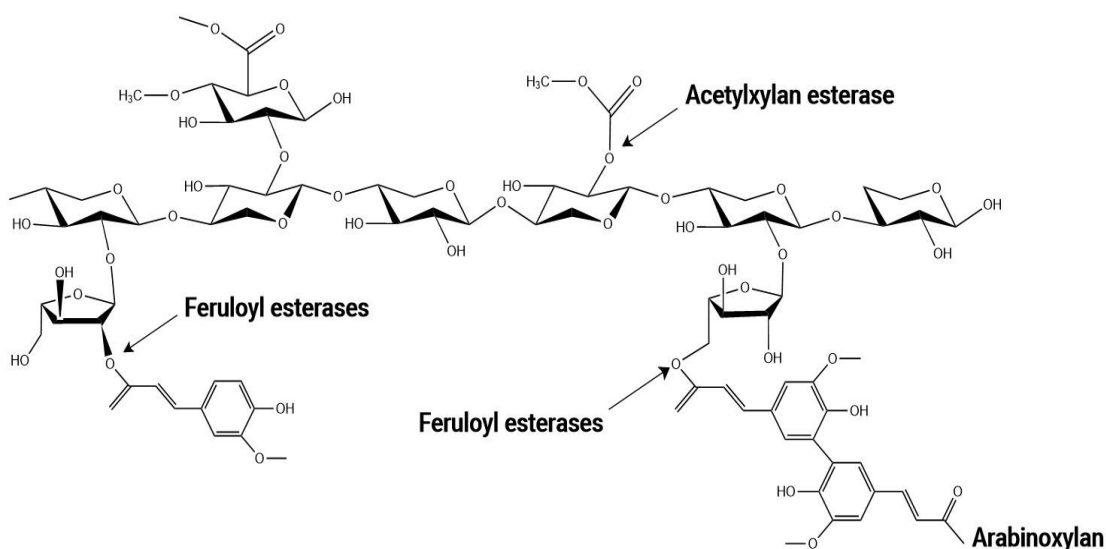
Hình 1.6. Hệ cellulase tham gia chuyển hóa mạch cellulose [82].

1.2.2.2. Họ carbohydrate esterase

Một mắt xích quan trọng tham gia vào quá trình thủy phân cấu trúc lignocellulose là hệ carbohydrate esterase (CE), là đại diện của nhóm các

enzyme hydrolase xúc tác phản ứng cho sự hình thành các ester no và ester thơm [83, 84]. 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 để phân cắt liên kết nối giữa các chuỗi xylan với lignin để tách phần lignin ra khỏi cấu trúc lignocellulose. Chúng đóng một vai trò quan trọng ở giai đoạn đầu quá trình thủy phân lignocellulose [85, 86].

Acetyl xylan esterase: Acetyl xylan esterase là một enzyme thuộc nhóm hydrolase, có vai trò xúc tác phản ứng giải phóng các nhóm acetyl từ các polysaccharide acetyl hóa như xylan hoặc pectin trong lignocellulose [87]. Enzyme này cùng với các enzyme thủy phân cellulose và xylan giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa vật liệu thành tế bào thực vật. Cụ thể, acetyl esterase loại bỏ các nhóm acetyl ester tại vị trí C2 và C3 của D-xylopyranosyl trong chuỗi xylan (Hình 1.7). Quá trình deacetyl hóa này làm cho các đơn vị xylopyranosyl trong xylan dễ dàng bị phân giải hơn bởi enzyme endo- β -1,4-xylanase (EC 3.2.1.8). Các nhóm acetyl nhánh thường tạo trở ngại không gian, làm giảm khả năng tiếp cận của các enzyme phân cắt chuỗi chính. Vì vậy, acetyl esterase đóng vai trò hỗ trợ bằng cách loại bỏ các nhóm acetyl nhánh, giúp tăng cường hiệu quả tiếp cận của enzyme endoxylanase. Ngoài ra, enzyme endoxylanase tiếp tục loại bỏ các nhóm O-acetyl trên β -D-xylopyranosyl ở các vị trí C2 và C3 của acetyl xylan, từ đó thúc đẩy quá trình phân giải xylan thành các đơn vị đường đơn hiệu quả hơn.



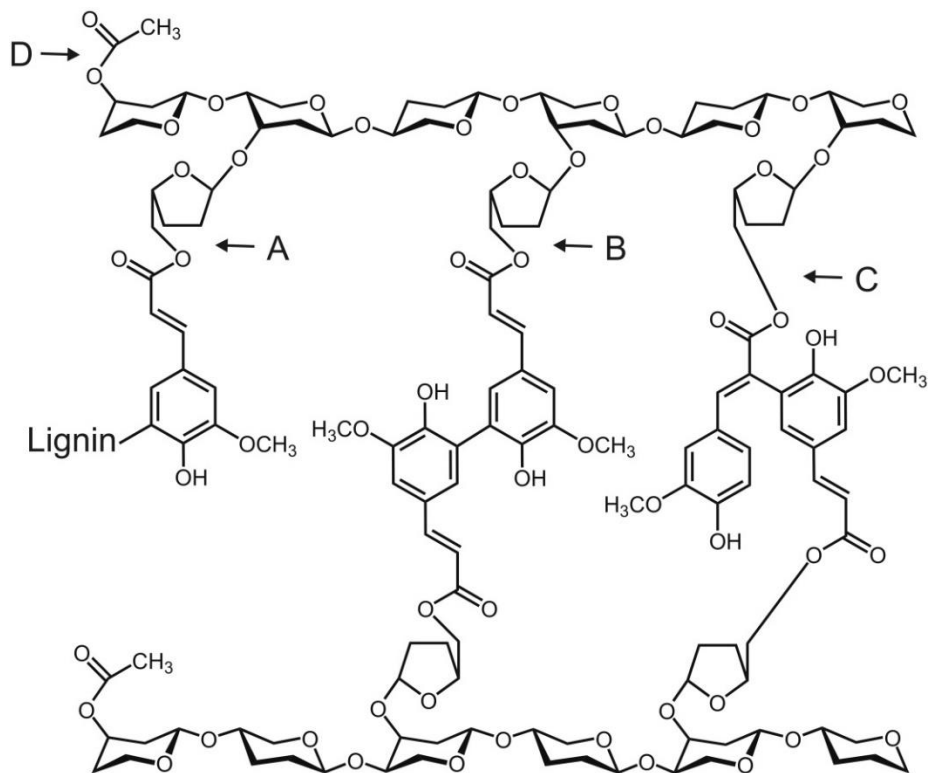
Hình 1.7. Đích tác động của enzyme acetyl (xylan) esterase và feruloyl esterase [87].

Nhờ tính đặc hiệu cao, acetyl xylan esterase đang ngày càng khẳng định vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp, từ chế biến thực phẩm, năng lượng đến phát triển công nghệ vật liệu sinh học tiên tiến. Ví dụ như, trong ngành sản xuất giấy và bột giấy, enzyme này hỗ trợ quá trình tẩy trắng và làm sạch cellulose, từ đó giảm thiểu nhu cầu sử dụng hóa chất độc hại, góp phần bảo vệ môi trường và tối ưu hóa hiệu quả sản xuất [88]. Trong lĩnh vực thực phẩm, Acetyl xylan esterase được sử dụng để cải thiện kết cấu và tính chất của các sản phẩm từ ngũ cốc, nhờ khả năng biến đổi và làm mềm cấu trúc hemicellulose, giúp tăng chất lượng và tính ổn định của sản phẩm. Đồng thời, trong ngành thức ăn chăn nuôi, enzyme này đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy xylan và hemicellulose có trong ngũ cốc, từ đó tăng khả năng tiêu hóa và giá trị dinh dưỡng của thức ăn, giúp nâng cao hiệu suất chăn nuôi [89].

Acetyl xylan esterase từ các nguồn sinh vật khác nhau có đặc tính hóa lý và hoạt động xúc tác khác nhau. Enzyme có nguồn gốc từ chủng *Bacillus pumilis* có khối lượng phân tử là 40 kDa, nhiệt độ hoạt động tối ưu là 45°C cùng với pH tối ưu là 6,0. Trong khi đó enzyme có nguồn gốc từ chủng *Bacillus subtilis* có khối lượng phân tử là 31 kDa và hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 50°C và pH 6,5. Hoạt tính của enzyme có thể bị ảnh hưởng bởi các ion kim loại, ví dụ như Zn^{2+} , Ni^{2+} và Fe^{2+} làm tăng hoạt tính của enzyme, trong khi đó Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} và Co^{2+} ức chế hoạt tính của enzyme. Bên cạnh nguồn enzyme có từ vi khuẩn thì enzyme acetyl esterase cũng được tìm ra ở một số chủng nấm thuộc ngành Ascomycota, điển hình như *Aspergillus awamori* [90], *Aspergillus niger* [38] và *Fusarium oxysporum* [91]. Enzyme từ nấm *Aspergillus awamori* có khối lượng phân tử là 31 kDa và hoạt động tốt ở nhiệt độ 40 °C và pH 7,0.

Feruloyl esterase (FAE, EC 3.1.1.73) hay còn gọi là ferulic axit esterase thuộc nhóm carboxylic este hydrolase. Enzyme này xúc tác phản ứng thủy phân liên kết este giữa các polysaccharide trong thành tế bào và các axit hydroxycinnamic liên kết với lignin [92, 93]. FAE đóng vai trò quan trọng trong việc giải phóng axit ferulic và các hợp chất phenolic khác từ thành tế bào thực vật, qua đó phá vỡ cấu trúc phức tạp của lignocellulose. Điều này

giúp cải thiện khả năng tiếp cận của các enzyme khác, như xylanase và cellulase, đến polysaccharide, tối ưu hóa quá trình phân giải lignocellulose và tăng hiệu quả xử lý sinh học.



Hình 1.8. Đích tác động của enzyme feruloyl esterase và các liên kết dạng cầu nối của axit ferulic và dimer với arabinoxylan và lignin [94].

A: O-5-feruloyl lignin; B-C: nhóm dimer O-5-diferuloyl dimer; D: nhóm O-3-acetyl.

Enzyme feruloyl esterase còn hoạt động trên các chuỗi nhánh của polysaccharide trong thành tế bào thực vật, phá vỡ liên kết este giữa các chuỗi xylan và giữa xylan với lignin. Quá trình này giúp tách lignin ra khỏi cấu trúc phức tạp của lignocellulose [95]. Dưới tác động của FAE, phức hợp lignin-carbohydrate (LCC) trở nên dễ bị phân giải hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho các enzyme khác xúc tác thủy phân lignocellulose. Ngoài ra, FAE còn xúc tác giải phóng các axit phenolic như axit ferulic, axit p-coumaric, axit cinnamic và các dimer của chúng từ vật liệu lignocellulose. Những hợp chất phenolic này không chỉ có giá trị cao trong ngành thực phẩm và mỹ phẩm nhờ đặc tính chống oxy hóa mà còn đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu và sản xuất các hợp chất sinh học có giá trị [95].

Gần đây, enzyme feruloyl esterase nhận được nhiều sự quan tâm bởi vai trò của chúng trong nhiều ngành công nghiệp như giấy và bột giấy. FAE có thể giúp tách các lignin từ cellulose, làm giảm việc sử dụng hóa chất và năng lượng trong quá trình sản xuất giấy và bột giấy. Trong công nghiệp dược phẩm, FAE giúp tạo ra các hợp chất phenolic, các hợp chất này có đặc tính chống oxy hóa, chống viêm, và chống ung thư, được sử dụng trong sản xuất dược phẩm và các sản phẩm chăm sóc sức khỏe [96]. Trong công nghiệp sinh học và năng lượng sinh học, FAE đóng vai trò phá vỡ các cấu trúc phức tạp của lignocellulose, làm tăng hiệu quả của quá trình sản xuất bioethanol từ các nguyên liệu sinh khối. Enzyme này cũng hỗ trợ trong việc sản xuất các loại nhiên liệu sinh học khác từ các nguồn nguyên liệu tái tạo. Ngoài ra, enzyme này cũng có vai trò trong việc thu nhận các hợp chất thơm hydroxycinnamic từ phụ phẩm nông nghiệp [97, 98]. Hiện nay ở Việt Nam có rất ít các công bố liên quan tới ứng dụng của enzyme feruloyl esterase từ nấm trong quá trình phân hủy lignocellulose từ phụ phẩm công-nông nghiệp. Trên thế giới, một số công bố về feruloyl esterase liên quan đến sự thủy phân lignocellulose đã được nghiên cứu tinh sạch và xác định đặc tính, chủ yếu là từ nguồn nấm và vi khuẩn (*Paenibacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Aspergillus* spp và *Penicillium* spp) [99]. Các vi sinh vật được biết đến với khả năng sinh ra feruloyl esterase đã được đề cập bao gồm: *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp....) [85].

Cấu trúc phức tạp và bền vững của lignocellulose đòi hỏi sự phối hợp hoạt động của nhiều enzyme, bao gồm các enzyme oxy hóa và thủy phân, hoạt động một cách hiệp đồng [100]. Việc sử dụng enzyme để xúc tác quá trình thủy phân cellulose thành glucose và hemicellulose thành xylose từ lâu đã được xem là một chiến lược tiềm năng và hiệu quả về chi phí trong các ứng dụng công nghiệp. Do đó, tối ưu hóa các loại enzyme cocktail là một yếu tố then chốt nhằm nâng cao hiệu quả chuyển đổi lignocellulose, bởi mỗi loại cơ chất đều có những đặc điểm riêng và yêu cầu các điều kiện đặc thù để được phân hủy hoàn toàn.

1.2.3. Xúc tác hiệp đồng bởi hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”) trong chuyển hóa hiệu quả vật liệu lignocellulose.

Lignocellulose, thành phần chính của sinh khối thực vật, được cấu tạo bởi ba hợp phần chính là cellulose, hemicellulose và lignin, liên kết chặt chẽ thành một mạng không gian ba chiều, tạo nên đặc tính kháng phân hủy sinh học cao. Trong cấu trúc này, cellulose tồn tại ở dạng vi sợi tinh thể được bao bọc bởi lớp hemicellulose có tính phân nhánh và lignin kỵ nước, làm giảm đáng kể khả năng tiếp cận của enzyme thủy phân [101, 102]. Để khắc phục trở ngại này, nhiều nghiên cứu đã tập trung phát triển hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”) – sự phối hợp có chủ đích giữa nhiều loại enzyme nhằm khai thác tối đa hiệu ứng hiệp đồng (synergy effect), qua đó nâng cao hiệu suất thủy phân polysaccharide và giảm chi phí enzyme trong sản xuất nhiên liệu sinh học và hóa chất nền sinh học.

Trong nhóm cellulase, endo- β -1,4-glucanase (EG) cắt ngẫu nhiên liên kết β -1,4-glycosidic trong chuỗi cellulose vô định hình, tạo các đầu mạch mới; cellobiohydrolase (CBH) tấn công từ đầu mạch và giải phóng cellobiose; trong khi β -glucosidase (BGL) thủy phân cellobiose thành glucose, loại bỏ hiện tượng ức chế ngược lên EG và CBH [103]. Đối với hemicellulose, các xylanase, β -xylosidase, mannanase cùng các enzyme phụ trợ như acetylxyloxyesterase và feruloyl esterase phá vỡ cấu trúc phân nhánh và liên kết ester, giải phóng hemicellulose, đồng thời giảm che chắn cellulose [14]. Nhóm enzyme oxy hóa, gồm laccase, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), xúc tác phân giải lignin thông qua quá trình oxy hóa liên kết C–C và C–O, từ đó giảm hiện tượng bám dính không đặc hiệu của cellulase lên lignin [104]. Đặc biệt, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) – một enzyme thuộc nhóm auxiliary activity (AA9, AA10) – sử dụng ion đồng và chất cho điện tử để oxy hóa liên kết glycosidic trên bề mặt cellulose tinh thể, tạo điểm đứt mới và tăng đáng kể khả năng tiếp cận của cellulase [105, 106]. Sự kết hợp hợp lý giữa các nhóm enzyme này mang lại hiệu suất cao hơn tổng hiệu suất của từng enzyme đơn lẻ, thể hiện tính hiệp đồng rõ rệt cả về tốc độ phản ứng lẫn độ sâu phân giải cơ chất [86, 107].

Để tận dụng tối đa hiệu ứng hiệp đồng, việc tối ưu hóa thành phần và tỉ lệ enzyme là yếu tố then chốt. Các phương pháp quy hoạch thực nghiệm như Response Surface Methodology (RSM) hoặc thiết kế Box–Behnken được áp dụng nhằm tìm ra tỉ lệ phối trộn tối ưu giữa EG, CBH, BGL, hemicellulase và

LPMO theo thành phần hóa học của cơ chất, mức độ tiền xử lý và tải chất rắn [108]. Ngoài ra, bổ sung các phụ gia như chất hoạt động bề mặt có thể làm giảm bám dính không đặc hiệu của cellulase lên lignin và cung cấp chất cho điện tử cho LPMO, qua đó tăng hiệu quả thủy phân [86]. Sự kết hợp enzyme cocktail với các phương pháp tiền xử lý hóa học, vật lý hoặc sinh học (ví dụ: xử lý hơi nước bão hòa, hoặc tiền xử lý bằng enzyme oxy hóa) giúp phá vỡ cấu trúc chặt chẽ của lignocellulose, nâng cao khả năng tiếp cận của enzyme và rút ngắn thời gian [109]. Các kết quả thu được không chỉ giúp nâng cao hiệu quả chuyển hóa lignocellulose thành đường đơn (glucose, xylose) mà còn tạo nền tảng cho sản xuất bioethanol, biobutanol, axit hữu cơ và các hợp chất sinh học có giá trị cao, đóng góp vào sự phát triển của kinh tế sinh học tuần hoàn và giảm phát thải khí nhà kính toàn cầu [110].

Hiện nay có rất nhiều mô hình phối trộn khác nhau, đem lại hiệu quả thủy phân khác nhau. Việc đa dạng hóa các công thức enzyme cocktail không chỉ cho phép lựa chọn giải pháp phù hợp với từng loại sinh khối cụ thể, mà còn giúp tối ưu hóa quá trình sản xuất theo mục tiêu công nghệ và kinh tế. Từ đó, mở ra nhiều hướng ứng dụng mới như: nâng cao hiệu suất sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ II (bioethanol, biogas, biodiesel sinh học), chế biến hóa chất nền xanh (acid lactic, acid succinic, polyol), hay khai thác trong công nghiệp giấy, dệt may, chế biến thức ăn chăn nuôi và xử lý môi trường. Đồng thời, sự phát triển của các mô hình phối trộn còn là cơ sở để ứng dụng các công cụ hiện đại như sinh học tổng hợp, trí tuệ nhân tạo và mô phỏng tính toán trong thiết kế enzyme cocktail, góp phần tạo ra những giải pháp linh hoạt, tiết kiệm chi phí và thân thiện với môi trường.

1.3. Tình hình nghiên cứu và đặc điểm enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm

1.3.1. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

Gần đây, các phương pháp sinh học, đặc biệt là việc sử dụng vi sinh vật hoặc enzyme đặc hiệu, đang được chú trọng nhờ tính thân thiện với môi trường và tiềm năng ứng dụng quy mô lớn. Những sinh vật có khả năng phân hủy lignocellulose đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì vòng tuần hoàn carbon, nhờ khả năng chuyển hóa hiệu quả các vật liệu thực vật thông qua hệ enzyme oxy hóa và thủy phân [111]. Trong số đó, các loài nấm được biết đến

là nhóm sinh vật sở hữu hệ xúc tác sinh học (enzyme) hiệu quả nhất. Nấm lớn có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme khác nhau, bao gồm enzyme thủy phân ngoại bào (như cellulase, xylanase, esterase...) và các enzyme oxy hóa thuộc nhóm oxidoreductase (như peroxidase, peroxygenase, phenol oxidase...), giúp phân hủy các polymer thực vật và giải phóng các đơn vị cấu trúc (building block) của chúng [78]. Đặc biệt, các loài nấm sợi (filamentous fungi) nổi bật nhờ hệ enzyme xúc tác mạnh mẽ và khả năng tiết lượng lớn enzyme ngoại bào vào môi trường. Điều này không chỉ giúp chúng phân hủy hiệu quả lignocellulose mà còn vượt trội so với vi khuẩn trong việc tiếp cận và xử lý các cấu trúc thực vật phức tạp. Nấm sợi như *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* spp., và các loài thuộc nhóm nấm trắng (white-rot fungi) như *Phanerochaete chrysosporium* đã được nghiên cứu sâu rộng nhờ khả năng sản xuất enzyme mạnh mẽ, đặc biệt là các enzyme oxy hóa có khả năng phá vỡ lignin, một thành phần khó phân hủy nhất của lignocellulose [112, 113].

Nghiên cứu về enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm đang thu hút sự quan tâm lớn trong các lĩnh vực công nghệ sinh học và năng lượng tái tạo. Các enzyme này giúp cải thiện khả năng phân hủy lignocellulose trong quy trình chuyển hóa sinh học, làm giảm sự cần thiết của các phương pháp cơ học hoặc hóa học tốn kém và độc hại. Ngoài ra, nghiên cứu cũng tập trung vào việc tối ưu hóa điều kiện môi trường để sản xuất enzyme từ nấm, cải thiện hiệu suất chuyển hóa và nghiên cứu các ứng dụng công nghiệp. Aarthi Ravichandran và cộng sự (2019) đã phân lập và chỉ ra vai trò của enzyme versatile peroxidase từ chủng nấm mục trắng *Lentinus squarrosulus* trong chuyển hóa lignocellulose từ thân cây kê. Kết quả thu được là hàm lượng lignin được xác định là giảm khoảng 18% so với ban đầu sau khi được xử lý bằng enzyme [114]. Zhichao Deng và cộng sự (2019) đã nghiên cứu đặc tính và vai trò của enzyme laccase trong chuyển hóa lignin có nguồn gốc từ phế thải lúa mì. Nghiên cứu đã chỉ ra được sự khác nhau trong cấu trúc của lignin trước và sau khi xử lý bằng enzyme bởi phần mềm FTIR và XRD. Phương pháp FTIR đã cho thấy các liên kết ete thơm đã bị phân cắt và guaiacyl (G) bị oxy hóa, trong khi đó phương pháp XRD chỉ ra rằng độ kết tinh của lignocellulose tăng lên do thoái hóa một phần lignin [40]. Một số nghiên cứu khác như Adarsh và cộng sự (2020) đã chỉ ra vai trò của hệ enzyme

ligninolytic từ một số loài nấm mục trắng, chẳng hạn như *Termetes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* và *Phanerochaete chrysosporium* có vai trò đặc biệt đáng chú ý trong chuyển hóa phế thải có nguồn gốc từ lignocellulose [115].

Ngoài ra, việc cải tiến công nghệ enzyme thông qua các kỹ thuật như tiến hóa protein hoặc thiết kế enzyme tái tổ hợp cũng đóng vai trò quan trọng và đang được nhiều nhà khoa học quan tâm. Tác giả Tatsuki và cộng sự đã nghiên cứu tách dòng thành công enzyme lignin peroxidase từ chủng nấm mục trắng *Phanerochaete sordida* YK-624 [116]. Hoặc enzyme esterase cũng đã được tách dòng thành công từ loài nấm *Thermomyces lanuginosus* [117]. Ở Việt Nam, tác giả Trần Liên Hà (Đại học Bách Khoa Hà Nội) đã nghiên cứu tách dòng và biểu hiện gen mã hóa enzyme xylanase từ nấm *Aspergillus niger* để thủy phân sinh khối lignocellulose [118]. Tác giả Đặng Tất Thành (Viện công nghệ thực phẩm, Hà Nội) phân lập và đánh giá đặc tính chủng *A. brunneoviolaceus* sinh tổng hợp hệ enzyme thủy phân xylan [39]. Nhìn chung, hiện nay đã có rất nhiều nghiên cứu về sinh tổng hợp, thu nhận, và tái tổ hợp enzyme chuyển hóa lignocellulose từ các loài nấm. Những đề tài này đã nghiên cứu một số enzyme nhất định được sản sinh từ nấm và ứng dụng trong công nghiệp, tuy nhiên chưa đi sâu vào nghiên cứu hệ enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm một cách toàn diện. Mặc dù các nghiên cứu này đã mang lại nhiều kết quả quan trọng, nhưng cho đến nay, số lượng các nghiên cứu về ứng dụng hệ enzyme chuyển hóa lignocellulose trên đối tượng nấm ở Việt Nam vẫn còn hạn chế. Điều này đặc biệt đáng chú ý khi Việt Nam sở hữu sự đa dạng phong phú các loài vi sinh vật nấm sống trong các môi trường tự nhiên khác nhau, như rừng nhiệt đới và rừng ngập mặn, nơi tiềm năng của các loài nấm này chưa được khai thác triệt để. Việc nghiên cứu sâu hơn về các hệ enzyme chuyển hóa lignocellulose từ các loài nấm địa phương sẽ không chỉ giúp tăng cường hiểu biết về cơ chế chuyển hóa chất này mà còn mở ra cơ hội ứng dụng trong việc phát triển các công nghệ xử lý và tái chế sinh khối lignocellulose, góp phần tạo ra các sản phẩm thân thiện với môi trường và bền vững cho ngành công nghiệp sinh học.

Hiện nay, các enzyme tham gia phân giải lignocellulose đã được nghiên cứu sâu rộng trong nhiều thập kỷ, chủ yếu tập trung vào ba nhóm enzyme

chính. Trong đó, nhóm enzyme chịu trách nhiệm thủy phân cellulose (thường gọi chung là cellulase) là nhóm được nghiên cứu nhiều nhất và đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp [31, 82]. Đồng thời, nhóm enzyme phân giải hemicellulose cũng nhận được sự quan tâm đáng kể; điển hình là các enzyme thủy phân các polysaccharide của hemicellulose như endoxylanase và β -xylosidase, α -L-arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase và feruloyl esterase [85, 119]. Ngược lại, lignin là thành phần dị vòng phức tạp của lignocellulose, có cấu trúc không đồng nhất, giàu các liên kết thơm và có khả năng kháng phân hủy sinh học cao; do đó quá trình phân giải lignin đòi hỏi sự tham gia của các enzyme oxy hóa mang cơ chế xúc tác phức tạp hơn. Lignin peroxidase và laccase là hai enzyme oxy hóa tiêu biểu có khả năng oxy hóa các cấu trúc lignin phức tạp, đóng vai trò then chốt trong việc khởi phát quá trình phân giải lignin, từ đó tạo điều kiện thuận lợi để các enzyme thủy phân tiếp cận và phân giải cellulose cùng hemicellulose [115]. Tuy nhiên, các enzyme lignin peroxidase và laccase có nguồn gốc từ nấm cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ.

Bên cạnh các enzyme đã được nghiên cứu sâu rộng, vẫn còn một số enzyme ít được khai thác nhưng đang ngày càng thu hút sự quan tâm của cộng đồng khoa học nhờ vào cơ chế xúc tác độc đáo và tiềm năng ứng dụng vượt trội. Điển hình trong số này là cellobiose dehydrogenase (CDH), unspecific peroxygenase (UPO), và nhóm acetyl esterase (đặc biệt là acetyl xylan esterase). Những enzyme này không chỉ bổ sung vào sự đa dạng về cơ chế phân giải lignocellulose mà còn hứa hẹn khắc phục những giới hạn về hiệu suất và tính chọn lọc của hệ enzyme truyền thống. Trên cơ sở đó, luận văn này lựa chọn nghiên cứu năm enzyme bao gồm lignin peroxidase, cellobiose dehydrogenase, laccase và unspecific peroxygenase (thuộc nhóm enzyme oxy hóa), cùng với acetyl esterase (thuộc nhóm enzyme thủy phân).

1.3.2. Đặc điểm enzyme từ nấm

Enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm là một công nghệ tiềm năng, tuy nhiên, giống như mọi công nghệ khác, enzyme này cũng có những ưu và nhược điểm riêng. Một trong những ưu điểm nổi bật là khả năng phân giải lignocellulose hiệu quả. Các enzyme như ligninase, cellulase và xylanase do nấm sản xuất có thể phân giải lignin, cellulose và hemicellulose, những thành

phần chính cấu tạo nên lignocellulose. Trong khi đó, enzyme từ các nguồn khác như vi khuẩn hoặc thực vật tuy cũng có khả năng phân giải lignocellulose, nhưng hiệu quả thường thấp hơn hoặc yêu cầu điều kiện khắc nghiệt hơn. Hệ enzyme của vi khuẩn và thực vật cũng hạn chế hơn so với nấm, đặc biệt là thiếu các enzyme có khả năng phân giải lignin hiệu quả, điều này làm giảm khả năng chuyển hóa lignocellulose thành các sản phẩm có giá trị. Nấm có thể sản xuất một loạt các enzyme lignocellulolytic mạnh mẽ hơn nhờ sự đa dạng và khả năng thích ứng cao trong việc phân hủy các cấu trúc phức tạp của lignocellulose. Ngược lại, mặc dù vi khuẩn có thể phát triển nhanh và sản xuất enzyme với tốc độ cao, nhưng chúng thiếu sự đa dạng enzyme cần thiết để xử lý lignocellulose một cách hiệu quả. Gần đây, tác giả Julian Detain và cộng sự (2024) đã chứng minh rằng hệ enzyme từ nấm mang lại hiệu quả chuyển hóa lignocellulose cao hơn và phù hợp hơn với ngành công nghiệp so với enzyme từ vi khuẩn. Nghiên cứu của họ cho thấy các enzyme từ nấm không chỉ có khả năng phân giải lignocellulose một cách hiệu quả mà còn đáp ứng được các yêu cầu về điều kiện hoạt động trong quy trình công nghiệp, làm tăng khả năng ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm có giá trị từ lignocellulose [37].

Ưu điểm tiếp theo phải kể đến là tính thân thiện với môi trường. So với các phương pháp hóa học, enzyme chuyển hóa lignocellulose là phương pháp sinh học, ít gây ô nhiễm môi trường và không sử dụng các hóa chất độc hại. Điều này giúp giảm thiểu tác động xấu đến hệ sinh thái và bảo vệ sức khỏe con người. Hơn nữa, quá trình sử dụng enzyme để phân giải lignocellulose có thể thực hiện trong điều kiện nhẹ nhàng hơn, không yêu cầu nhiệt độ và áp suất cao như các phương pháp hóa học truyền thống, từ đó tiết kiệm năng lượng và giảm khí thải gây hiệu ứng nhà kính. Nhờ đó, công nghệ này không chỉ mang lại hiệu quả kinh tế mà còn góp phần thúc đẩy phát triển bền vững trong ngành công nghiệp chuyển hóa sinh học. Việc sử dụng enzyme từ nấm có thể giảm chi phí sản xuất so với các phương pháp truyền thống, đồng thời hỗ trợ phát triển bền vững trong các ngành công nghiệp tái chế và năng lượng tái tạo. Các enzyme này không chỉ giúp tối ưu hóa quá trình phân giải lignocellulose mà còn làm giảm nhu cầu sử dụng các hóa chất đắt tiền và năng lượng cao, góp phần vào việc tiết kiệm chi phí trong sản xuất. Hơn nữa,

nhờ vào tính thân thiện với môi trường và khả năng tái sử dụng, công nghệ enzyme từ nấm giúp giảm lượng chất thải và khí thải độc hại, từ đó thúc đẩy các giải pháp năng lượng tái tạo và ứng dụng trong việc chuyển hóa chất thải hữu cơ thành các sản phẩm có giá trị. Điều này không chỉ mang lại lợi ích về mặt kinh tế mà còn hỗ trợ mục tiêu phát triển bền vững, giảm thiểu tác động tiêu cực đến môi trường.

Bên cạnh nhiều ưu điểm nổi bật từ các ứng dụng enzyme từ nấm, vẫn tồn tại một số nhược điểm. Một trong những vấn đề lớn là chi phí sản xuất enzyme khá cao. Việc sản xuất enzyme từ nấm đòi hỏi điều kiện nuôi cấy đặc biệt và quy trình tinh sạch phức tạp, dẫn đến chi phí sản xuất vẫn còn cao hơn so với các phương pháp khác. Hơn nữa, năng suất sản xuất enzyme từ nấm đôi khi không ổn định, và cần thời gian dài để tối ưu hóa quy trình nuôi cấy và thu nhận enzyme. Điều này khiến cho việc áp dụng enzyme từ nấm trong quy mô công nghiệp vẫn gặp một số thách thức, đặc biệt là trong các ngành yêu cầu sản lượng lớn và chi phí thấp. Tuy nhiên, các nghiên cứu và cải tiến công nghệ liên tục đang hướng đến việc giảm thiểu chi phí và nâng cao hiệu quả của quá trình sản xuất enzyme, mở ra triển vọng cho việc ứng dụng rộng rãi trong tương lai. Một nhược điểm khác của enzyme từ nấm là độ ổn định kém trong các điều kiện môi trường không tối ưu. Enzyme có thể mất hoạt tính khi tiếp xúc với nhiệt độ cao hoặc môi trường pH không phù hợp, ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả chuyển hóa lignocellulose trong các ứng dụng công nghiệp. Điều này đặt ra thách thức lớn trong việc duy trì hiệu quả hoạt động của enzyme khi áp dụng ở quy mô lớn hoặc trong các quy trình yêu cầu điều kiện khắc nghiệt. Mặc dù những hạn chế này tồn tại, sự phát triển của công nghệ sinh học, đặc biệt là kỹ thuật cải tiến enzyme và tối ưu hóa điều kiện sản xuất, đang mở ra cơ hội cải thiện những nhược điểm trên, giúp enzyme từ nấm trở thành giải pháp hiệu quả hơn trong công nghiệp chuyển hóa lignocellulose.

1.4. Sơ lược về *Lentinus squarrosulus*, *Coprinellus aureogranulatus*, *Pleurotus pulmonarius* và *Candolleomyces eurysporus*

Trong hệ sinh thái nấm phong phú của vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, nhiều loài nấm có giá trị sinh thái và tiềm năng ứng dụng cao đã được phát hiện và nghiên cứu, trong đó có *Lentinus squarrosulus*, *Coprinellus*

aureogranulatus, *Pleurotus pulmonarius* và *Candolleomyces eurysporus*. Mỗi loài đều mang những đặc điểm sinh học, hình thái và sinh thái học riêng biệt, góp phần làm phong phú thêm sự đa dạng của giới nấm.

Lentinus squarrosulus là một loài nấm hoại sinh thuộc họ Polyporaceae, thường được tìm thấy trên thân cây gỗ mục trong các khu rừng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Mũ nấm có hình tròn hoặc hơi méo, đường kính từ 3–10 cm, bề mặt khô, màu trắng đến trắng ngà hoặc hơi nâu nhạt, được bao phủ bởi các vảy nhỏ, xù xì – đặc điểm “*squarrosulus*” (nghĩa là có vảy gồ ghề) nổi bật giúp nhận biết loài. Mép mũ thường cong xuống ở giai đoạn non và trở nên phẳng hơn khi trưởng thành. Phiến nấm dày, màu trắng, gắn chặt vào cuống và không đổi màu khi chạm vào. Cuống nấm trung tâm hoặc hơi lệch, dài 3–8 cm, chắc và có bề mặt tương tự mũ, cũng phủ các vảy nhỏ. Có hình trụ đến hình elip hẹp, kích thước dao động trong khoảng $6-9 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ [120].



Hình 1.9. Loài nấm *Lentinus squarrosulus* [121].

Bào tử mỏng thành, không màu và không có vách ngăn. Ngoài giá trị dinh dưỡng, loài nấm này còn được quan tâm trong nghiên cứu dược học nhờ chứa các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa. Sự phổ biến của nó trong tự nhiên cùng khả năng phân hủy mạnh mẽ chất lignin khiến nó trở thành một mắt xích quan trọng trong hệ sinh thái rừng.

Coprinellus aureogranulatus là một loài nấm nhỏ thuộc họ Psathyrellaceae, được biết đến nhờ đặc điểm hình thái độc đáo và màu sắc đặc trưng. Mũ nấm có dạng hình chuông hoặc hình trứng khi còn non, sau đó mở rộng dần theo tuổi, thường có đường kính nhỏ, khoảng 1–2 cm. Bề mặt mũ

phủ một lớp hạt nhỏ màu vàng óng ánh như bụi vàng – đặc điểm nổi bật đã tạo nên tên gọi “*aureogranulatus*” (từ tiếng Latinh: *aureus* = vàng, *granulatus* = dạng hạt). Phiến nấm ban đầu có màu trắng, sau chuyển dần sang xám rồi đen và phân hủy theo kiểu tự tiêu, điển hình của các loài trong chi *Coprinellus*. Cuống nấm mảnh, màu trắng đến hơi vàng nhạt, rỗng, thường dài hơn mũ, không có vòng. Loài này thường mọc trên đất giàu mùn hoặc gỗ mục, đặc biệt trong môi trường ẩm ướt như rừng mưa nhiệt đới. *Coprinellus aureogranulatus* là loài nấm hiếm, chủ yếu được ghi nhận ở khu vực Đông Nam Á, với rất ít tài liệu mô tả chi tiết, làm cho nó trở thành đối tượng quan trọng trong nghiên cứu đa dạng sinh học và phân loại nấm học [122].



Hình 1.10. Loài nấm *Coprinellus aureogranulatus* [123].

Pleurotus pulmonarius, thường được gọi là nấm sò trắng hoặc nấm sò phổi, là một loài nấm ăn được phổ biến thuộc họ Pleurotaceae. Loài nấm này có mũ nấm hình quạt hoặc hình vỏ sò, kích thước dao động từ 5–15 cm, màu trắng đến trắng ngà hoặc hơi xám, bề mặt mịn, đôi khi có vết nứt nhẹ khi già. Mép mũ thường cong xuống lúc non và dần trở nên phẳng hoặc hơi uốn lượn khi trưởng thành. Phiến nấm màu trắng, dày và sát nhau, kéo dài xuống cuống (dạng phiến xếp lệch). Cuống nấm ngắn, đôi khi gần như không có, thường mọc lệch một bên, có màu tương tự mũ và bề mặt mịn. Bào tử của loài này không màu, hình bầu dục, được phát tán qua không khí. *Pleurotus pulmonarius* là loài nấm hoại sinh, thường mọc thành cụm trên thân hoặc gốc cây gỗ mục, đặc biệt là gỗ cứng như cây liêu, dương hoặc dẻ. Nấm phân bố rộng khắp thế giới, từ vùng ôn đới đến nhiệt đới. Đây là một loài nấm có giá trị dinh dưỡng cao, giàu protein, vitamin và chất chống oxy hóa, được nuôi

trồng phổ biến và sử dụng rộng rãi trong ẩm thực. So với các loài khác trong chi *Pleurotus*, nấm sò phổi có khả năng sinh trưởng tốt ở điều kiện nhiệt độ cao hơn và thích nghi linh hoạt với nhiều loại cơ chất khác nhau [124].



Hình 1.11. Loài nấm *Pleurotus pulmonarius* [125].

Cuối cùng, *Candolleomyces eurysporus* là một loài nấm thuộc họ Psathyrellaceae và sau đó được chuyển sang chi *Candolleomyces* vào năm 2020. Loài nấm này có mũ nấm hình chuông hoặc hơi phẳng khi trưởng thành, với đường kính khoảng 2–5 cm, màu nâu nhạt và dễ rách với những vết nứt nhỏ. Các phiến nấm tự do, dày đặc, có màu từ xám nâu đến nâu sẫm khi già và đôi khi có rìa trắng, còn cuống nấm dài khoảng 5–10 cm, mảnh, màu trắng đến hơi nâu nhạt, trơn và dễ gãy, không có vòng. Đặc điểm nổi bật của loài này là sự đa dạng về kích thước và hình dạng của bào tử, điều này được thể hiện qua tên “*eurysporus*” (từ tiếng Hy Lạp có nghĩa là “bào tử rộng”). Sinh thái học cho thấy *Candolleomyces eurysporus* thường mọc đơn lẻ hoặc rải rác trên đất giàu mùn, thường gặp gần gốc cây mục hoặc lá mục trong rừng nhiệt đới hoặc rừng hỗn giao [126].



Hình 1.12. Loài nấm *Candolleomyces eurysporus* [126].

Bốn loài nấm trên được xem là những ứng viên đầy triển vọng trong nghiên cứu thu nhận enzyme chuyển hóa lignocellulose, nhờ khả năng sinh trưởng mạnh mẽ trên các loại cơ chất tự nhiên giàu lignin và cellulose. Đặc biệt, chúng nổi bật với khả năng tiết ra các enzyme oxy hóa lignin như lignin peroxidase, manganese peroxidase và laccase,... [122, 127]. Bên cạnh đó, các loài nấm này còn có thể sản sinh hệ enzyme cellulase đa dạng, bao gồm endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidase, góp phần thúc đẩy quá trình phân giải cellulose hiệu quả,... [114, 124]. Việc khai thác và tối ưu hóa hoạt tính enzyme từ các loài nấm này hứa hẹn mang lại nhiều đột phá trong công nghệ sinh học ứng dụng lignocellulose.

1.5. Sơ lược tình hình nghiên cứu nấm lớn ở Việt Nam

Việt Nam được biết đến là một trong những quốc gia có mức độ đa dạng sinh học cao bậc nhất trong khu vực Đông Nam Á, nhờ vào vị trí địa lý nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa, cùng với địa hình đa dạng, khí hậu phân hoá phức tạp và hệ sinh thái phong phú. Trong đó, hệ nấm (Fungi) – đặc biệt là nhóm nấm lớn (macrofungi) – là một trong những nhóm sinh vật quan trọng không chỉ về mặt sinh thái mà còn về giá trị kinh tế và ứng dụng thực tiễn. Các loài nấm lớn đóng vai trò thiết yếu trong chu trình phân giải chất hữu cơ, tái tạo dinh dưỡng cho đất rừng, đồng thời nhiều loài còn sở hữu tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như y dược, công nghiệp thực phẩm, công nghệ enzyme và bảo vệ môi trường [128]. Hiện nay, nấm lớn được ghi nhận phân bố rộng rãi tại nhiều hệ sinh thái khác nhau ở Việt Nam, đặc biệt phong phú tại các khu vực rừng nguyên sinh, rừng thứ sinh, rừng trên

núi đá vôi và các hệ sinh thái núi cao. Tuy nhiên, số lượng loài nấm thực sự hiện diện tại Việt Nam đến nay vẫn chưa được xác định một cách đầy đủ và chính xác. Theo tác giả Trịnh Tam Kiệt, ước tính Việt Nam có thể sở hữu khoảng 14.000 đến 22.000 loài nấm lớn, trong đó khoảng 50% là những loài có thể sử dụng làm thực phẩm, và gần 7.000 loài được ghi nhận có hoạt tính dược lý hoặc tiềm năng làm thuốc [129]. Ngoài ra, có khoảng 2.000 loài nấm được cho là có khả năng nuôi trồng với giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, con số này mới chỉ là ước lượng dựa trên mô hình thống kê và kinh nghiệm thực địa, bởi trên thực tế, còn rất nhiều loài nấm chưa được phát hiện, định danh hay ghi nhận chính thức vào danh mục nấm Việt Nam. Điều này cho thấy tiềm năng to lớn của Việt Nam trong việc nghiên cứu, bảo tồn và khai thác tài nguyên nấm lớn, đặc biệt là trong bối cảnh xu hướng sử dụng các hợp chất tự nhiên, thực phẩm chức năng và enzyme sinh học đang ngày càng gia tăng.

Vườn quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mù Cang Lũn (Điện Biên) là hai khu vực tiêu biểu với điều kiện tự nhiên thuận lợi, ghi nhận sự hiện diện của nhiều loài nấm lớn, bao gồm cả các loài có giá trị dược liệu và enzyme cao như *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Lentinus squarrosulus*...[130]. Tuy nhiên, đến nay, nghiên cứu đa dạng nấm tại Vườn Quốc gia Cúc Phương vẫn còn khá hạn chế. Duwe và cộng sự (2022) đã tổng hợp và mô tả chi tiết về sự đa dạng nấm tại khu vực này dựa trên các nghiên cứu trước đó [130]. Cụ thể, VQG Cúc Phương được phát hiện tổng cộng hơn 300 loài nấm. Đặc biệt, nhóm nghiên cứu từ Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, trong quá trình khảo sát họ nấm túi Xylariaceae tại Vườn Quốc gia Cúc Phương, đã phát hiện được hai loài nấm thuộc chi *Biscogniauxia*. Đây là những mẫu nấm đầu tiên thuộc chi này được phát hiện, miêu tả và ghi nhận tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu này đã đưa tổng số chi nấm túi thuộc họ Xylariaceae ở Việt Nam lên 12 chi, trong số 74 chi đã công bố trên thế giới [131]. Nhiều loài nấm thu được tại khu vực này cũng tập trung vào tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học, như *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes maxima*, *Trametes versicolor*, *Xylaria schweinitzii*) và vi nấm như *Fusarium proliferatum*, *Trichoderma reesei* [132, 133]. Tại rừng Mù Cang Lũn, hiện nay có rất ít nghiên cứu về sự đa dạng nấm tại khu vực này. Nổi bật trong số đó là nghiên cứu của tác giả Dương Minh Lam, tập

trung vào sự đa dạng của các thành viên thuộc họ Xylariaceae. Nghiên cứu này đã ghi nhận các loài thuộc chi *Hypoxylon* và một số loài trong chi *Annulohypoxylon*, góp phần làm phong phú thêm hiểu biết về đa dạng sinh học của rừng Mùòng Phăng [134]. Những phát hiện bước đầu tại hai khu vực Cúc Phương và Mùòng Phăng không chỉ đóng góp vào việc hoàn thiện bức tranh đa dạng sinh học nấm lớn ở Việt Nam, mà còn mở ra những triển vọng to lớn trong việc khai thác, ứng dụng và phát triển các giá trị sinh học đặc thù của nhóm sinh vật này. Trong bối cảnh hiện nay, khi nhu cầu sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, thân thiện với môi trường ngày càng tăng cao, nấm lớn đang trở thành một nguồn tài nguyên sinh học xanh đầy hứa hẹn, có thể phục vụ cho nhiều lĩnh vực khác nhau.

CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Vật liệu và hóa chất

Các mẫu quả thể nấm, thu hoạch vào mùa mưa (tháng 10) từ rừng quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mùòng Phăng (Điện Biên), được lưu trữ tại phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học, 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 [135].



Hình 2.1. Mẫu lignin sử dụng cho nghiên cứu chuyên hóa sinh học.

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.

Các hóa chất đa lượng, vi lượng sử dụng trong thí nghiệm: KH_2PO_4 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , K_2HPO_4 , CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , HCl , glucose, agar, ethanol 96°.

Một số hóa chất xác định hoạt tính enzyme: 5-nitro-1,3-benzodioxole, hydro peroxide (H_2O_2), acetonitril, 4-nitrocatechol, NaF , 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 4-aminoantipyrine, 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic axit (ABTS).

2.1.2. Thiết bị

Thiết bị được sử dụng: Tủ ẩm nuôi cấy vi sinh box–Laminar (Đức), bể ổn nhiệt –Memmert (Đức), cân điện tử AL300 (Thụy Sĩ), tủ lạnh Sanyo (Nhật Bản), nồi thanh trùng Lequex (Pháp), máy li tâm (Đức), máy vortex (Mỹ), máy lắc ngang (Đức), máy đo pH (Đức), kính hiển vi Olympus (Đức), máy điện di DNA (i-Mupid - Nhật Bản), máy đo quang phổ Nanodrop (Mỹ), Máy PCR (Mastercycler Nexus, Đức), hệ thống tinh sạch protein ÄKTA pure™ (Thụy Điển), Erlenmeyer 2L, 3L, hệ thống siêu lọc 10 kDa cut-off, amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore, Bedford, USA) ...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm

Quả thể nấm tươi được rửa bằng nước sạch, ngâm trong cồn 70 độ trong một phút để khử trùng, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Dùng dao nhọn đã được khử trùng tách bỏ phần mô phía ngoài, cắt lấy phần mô bên trong thành những mảnh nhỏ có kích thước khoảng 5-10 mm. Cấy các mảnh mô đó vào môi trường thạch malt (maltose 12,5 g/l, dextrin 2,5 g/l, glycerol 1,0 g/l, peptocomplex 2,6 g/l và agar 17,0 g/l) trên đĩa petri có bổ sung các loại kháng sinh (nystatin 40 g/l, chloramphenicol 30 g/l, penicillin 40 g/l, streptomycin 40 g/l và benomyl 50 g/l), ủ ở nhiệt độ 25°C, sau khoảng 24-72 giờ hệ sợi bắt đầu mọc. Tách lấy hệ sợi nấm sang ống nghiệm thạch nghiêng PDA (glucose 20 g/l, khoai tây 200 g/l, agar 20 g/l và pH 7,0), tiếp tục nuôi cấy trong 12 ngày, khi hệ sợi màu trắng bao phủ hết bề mặt môi trường thì có thể sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo [136].

2.2.2. Định danh nấm

2.2.2.1. Định danh nấm bằng phương pháp hình thái giải phẫu

Chủng nấm mới sẽ được định tên theo hình thái giải phẫu so sánh và các tài liệu của Roberts & Evans (2011) và Jean Polese (2000) [121, 137]. Hình dáng, kích thước, màu sắc và cấu tạo của nấm được xác định dựa trên đặc điểm mũ, phiến và bào tử. Tai nấm được quan sát hình thái bên ngoài và hình thái cắt dọc. Hình thái giải phẫu phiến (phiến cắt ngang) được quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 100 lần (X10) và 400 lần (X40). Hình

dạng và kích thước bào tử được quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 (X40).

2.2.2.2. Định danh nấm bằng phương pháp sinh học phân tử

a. Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ hệ sợi của nấm theo phương pháp CTAB của Doyle và cộng sự có cải tiến (1987). Sau đó DNA được kiểm tra bởi điện di trên gel agarose 0,8% (80 - 100 V). Độ tinh sạch và hàm lượng DNA tổng số được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng $\lambda = 260$ nm và 280 nm. DNA được tinh sạch bằng bộ kit Genomic DNA Purification (Thermo Fisher, Mỹ) và các bước được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

b. Nhân gen ITS bằng phương pháp PCR

Vùng ITS được khuếch đại từ hệ gen của nấm bằng phương pháp PCR bởi cặp mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' [138]. Phản ứng PCR có tổng thể tích 25 μ L bao gồm: 13 μ L H₂O; 1 μ L MgCl₂ 25 mM; 2,5 μ L dNTPs 2,5 mM; 1,25 μ L mồi xuôi (10 pmol/ μ L); 1,25 μ L mồi ngược (10 pmol/ μ L); 3 μ L DNA (10-20 ng); 0,5 μ L Taq polymerase (5 U μ l); 2,5 μ L đệm 10X.

Phản ứng PCR diễn ra với chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 3 phút; sau đó là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94°C trong 45 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây; kéo dài ở 72°C trong 10 phút, và giữ sản phẩm ở 4°C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% và tinh sạch bằng Qiaquick Gel Extraction KIT (Qiagen, CHLB Đức). Sản phẩm tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp hai chiều với mồi ITS1/ITS4, sử dụng BigDye Terminator Cyclor v3.1 và kết quả được đọc trên hệ thống ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Trình tự DNA sau đó được hiệu chỉnh bởi phần mềm ChromasPro1.7.6 (Technelysium Pty Ltd., Australia) để loại bỏ các vùng tín hiệu bị nhiễu. Trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 [4], geneDoc 2.7 [5]. Trình tự nucleotide ITS thu được sau đó được so sánh

với các trình tự đã có trên GenBank, sử dụng phần mềm BLAST trong NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>].

c. Xây dựng cây tiến hóa di truyền

Cây tiến hóa mô tả mối quan hệ di truyền gen ITS được xây dựng theo phương pháp ML (maximum likelihood), dữ liệu DNA được chuyển vào phần mềm Bioedit v7.0.5.2, Clustal W, geneDoc 2.7 với các thông số tiến hóa (giá trị tỷ lệ các điểm không biến thiên, giá trị thông số gamma, giá trị mô hình tiến hóa...) được lấy từ phân tích của mô hình tiến hóa Modeltest v3.7. Tất cả cây tiến hóa đều được phân tích bằng phần mềm PAUP*4.0 b10 (Swofford, 2003) và Mega 6.0.6 [139]. Hiệu chỉnh hình ảnh cây tiến hóa được thực hiện bởi phần mềm.

2.2.3. Nghiên cứu sinh tổng hợp enzyme từ nấm

Nấm được nuôi cấy trên môi trường thạch PDA (Potato Dextrose Agar, gồm dịch chiết khoai tây 200 g/L, dextrose 20 g/L, agar 15–20 g/L, pH 5,6) trên đĩa petri, sau đó khuẩn ty được nghiền đồng thể trong nước muối sinh lý (0,9% NaCl). Tiếp theo, dịch khuẩn ty được cấy chuyển vào bình lên men chứa cơ chất rom và các thành phần dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của nấm. Thành phần dinh dưỡng như sau: MgSO_4 0,5 g/L; KH_2PO_4 1,5 g/L; dịch vi lượng 0,1 L ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, NaCl 1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L, CaCl_2 80 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 180 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L và H_3BO_3 10 mg/L), cao nấm men hoặc peptone (5 g/L), và 2% (w/v). Nhiệt độ và pH được điều chỉnh thích hợp theo từng chủng 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

2.2.4.1. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng nấm chọn lọc

Các chủng nấm được nuôi lỏng trong bình tam giác chứa môi trường dinh dưỡng đầy đủ (thành phần chi tiết được trình bày tại mục 2.2.3) nhằm đảm bảo cung cấp đầy đủ nguồn cacbon, nitơ, khoáng và vi lượng cho sự phát triển. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trên máy lắc ở tốc độ 225 vòng/phút để duy trì sự phân tán đồng đều của sợi nấm và tăng cường trao đổi oxy.

Để khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến sự sinh trưởng, các thí nghiệm được bố trí ở các giá trị pH từ 4,0 đến 7,0 và nhiệt độ ủ từ 23 °C đến 37 °C. Cứ 3 ngày tiến hành xác định lượng sinh khối khô để đánh giá khả năng sinh trưởng của nấm ở dải pH và nhiệt độ nghiên cứu.

2.2.4.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng của các chủng nấm chọn lọc

Môi trường nuôi cấy được chuẩn bị theo thành phần nêu tại mục 2.2.3, với pH và nhiệt độ duy trì ở điều kiện tối ưu. Nguồn nitơ được thay đổi bao gồm: KNO₃ 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, NaNO₃ 5 g/L, peptone 5 g/L và cao nấm men 5 g/L. Sinh khối được xác định định kỳ 3 ngày/lần nhằm đánh giá ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng của nấm.

2.2.5. Phương pháp đo hoạt độ enzyme

2.2.5.1. Acetyl esterase (EC 3.1.1.6)

Hoạt độ của enzyme acetyl esterase được xác định bằng phương pháp đo quang ở $\lambda=405$ nm dựa trên sự tạo thành *p*-nitrophenol từ cơ chất *p*-nitrophenyl acetate. Nồng độ cuối của cơ chất là 1 mM trong đệm phosphate (100 mM, pH 6,0). Phản ứng diễn ra ở 37°C trên phiên vi lượng 96 giếng trong 10 phút. Một đơn vị hoạt độ acetyl esterase (U/mL) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol *p*-nitrophenol trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm [140]. Hoạt độ được tính toán dựa trên đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ *p*-nitrophenol (Phụ lục 3).

2.2.5.2. Cellobiose dehydrogenase (EC 1.1.99.18)

Hoạt độ của enzyme cellobiose dehydrogenase được xác định bằng phương pháp oxi hóa cơ chất 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP, sigma). Phản ứng được thực hiện trong tổng thể tích 200 μ L bao gồm 20 μ L enzyme, 20 μ L lactose 300 mM, 20 μ L DCIP 3 mM, 10 μ L NaF 80 mM (khử hoạt tính laccase) và 130 μ L đệm sodium acetate 100 mM pH 4,0. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 5 phút và kết quả được kiểm tra ở bước sóng 520 nm. Một đơn vị hoạt độ cellobiose dehydrogenase (U/mL) là lượng enzyme cần thiết để xúc tác oxy hóa 1 μ mol lactose mỗi phút ở điều kiện phản ứng [141, 142]. Hoạt độ được tính toán dựa trên đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ lactose (Phụ lục 3).

2.2.5.3. Laccase (EC 1.10.3.2)

Hoạt độ của enzyme laccase được xác định bằng đo quang phổ với cơ chất được sử dụng là ABTS (2,2'-azino-di- [3-ethyl-benzothiazoline- (6) -sulphonic axit], Boehringer). Hỗn hợp phản ứng có tổng thể tích 3 mL bao gồm 2,3 mL enzyme được pha loãng vào dung dịch đệm (axit succinic 0,025 M, pH 4,5) và 0,7 mL 0,02 M ABTS. Kết quả phản ứng được xác định ở bước sóng 415 nm ở 25°C trong 2 phút. Một đơn vị hoạt độ laccase (U/mL) là lượng enzyme cần thiết để xúc tác oxy hóa 1 μmol ABTS mỗi phút ở điều kiện phản ứng [143]. Hoạt độ được tính toán dựa trên đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ ABTS (Phụ lục 3).

2.2.5.4. Lignin peroxidase (EC 1.11.1.14)

Hoạt độ lignin peroxidase được xác định bằng sự oxy hóa của cơ chất 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). Tổng thể tích của phản ứng là 1 mL trong đó có dung dịch đệm natri succinat 100 mM (pH 5,5), 1,0 mM 2,4-DCP, 4,0 mM H_2O_2 , 82 mM 4-aminoantipyrine và 100 μL dịch enzyme. Phản ứng được bắt đầu khi bổ sung hydro peroxide và được xác định ở bước sóng 510 nm trong 5 phút ở 25°C. Một đơn vị hoạt độ lignin peroxidase (U/mL) là lượng enzyme cần thiết để xúc tác oxy hóa 1 μmol 2,4-DCP mỗi phút ở điều kiện phản ứng [144]. Hoạt độ được tính toán dựa trên đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ 2,4-DCP (Phụ lục 3).

2.2.5.5. Unspecific peroxygenase (UPO, EC 1.11.2.1)

Hoạt độ UPO được xác định bằng cách sử dụng ABTS làm cơ chất. Thể tích cuối cùng là 1 mL trong hỗn hợp phản ứng chứa dung dịch đệm sodium tartrate 100 mM (pH 3,0), 5 mM ABTS, 50 mM hydrogen peroxide và lượng dịch enzyme phù hợp. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm hydrogen peroxide và sự gia tăng độ hấp thụ được đo ở bước sóng 420 nm trong 1 phút ở 30°C [66]. Một đơn vị hoạt độ UPO (U/mL) là lượng enzyme cần thiết để xúc tác oxy hóa 1 μmol ABTS mỗi phút ở điều kiện phản ứng (Phụ lục 3).

2.2.6. Tinh sạch enzyme tự nhiên

2.2.6.1. Tách chiết dịch enzyme thô bằng siêu lọc

Sau khi đã nuôi cấy ở những điều kiện thích hợp, dịch thô enzyme được lọc sơ bộ qua vải thô và giấy lọc (GF6 và RC 55, Whatman™). Để loại bỏ khuẩn ty và cơ chất, dịch chiết được ly tâm 5.000-10.000 vòng/phút bằng hệ thống siêu lọc 10 và 30 kDa cut-off (hệ LongerPump K235 với màng UFP 30MW, Amersham BioScience, Westborough, MA, USA) ở 11°C.

2.2.6.2. Tinh sạch protein enzyme bằng sắc ký lỏng (FPLC)

Dịch enzyme thô được tinh sạch bằng hệ thống sắc ký ÄKTA Pure (GE Healthcare, Đức), với quá trình theo dõi được thực hiện tại bước sóng 280 nm bằng máy dò tích hợp. Protein tinh sạch thu được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.

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

Dịch enzyme thô được loại bỏ sinh khối và khuẩn ty thông qua quá trình ly tâm ở tốc độ 5.000–10.000 vòng/phút, sau đó xử lý bằng siêu lọc với màng cắt phân tử 10 và 30 kDa. Quá trình tinh sạch enzyme esterase từ dịch enzyme thô của nấm mục trắng *L. squarrosulus* MPN 12 được thực hiện bằng hệ thống sắc ký lỏng FPLC, qua các bước trao đổi ion và lọc gel. Ban đầu, dịch enzyme thô được tinh sạch qua cột trao đổi ion DEAE Cellulose, sử dụng đệm Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), và enzyme được rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 2,0 M NaCl. Các phân đoạn có hoạt tính được thu gom và tiếp tục tinh sạch bằng sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G100, sử dụng đệm Tris-HCl 20 mM chứa 100 mM NaCl (pH 7,5). Phân đoạn chứa hoạt tính LsAE được thu thập, trộn lẫn, cô đặc, và thẩm tách qua màng lọc 10 kDa trong đệm Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Cuối cùng, dịch enzyme được xử lý trên cột HiTrap™ Q XL với đệm Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 1,5 M NaCl.

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

Dịch enzyme thô được loại sinh khối và khuẩn ty bằng phương pháp ly tâm 5.000-10.000 vòng/phút và siêu lọc 10 và 30 kDa cut-off. Dịch chiết chứa enzyme cellobiose dehydrogenase (*CauCDH*) được tinh sạch qua nhiều bước

sắc ký bằng hệ thống FPLC. Đầu tiên, dịch enzyme thô được xử lý trên cột trao đổi ion DEAE Sepharose tại pH 5,5 với đệm Na-acetate 50 mM và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 1,5 M NaCl. Các phân đoạn có hoạt tính được thu gom và tiếp tục tinh sạch bằng sắc ký lọc gel trên cột Superdex /G00, sử dụng đệm Na-acetate 50 mM chứa 100 mM NaCl ở pH 5,5. Phân đoạn chứa hoạt tính *CauCDH* được thu thập, cô đặc, và thẩm tách qua màng lọc 10 kDa trong đệm Na-acetate 10 mM (pH 5,5). Cuối cùng, dịch enzyme được đưa lên cột sắc ký HiTrap™ Q FF và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 0,5 M NaCl để đạt độ tinh sạch cao nhất.

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

Dịch enzyme thô được loại sinh khối và khuẩn ty bằng phương pháp ly tâm 5.000-10.000 vòng/phút và siêu lọc 10 và 30 kDa cut-off. Dịch chiết thô chứa enzyme *PleuLac* được tinh sạch qua ba bước sắc ký lần lượt sử dụng các cột DEAE Cellulose, Sephadex G100 và HiTrap™ Q XL. Ban đầu, dịch chiết được đưa lên cột trao đổi ion DEAE Cellulose tại pH 7,5 với đệm Tris-HCl 20 mM, sau đó enzyme được rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 2,0 M NaCl. Các phân đoạn có hoạt tính thu được tiếp tục được tinh sạch bằng sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G100, sử dụng đệm Tris-HCl 20 mM chứa 100 mM NaCl ở pH 7,5. Các phân đoạn có hoạt tính enzyme được thu gom, trộn lẫn, cô đặc và thẩm tách qua màng lọc kích thước 10 kDa trong đệm Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Cuối cùng, dịch enzyme thu được được đưa qua cột HiTrap™ Q XL, sử dụng đệm Tris-HCl 20 mM tại pH 7,5 và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 1,5 M NaCl để hoàn tất quá trình tinh sạch.

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

Dịch enzyme thô được loại sinh khối và khuẩn ty bằng phương pháp ly tâm 5.000-10.000 vòng/phút và siêu lọc 10 và 30 kDa cut-off. Dịch chiết thô được tinh sạch qua ba bước sắc ký liên tiếp: trao đổi ion trên cột DEAE Cellulose, lọc gel trên cột Sephadex G100, và cuối cùng là trao đổi ion trên cột HiTrap™ Q XL. Ban đầu, dịch chiết được xử lý trên cột trao đổi ion DEAE Cellulose tại pH 7,5, sử dụng đệm Tris-HCl 20 mM và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 1,5 M NaCl. Tiếp theo, sắc ký lọc gel được thực hiện trên cột Sephadex G100, sử dụng đệm Tris-HCl 20 mM chứa 100 mM NaCl ở pH 7,5, để thu nhận các phân đoạn có hoạt tính *LsLiP*. Phân đoạn chứa hoạt

tính được thu gom, trộn lẫn, cô đặc và thẩm tách qua màng lọc kích thước 10 kDa trong đệm Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Sau đó, dịch enzyme được xử lý trên cột HiTrap™ Q XL và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 1,0 M NaCl để hoàn tất quá trình tinh sạch.

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

Dịch enzyme thô được loại sinh khối và khuẩn ty bằng phương pháp ly tâm 5.000-10.000 vòng/phút và siêu lọc 10 và 30 kDa cut-off. Dịch chiết có hoạt tính unspecific peroxygenase được tinh sạch bởi sắc ký qua các cột trao đổi ion và sắc ký lọc gel. Ban đầu, dịch chiết thô được đưa lên cột trao đổi ion DEAE Cellulose ở pH 5,5 với đệm Na-acetate 50 mM và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 1,5 M NaCl. Sau đó, các phân đoạn có hoạt tính được thu gom và tiếp tục tinh sạch bằng sắc ký lọc gel trên cột Superdex G-75, sử dụng đệm Na-acetate 50 mM và NaCl 100 mM ở pH 5,5. Phân đoạn chứa hoạt tính CeuUPO sau đó được trộn lẫn, cô đặc, và thẩm tách qua màng lọc 10 kDa với đệm Na-acetate 10 mM (pH 5,5). Tiếp theo, dịch enzyme được đưa lên cột Mono Q™ và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 0,25 M NaCl.

2.2.6.3. Xác định nồng độ protein

Nồng độ protein tổng trong dịch chiết và các phân đoạn tinh sạch được xác định bằng phương pháp Bradford (1976) và protein chuẩn BSA (bovine serum albumin) [145]. Trong đó, 800 µL mẫu được pha loãng trong đệm PBS (50 mM, pH 7,0) ở các nồng độ khác nhau, bổ sung thêm 200 µL thuốc thử Bradford 5X, trộn đều và để ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 phút, rồi tiến hành đo mẫu ở $\lambda=595$ nm.

2.2.6.4. Xác định độ sạch của enzyme bằng điện di gel polyacrylamide (SDS-PAGE)

Điện di biến tính SDS-PAGE được thực hiện theo phương pháp của Weber và Osborn [146]. Gel tách chứa 12% acrylamide trong đệm Tris-HCl pH 8,8, trong khi gel cô chứa 5% acrylamide trong đệm Tris-HCl pH 6,8. Phương pháp điện di này được sử dụng để xác định khối lượng phân tử (M_w) và đánh giá độ tinh sạch của enzyme protein trong điều kiện biến tính. Protein sau khi phân tách được nhuộm bởi thuốc nhuộm 0,1% coomassie brilliant blue R-250 (w/v) trong đệm acetic acid/methanol/water (v/v/v) (1:4:5) và

nhuộm bạc. Sau đó gel được rửa sạch bằng dung dịch tẩy nhuộm cho đến khi quan sát được rõ ràng các băng protein. Gel điện di được ghi ảnh trên thiết bị ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Lifesciences/ Cytiva, Washington, D.C., U.S.) và phân tích hình ảnh (độ tinh sạch) qua sự xuất hiện của các băng protein bởi phần mềm tích hợp.

2.2.7. Xác định đặc tính của enzyme tinh sạch

2.2.7.1. Xác định nhiệt độ và pH tối ưu của enzyme tinh sạch

Mỗi loại enzyme có khoảng nhiệt độ khảo sát khác nhau. Enzyme acetyl esterase, cellobiose dehydrogenase, laccase và lignin peroxidase lần lượt có khoảng nhiệt độ khảo sát là 20-55°C, 30-70°C, 30-60°C và 20-55°C. Thí nghiệm khảo sát nhiệt độ tối ưu được tiến hành ở pH=5,5.

Giá trị pH tối ưu của các enzyme được xác định trong dải pH từ 4,0-8,0 sử dụng đệm sodium acetate 100 mM (pH 4,0-5,5) và đệm sodium-phosphate 100 mM (pH 6,0-8,0). Thí nghiệm khảo sát pH được tiến hành ở nhiệt độ tối ưu của từng enzyme.

2.2.7.2. Xác định độ bền nhiệt và độ bền pH của enzyme tinh sạch

Acetyl esterase

Độ bền nhiệt của acetyl esterase được xác định khi dịch enzyme được ủ ở nhiệt độ trong khoảng 4-60°C tại pH tối ưu, ủ trong 120 phút. Độ bền pH được xác định tại ba điểm pH 3,0; pH 5,0 và pH 7,0; ủ ở nhiệt độ tối ưu trong khoảng 1-6 giờ.

Cellobiose dehydrogenase

Độ bền nhiệt của cellobiose dehydrogenase được xác định khi dịch enzyme được ủ ở nhiệt độ trong khoảng 25-70°C tại pH tối ưu, trong khoảng 0-12 giờ. Độ bền pH được xác định tại ba điểm pH 4,0; pH 7,0 và pH 8,0; ủ ở nhiệt độ tối ưu trong khoảng 0-12 giờ.

Laccase

Độ bền nhiệt của laccase được xác định khi dịch enzyme được ủ ở nhiệt độ trong khoảng 25-70°C tại pH tối ưu, ủ trong 120 phút. Độ bền pH được xác định tại ba điểm pH 5,0; pH 6,0 và pH 7,0; ủ ở nhiệt độ tối ưu trong khoảng 1-6 giờ.

Lignin peroxidase

Độ bền nhiệt của lignin peroxidase được xác định khi dịch enzyme được ủ ở nhiệt độ trong khoảng 4-60°C tại pH tối ưu, ủ trong 120 phút. Độ bền pH được xác định tại ba điểm pH 4,0; pH 6,0 và pH 8; ủ ở nhiệt độ tối ưu trong khoảng 1-6 giờ.

2.2.7.3. Xác định hằng số động học xúc tác

Động học xúc tác của enzyme tinh sạch được xác định dựa vào hằng số Michaelis-Menten (K_m) và hằng số xúc tác (k_{cat}) với dải nồng độ cơ chất phù hợp. K_m và k_{cat} được tính toán dựa trên đường chuẩn Lineweaver-Burk plot. Enzyme được ủ trong điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu, và xác định ở bước sóng phù hợp cho mỗi cơ chất [147].

2.2.8. Xúc tác chuyển hóa sinh học vật liệu lignin

Chuyển hóa vật liệu lignin được thực hiện bởi sự oxy hóa của enzyme lignin peroxidase được tinh sạch từ chủng nấm *Lentinus squarrosulus* MPN12 (LsLiP). Tổng hỗn hợp phản ứng gồm 10 mL, có chứa các thành phần sau: 0,1 g lignin, 3,3 mL ethanol (96%), 40 mM H_2O_2 và enzyme LsLiP trong 100 mM sodium acetate ở pH 5,0, được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 72 giờ và lắc ở tốc độ 150 vòng/phút. Những thay đổi trong quá trình phân hủy sinh học lignin được xác định bằng cách sử dụng phép phân tích quang phổ hồng ngoại fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Trong nghiên cứu này, kết quả đo FTIR được thực hiện bởi trường Đại học Bách khoa - Đại học Quốc gia TP.HCM.

2.2.9. Xúc tác chuyển hóa sinh học vật liệu rơm bằng “enzyme cocktail”

Cơ chất rơm được nghiền thành bột mịn (kích thước hạt $40 \times 40 \mu m$, đo bằng kính hiển vi). Rơm (3%, w/v) được ủ với enzyme cellobiose dehydrogenase (CDH, 28,86 U/mg; pH_{opt} 5,0; t_{opt} 45°C) xúc tác hiệp đồng với carboxymethyl cellulase/glucuronoxylanase (Cell/Xyl; hoạt độ riêng 1,6 U/mg; pH_{opt} 5,0-5,5; t_{opt} 50°C) và acetyl esterase (AE; 1,3 U/mg; pH_{opt} 5,0; t_{opt} 42°C) trong dung dịch đệm sodium acetate 100 mM ở pH 6,0 và 37°C, lắc liên tục ở 200 vòng/phút. Để đánh giá tác động hiệp đồng và đơn lẻ của từng enzyme, quá trình xúc tác enzyme được đánh giá với riêng từng enzyme và với tất cả các enzyme đã được thử nghiệm. Đối chứng có chứa enzyme biến

tính bằng nhiệt (95°C trong 15 phút) được sử dụng để so sánh. Sau đó, các phần dịch được lấy và lượng carbohydrate giải phóng được định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (series 1200, Agilent, Waldbronn, Đức).

2.2.10. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Để xác định được thành phần và hàm lượng các loại đường đơn (glucose và xylose) và axit gluconic, hỗn hợp phản ứng được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút và sau đó được chuyển sang các lọ đựng mẫu cho HPLC thể tích 1,5 mL và tiến hành phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC, 1200 series, Agilent, Waldbronn, Đức). Pha động là axit sulfuric 0,01 N. Khi dung môi rửa giải đi qua, dựa vào khả năng phân bố khác nhau các cấu tử sẽ lần lượt được rửa giải ra khỏi cột theo thứ tự khác nhau. Căn cứ vào thời gian lưu của từng chất và so sánh với chất chuẩn, có thể kết luận về thành phần các chất có trong dung dịch mẫu. Đối với mẫu phân tích các đường đơn (glucose và xylose), sử dụng cột sắc ký ion-exclusion RezexTM (RPM-Monosaccharide Pb⁺² (8%) 7,8 mm×300 mm, Phenomenex[®]) và đầu dò RI detector ở nhiệt độ 80°C với tốc độ dòng 0,6 mL min⁻¹. Để phân tích axit gluconic, sử dụng hệ thống HPLC tương tự, tuy nhiên sử dụng cột Shim-pack CLC-NH₂ (150 mm×6 mm, Shimadzu, CA, U.S.A), mẫu và chất chuẩn được chạy ở nhiệt độ cột 40°C với đầu dò ở bước sóng 210 nm [148].

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)

Xúc tác hiệp đồng hỗn hợp enzyme chuyển hóa vật liệu giàu lignocellulose trong rơm bởi CDH tinh sạch, AE và các enzyme thương mại (Cell/Xyl) được tối ưu hóa để cải thiện hiệu suất của quá trình. Tỷ lệ enzyme so với cơ chất sinh khối (tính theo đơn vị enzyme/gram sinh khối; U /g) của mỗi loại enzyme được thay đổi tùy theo biên độ của thí nghiệm. Phương pháp tối ưu bề mặt đáp ứng (*response surface methodology*, RSM) và thiết kế Box-Behnken được sử dụng để tính toán ảnh hưởng của ba thông số chính: nồng độ của enzyme cellulase/xylanase (Cell/Xyl), acetyl esterase (AE) và cellobiose dehydrogenase (CDH)] đối với hiệu suất sản phẩm [Y] glucose, xylose và axit gluconic [149, 150]. Xây dựng ma trận thiết kế 15 thí nghiệm với các phương pháp xử lý thống kê và xác định các điều kiện tối ưu được

thực hiện bằng phần mềm Design-Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA). Kết quả của các thử nghiệm yếu tố đơn được sử dụng làm đầu vào trong ma trận thiết kế trực giao để xác định phạm vi và điểm trung tâm của các biến. Cụ thể, trong nghiên cứu này, ba tham số đã được thay đổi độc lập trong khi các yếu tố khác được giữ cố định. Kết quả tính toán lý thuyết được kiểm tra bằng phân tích ANOVA để xác nhận tính hợp lệ của mô hình. Sau đó, các điều kiện tối ưu được tính toán từ mô hình cuối và được xác minh bằng thực nghiệm thực tế. Các biến phụ thuộc (hiệu suất sản phẩm) dưới dạng hàm của các biến độc lập được biểu thị bằng phương trình đa thức bậc hai sau (1):

$$\hat{Y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{u,j=1}^k b_{uj} X_u X_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_j^2 \quad (1)$$

Trong đó, $\hat{Y}$ là giá trị biến phụ thuộc (dự báo); b_0 là hệ số bị chặn; b_j là hệ số tuyến tính; b_{jj} là hệ số bậc hai; b_{uj} là hệ số tương tác; X_u và X_j là các biến độc lập, $X_u X_j$ và X_j^2 lần lượt là các số hạng bậc giao và bậc hai.

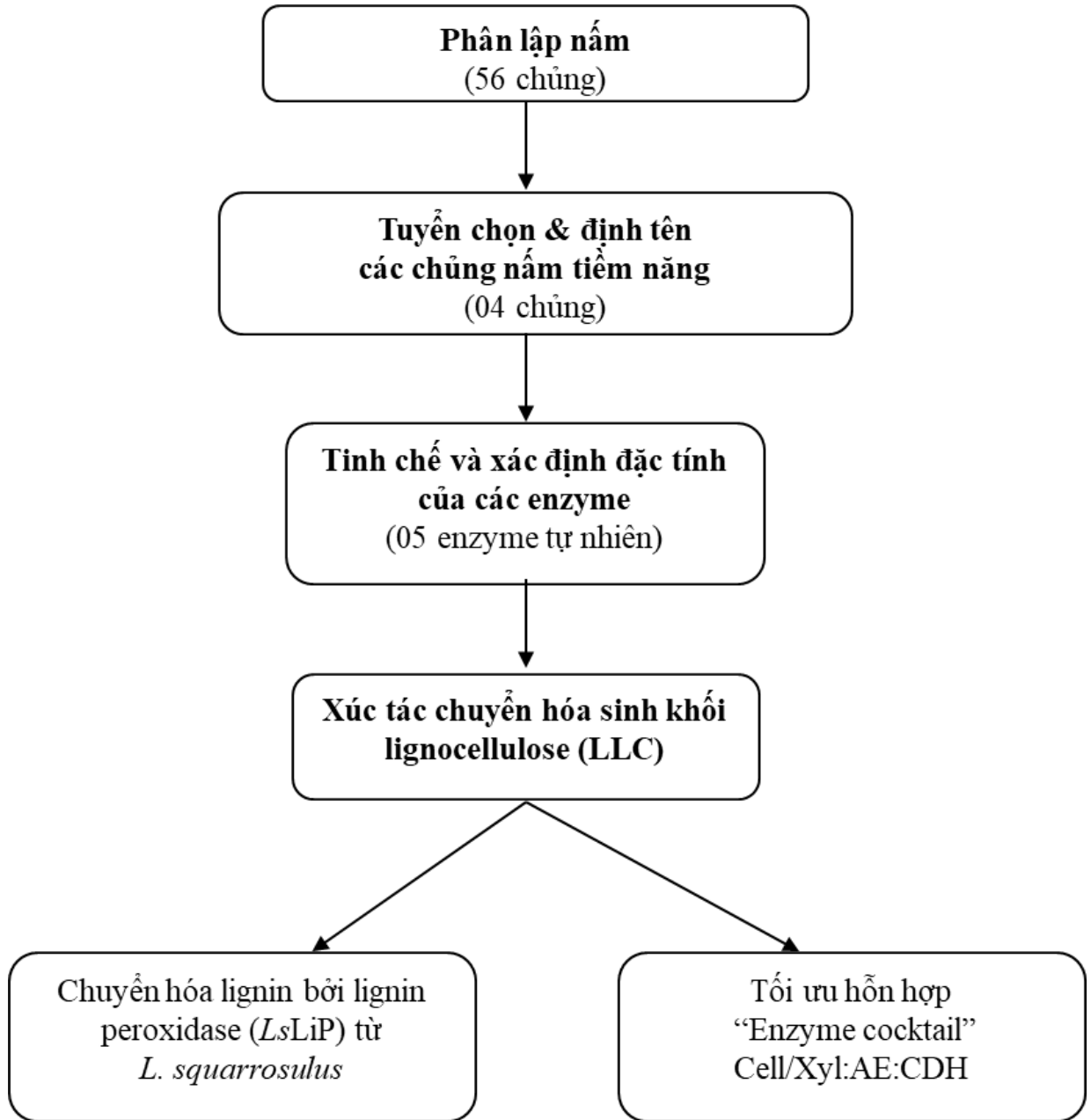
2.2.12. Phân tích số liệu

Mỗi thí nghiệm được thực hiện ba lần và dữ liệu được biểu thị là giá trị trung bình $\pm$ SD. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ xác định bằng kiểm định Student's t-test. Phân tích thống kê được thực hiện với phần mềm JMP Pro. v.13.2.

2.2.13. Sơ đồ quá trình nghiên cứu

Toàn bộ quá trình nghiên cứu được mô tả trong Hình 2.2. Trước hết, các mẫu nấm lớn được thu thập từ Vườn Quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mùòng Phăng (Điện Biên) được đưa về phòng thí nghiệm để phân lập, làm sạch, và định danh dựa trên hình thái. Sau đó, các mẫu nấm được đánh giá khả năng tiết các enzyme lignin peroxidase, cellobiose dehydrogenase, laccase, acetyl esterase, và unspecific peroxygenase. Những chủng nấm có hoạt tính enzyme cao nhất được định danh chính xác bằng phương pháp sinh học phân tử và được lên men để sinh tổng hợp các enzyme mục tiêu. Sau đó, các chủng nấm này được nuôi cấy và thu nhận enzyme. Các enzyme tự nhiên được tinh sạch thông qua cột trao đổi ion và sắc ký lọc gel, đồng thời nghiên cứu một số đặc tính của chúng. Sau đó, các enzyme tinh sạch được nghiên

cứu tối ưu thành phần để phối trộn cùng hệ enzyme thương mại cellulase/xylanase (Cell/Xyl) cho thủy phân hiệu quả rơm thành đường. .



Hình 2.2. Sơ đồ quá trình nghiên cứu các nội dung trong luận án.

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

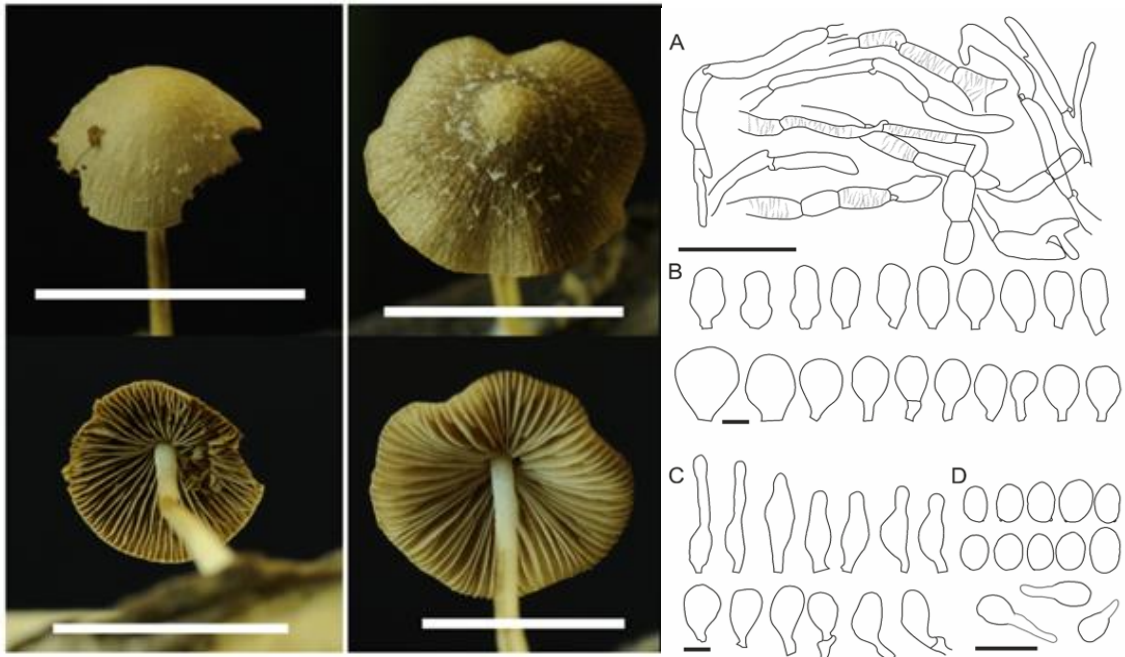
Từ các mẫu quả thể nấm thu thập ở vùng sinh thái khu vực Vườn Quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mường Phăng (Điện Biên), đề tài đã phân lập và làm thuần được 56 chủng nấm. Trong đó có 36 chủng thu được từ VQG Cúc Phương được ký hiệu là CP và 20 chủng nấm thu được từ Mường Phăng được ký hiệu là MP. Như vậy, số lượng nấm thu được ở Cúc Phương cao hơn ở Mường Phăng là 16 chủng. Kết quả phân lập và phân loại thông qua đặc điểm hình thái của từng chủng được thể hiện ở Phụ lục.

Xét về mức độ đa dạng, 56 chủng nấm phân lập được chủ yếu thuộc hai ngành nấm đảm Basidiomycota và nấm túi Ascomycota. Ngành nấm đảm chiếm phần lớn trong số chủng nấm phân lập được (50/56 chủng chiếm 89%). Các chủng nấm này phân bố trong 05 bộ, bao gồm Agaricales (23 chủng), Auriculariales (01 chủng), Polyporales (24 chủng), Hymenochaetales (01 chủng) và Russulales (01 chủng). Trong khi đó, ngành nấm túi Ascomycota bao gồm 06 chủng nấm (chiếm 11%), phân bố trong 04 bộ bao gồm Xylariales (03 chủng), Helotiales (01 chủng), Sordariomycetes (01 chủng) và Hypocreomycetidae (01 chủng).

Như vậy, từ các mẫu quả thể nấm thu được đã phân lập và thuần khiết được 56 chủng nấm. Kết quả xác định hình thái cho thấy những chủng nấm thu được là khá đa dạng. Từ đó giúp chúng ta có cách nhìn tổng quan về sự đa dạng nấm từ rừng tự nhiên ở Việt Nam.

Đặc biệt, qua phân lập nấm thực địa đã phát hiện 01 loài mới *Candolleomyces eurysporus*, thuộc Họ Psathyrellaceae, Bộ Agaricales từ rừng QG Cúc Phương, Ninh Bình (mã đăng ký MycoBank no.: MB836196; GenBank acc. no.: MT651560) (Hình 3.1). Loài mới được đặc trưng bởi bào tử đảm có dạng elip hoặc hình trứng phình rộng [$5.5\text{--}7.0 \times 4\text{--}5(-6) \mu\text{m}$], không vùng lỗ nảy mầm (germ pore) thấy được. Liệt bào đỉnh (cheilocystidia) dạng túi hoặc trùy, liệt bào cuống dị hình, không có liệt bào cạnh

(pleurocystidia) và liệt bào mũ (pileocystidia). Chúng tinh sạch trong phòng thí nghiệm được giải trình tự genome và toàn bộ ribosomal RNA operon bao gồm gene 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 và 28S rRNA được chú giải. Phân tích cây phát sinh loài đã xác định vị trí taxon của *C. eurysporus* thuộc nhánh với loài *C. sulcatotuberculosis*.



Hình 3.1. Đặc điểm hình thái của loài mới *Candolleomyces eurysporus*, phân lập tại Cúc Phương. Hình bên trái: Quả thể nấm, Bar = 1 cm. Hình phải: A: Hệ sợi, B: Liệt bào đỉnh, C: Liệt bào cuống, D: Bào tử ba lỗ mầm. Bar = 50 μm (A), 10 μm (B-D).

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. Tiêu chí lựa chọn các chủng nấm được xây dựng dựa trên hai nhóm yếu tố chính. Thứ nhất, mức độ hoạt tính enzyme được đánh giá thông qua khả năng chuyển hóa cơ chất đặc trưng cho từng loại enzyme. Những chủng có hoạt tính cao, ổn định, và thể hiện phổ enzyme đa dạng được ưu tiên lựa chọn. Thứ hai, ưu tiên các chủng chưa được công bố trong các nghiên cứu

trước đây hoặc chưa từng được báo cáo về khả năng sinh enzyme liên quan. Việc tập trung vào những chủng nấm “chưa được khai thác” giúp tăng giá trị khoa học, đồng thời mở ra triển vọng tìm kiếm các hoạt tính enzyme độc đáo hoặc cơ chế xúc tác mới, có thể đóng góp vào thiết kế enzyme cocktail hiệu quả hơn trong tương lai.

Bảng 3.1. Hoạt tính enzyme của những chủng nấm nghiên cứu.

STT	Ký hiệu mẫu nấm	Hoạt tính enzyme thủy phân		Hoạt tính enzyme oxy hóa		
		Acetyl esterase (U/L)	Laccase (U/L)	Cellobiose dehydrogenase (U/L)	Lignin peroxidase (U/mL)	Unspecific peroxxygenase (U/mL)
1	CP1	2.217,7	127,5	21,0	0	0
2	CP2	0	0	0	0	0
3	CP3	0	67,8	0	0	0
4	CP4	346,0	0	14,5	0	0
5	CP5	1.234,5	837,7	15,7	6,9	5,9
6	CP7	3.209,4	310,8	34,6	1,8	2,9
7	CP8	1.874,4	0	42,4	4,3	6,0
8	CP9	0	0	0	0	0
9	CP11	0	237,9	0	0	0
10	CP12	0	0	0	0	0
11	CP13	1.343,9	1.958,9	15,6	17,8	13,9
12	CP14	1.047,1	2.655,3	14,4	0	0
13	CP15	1.918,9	727,5	16,5	0	0
14	CP16	0	0	0	0	0
15	CP18	0	0	0	0	0
16	CP19	1.752,1	206,9	15,5	3,0	7,8
17	CP21	2.660,4	0	15,5	12,6	15,6
18	CP22	526,7	6.958,5	11,9	38,8	41,2
19	CP23	0	0	0	0	0
20	CP24	0	0	0	0	0
21	CP25	0	0	4,6	0	0
22	CP26	2.171,5	156,6	12,4	15,2	11,9
23	CP27	2.135,7	0	0	0	0
24	CP28	0	34,7	0	0	0

STT	Ký hiệu mẫu nấm	Hoạt tính enzyme thủy phân		Hoạt tính enzyme oxy hóa		
		Acetyl esterase (U/L)	Laccase (U/L)	Cellobiose dehydrogenase (U/L)	Lignin peroxidase (U/mL)	Unspecific peroxxygenase (U/mL)
25	CP29	287,3	4.562,2	50,8	31,9	32,7
26	CP30	0	0	0	0	0
27	CP31	1.990,3	0	0	0	0
28	CP32	1.753,8	0	17,7	5,9	11,5
29	CP33	2.825,7	0	19,1	7,0	1,4
30	CP34	0	0	0	0	0
31	CP35	0	0	0	0	0
32	CP36	1.068,2	1.804,2	10,6	0	0
33	CP37	996,5	0	8,9	2,1	0
34	CP38	3.142,0	0	0	0	0
35	CP39	0	0	0	0	0
36	CP40	0	0	0	0	0
37	MPN9	1.574,9	1.646,6	19,8	2,4	3,2
38	MPN10	2.057,3	0	0	0	0
39	MPN11	1.817,5	620,7	19,9	5	8,5
40	MPN12	3.650,8	5.735,3	21,2	39,3	36,3
41	MPN15	3.537,2	6.551,3	19,2	29,8	22,5
42	MPN18	3.526,7	7.658,5	15,9	31,8	28,4
43	MPN22	0	415,4	18,1	0	0
44	MPL8	970,9	1.021,5	23,5	2,8	0
45	MPL13	1.232,4	40,2	18,6	1,8	25,8
46	MPL14	2.066,7	0	0	0	0
47	MPL15	3.541,2	1.996,5	15,6	8	11,3
48	MPL17	1.182,4	916,4	30,6	0	0
49	MPL21	0	227,4	14,3	0	0
50	MPL25	1.417,2	133,8	20,4	1,5	5,4
51	MPL29	1.280,4	221,7	15,9	1,2	6,9
52	MPG8	2.907,6	5.146,1	12,5	15,7	29,9
53	MPG12	3.595,4	1.557,3	20,0	6,8	11,2
54	MPG14	2.020,8	178,9	77,4	0	0
55	MPG04	1.393,7	5.950,3	19,5	34,73	30,7
56	MPG05	997,4	5.806,2	10,8	32,26	35,4

Sàng lọc chủng sinh acetyl esterase (AE): Kết quả ở Bảng 3.1 cho thấy có 38/56 (chiếm 68%) chủng nấm biểu hiện hoạt tính sinh tổng hợp enzyme AE. Trong đó có 20 chủng được thu nhận từ rừng quốc gia Cúc Phương và 18 chủng được thu nhận từ rừng tự nhiên Mùong Phăng. Hoạt độ AE của các chủng nấm đạt từ 287,3 U/L đến 3.650,8 U/L. Đặc biệt, một số chủng nấm biểu hiện hoạt tính tốt như MPN12 (3.650,8 U/L), MPG12 (3.595,4 U/L), MPL15 (3.541,2 U/L), MPN15 (3.537,2 U/L) và MPN18 (3.526,7 U/L). Cả 5 chủng nấm này đều được phân lập từ rừng tự nhiên Mùong Phăng. Trong các chủng nấm này, chủng MPN12 có hoạt tính AE cao nhất (3.650,8 U/L). Do vậy, chủng nấm MPN12 được lựa chọn cho những nghiên cứu thu nhận AE.

Sàng lọc chủng sinh lignin peroxidase (LiP): Kết quả sàng lọc hoạt tính LiP cho thấy có 25/56 chủng (45%) có hoạt tính, trong đó có 12 chủng nấm thu nhận được ở rừng Cúc Phương và 13 chủng thu được ở rừng Mùong Phăng. Hoạt độ enzyme dao động từ 1,2 đến 39,3 U/mL (Bảng 3.1). Có 6 chủng nấm có hoạt độ enzyme lớn hơn 30 U/mL, bao gồm MPN12 (39,3 U/mL), CP22 (38,8 U/mL), MPG04 (34,73 U/mL), MPG05 (32,26 U/mL), CP29 (31,9 U/mL) và MPN18 (31,8 U/mL). Trong các mẫu biểu hiện hoạt tính LiP cao, chủng MPN12 với hoạt tính là LiP 39,3 U/mL được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

Sàng lọc chủng sinh cellobiose dehydrogenase (CDH): Kết quả sàng lọc hoạt tính cellobiose dehydrogenase cho thấy sự đa dạng của enzyme này trong giới nấm phân lập với số mẫu biểu hiện hoạt tính CDH là 35/56 chủng, tương đương 62,5 % (Bảng 3.1). Trong đó, có 17 chủng nấm được thu nhận ở rừng Cúc Phương và 18 chủng được thu nhận ở rừng Mùong Phăng. Hoạt tính dao động từ 4,6 đến 74,4 U/L đối với cơ chất 2,6-dichlorophenolindophenol. Có 5 chủng nấm có hoạt độ > 30 U/L, bao gồm MPG14 (77,4 U/L), CP29 (50,8 U/L), CP8 (42,4 U/L), CP7 (34,6 U/L) và MPL17 (30,6 U/L). Chủng MPG14 sinh tổng hợp enzyme CDH cao nhất đạt 77,4 U/L và được lựa chọn cho các nghiên cứu sâu hơn về đặc tính enzyme cũng như ứng dụng trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose.

Sàng lọc chủng sinh laccase (Lac): Kết quả sàng lọc hoạt tính laccase trên cơ chất ABTS nhận thấy có 31/56 chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp laccase, tương ứng 57% (Bảng 3.1). Trong đó có 14 chủng được thu nhận ở

rừng Cúc Phương và 17 chủng được thu nhận ở rừng Mùong Phăng. Hoạt tính từ 34,7 U/L đến 7.658,5 U/L. Trong số đó, có 7 chủng nấm biểu hiện hoạt tính cao, bao gồm MPN18 (7.658,5 U/L), CP22 (6.958,5 U/L), MPG04 (5.950,3 U/L), MPN15 (6.551,3 U/L), MPN12 (5.735,3 U/L) và MPG05 (5.806,2 U/L). Chủng MPN18 là chủng tiềm năng cho nghiên cứu tiếp theo khi biểu hiện hoạt tính cao nhất đạt 7.658,5 U/L.

Sàng lọc chủng sinh unspecific peroxygenase (UPO): Kết quả cho thấy số lượng chủng nấm sinh UPO chiếm 43% (24/56 chủng hoạt tính). Trong đó có 11 chủng nấm được thu nhận ở rừng Cúc Phương và 13 chủng được thu nhận ở rừng Mùong Phăng. Hoạt độ enzyme dao động từ 1,4 đến 41,2 U/mL thông qua khả năng oxi hóa cơ chất veratryl alcohol. Có 5 chủng nấm có hoạt độ UPO > 30 U/mL, bao gồm CP22 (41,2 U/mL), MPN12 (36,3 U/mL), MPG05 (35,4 U/mL), CP29 (32,7 U/mL) và MPG04 (30,7 U/mL). Trong những chủng biểu hiện hoạt độ enzyme UPO cao thì chủng CP22 (41,2 U/mL) được lựa chọn là chủng tiềm năng cho nghiên cứu tinh sạch UPO.

Tổng hợp kết quả sàng lọc hoạt tính enzyme của 56 chủng nấm nghiên cứu, thì số lượng nấm sinh tổng hợp enzyme AE chiếm tỷ lệ cao nhất (68%), sau đó lần lượt là chủng sinh CDH (62,5%), Lac (57%), LiP (45%) và cuối cùng là enzyme UPO (43%). Các chủng nấm này phân bố đều ở cả hai rừng Cúc Phương và Mùong Phăng. Trong đó có 21/56 chủng nấm (chiếm 37,5%) có khả năng sinh tổng hợp cả 5 loại enzyme. Cụ thể là các chủng CP5, CP7, CP13, CP19, CP21, CP22, CP26, CP29, MPN9, MPN11, MPN12, MPN15, MPN18, MPL13, MPN15, MPN25, MPN29, MPG04, MPG05, MPG08 và MPG12. Từ các kết quả này cho thấy nguồn nấm thu được ở rừng tự nhiên Việt Nam, cụ thể Cúc Phương và Mùong Phăng, là nguồn nguyên liệu tiềm năng trong việc khai thác các enzyme có khả năng chuyển hóa sinh khối lignocellulose.

Khi so sánh kết quả đánh giá hoạt tính cho thấy 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

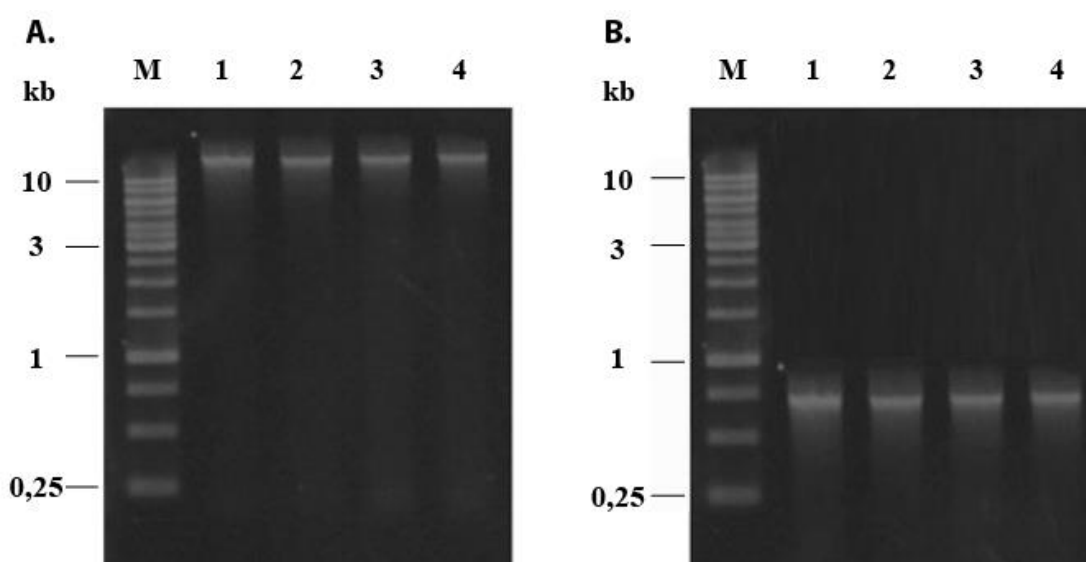
cây thu nhận enzyme cho tinh sạch và xác định đặc điểm các enzyme tương ứng và ứng dụng của enzyme này trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose.

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

3.1.3.1. Tách chiết DNA hệ gen và khuếch đại đoạn gen ITS

Bốn chủng nấm có hoạt tính cao là MPN12, MPG14, MPN18 và CP22 được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử dựa trên phân tích trình tự vùng ITS. Kết quả kiểm tra DNA tổng số được tách chiết từ 04 chủng nấm (Hình 3.2 A) cho thấy DNA hệ gen có kích thước lớn hơn 10 kb, có độ tinh sạch cao và không bị đứt gãy.

Mẫu DNA sau đó được sử dụng làm mạch khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1/ITS4 (Hình 3.2 B). Sản phẩm PCR có 1 băng sáng đậm có kích thước khoảng 700 bp.



Hình 3.2. Điện di đồ phân tích DNA tổng số sau tách chiết (A), sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS của các chủng nấm trên gel agarose (B).

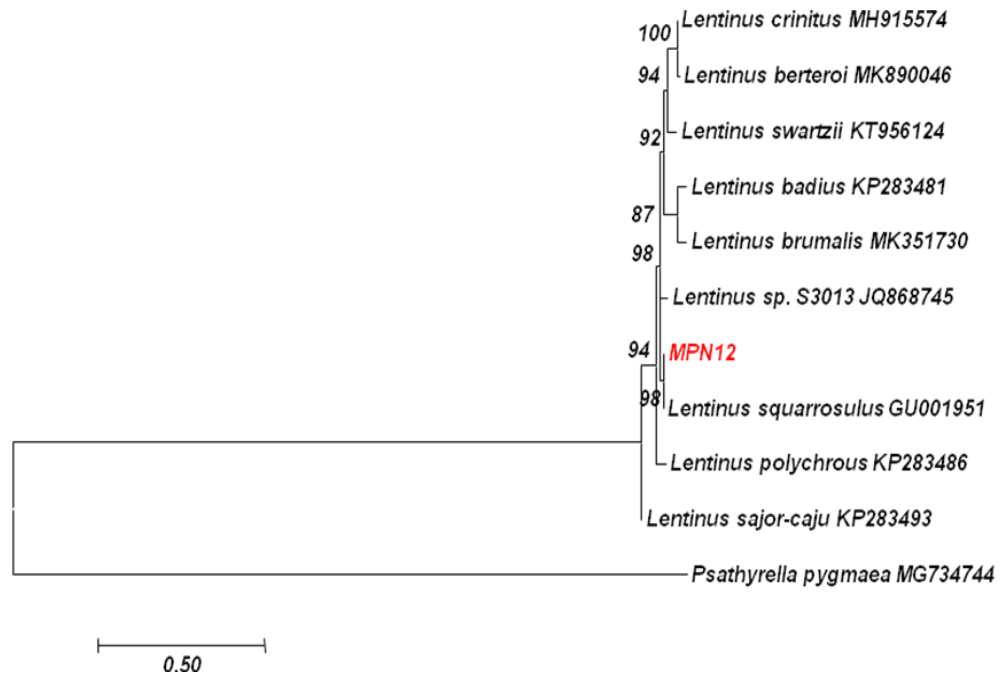
1-4: Tương ứng với chủng MPN12, MPG14, MPN18 và CP22

3.1.3.2. Giải trình tự ITS và xây dựng cây phát sinh chủng loài

Trình tự ITS của 4 chủng nấm chọn lọc được phân tích và so sánh với các trình tự sẵn có trên ngân hàng dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST và xây dựng cây phát sinh chủng loài.

Trình tự nucleotide vùng ITS của chủng nấm MPN12:

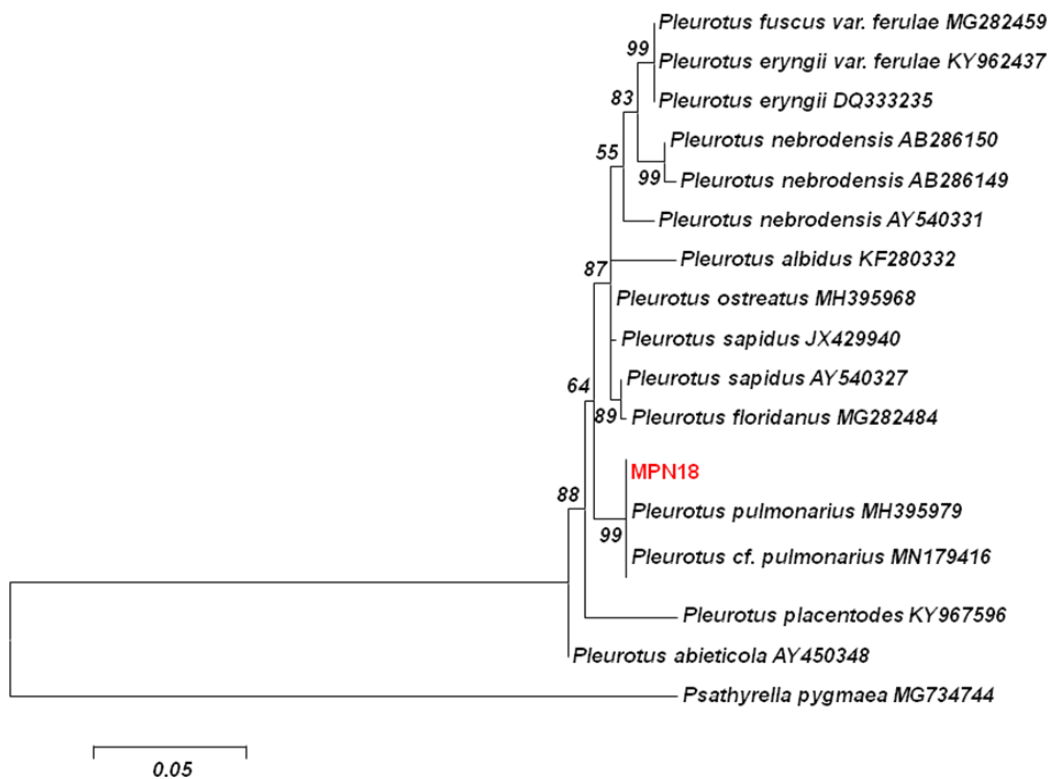
Trình tự ITS của chủng nấm MPN12 cho thấy mức độ tương đồng cao, đạt 99,76%, so với loài *Lentinus squarrosulus* (mã số GU001951). Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên trình tự ITS của chủng MPN12 và một số loài thuộc chi *Lentinus*, sử dụng phương pháp Maximum Likelihood (ML) (Hình 3.3). Kết quả phân tích cho thấy chủng MPN12 và loài *Lentinus squarrosulus* tập hợp thành một nhóm riêng biệt với giá trị bootstrap trên 98%, khẳng định mối quan hệ gần gũi giữa chúng. Ngoài ra, phân tích tỷ lệ tương đồng cho thấy trình tự ITS của chủng MPN12 có mức tương đồng từ 84,64% đến 100% với 164 trình tự ITS của các chủng thuộc loài *Lentinus squarrosulus* đã được công bố trên ngân hàng GenBank. Kết quả này chứng minh rằng chủng nấm MPN12 có chung nguồn gốc với loài *Lentinus squarrosulus*. Từ các kết quả phân loại dựa trên phương pháp sinh học phân tử, có thể kết luận rằng mẫu nấm phân lập MPN12 thuộc loài *Lentinus squarrosulus*, một loài nấm mục trắng thuộc họ Polyporaceae. Do đó, tên gọi đầy đủ của mẫu phân lập là *Lentinus squarrosulus* MPN12 (NCBI Accession number: OP758151).



Hình 3.3. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm MPN12 với các loài trong chi *Lentinus* xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).

Trình tự nucleotide vùng ITS của chủng nấm MPN18:

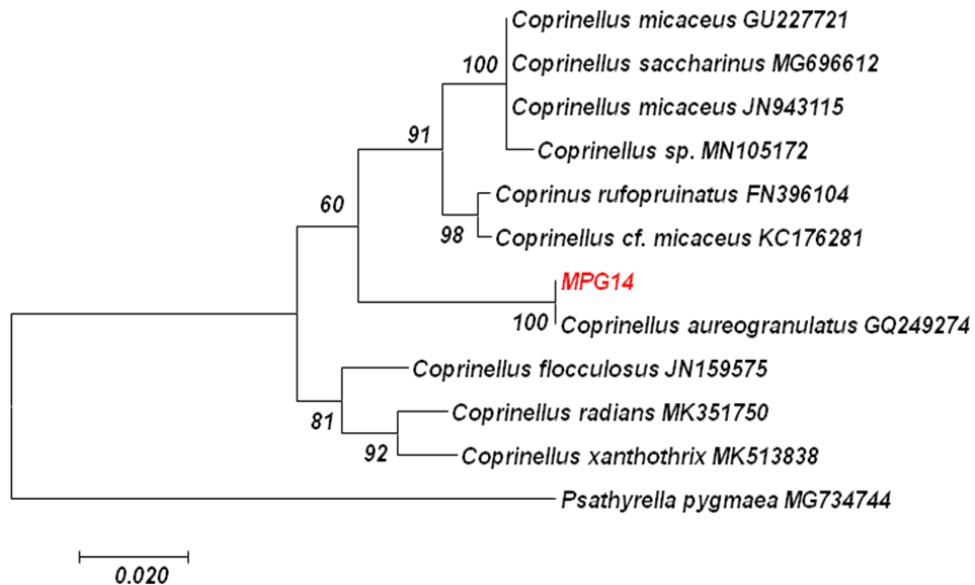
Trình tự ITS của chủng nấm MPN18 cho thấy mức độ tương đồng hoàn toàn (100%) với chủng *Pleurotus pulmonarius* (mã số MH395979). Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên trình tự ITS của chủng MPN18 và một số loài thuộc chi *Pleurotus* bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML) (Hình 3.4). Kết quả phân tích cho thấy chủng MPN18 và loài *Pleurotus pulmonarius* hình thành một nhóm riêng biệt với giá trị bootstrap cao, đạt 99%, khẳng định mối quan hệ gần gũi giữa chúng. Điều này chứng tỏ rằng chủng nấm MPN18 có chung nguồn gốc với loài *Pleurotus pulmonarius*. Bên cạnh đó, phân tích tỷ lệ tương đồng trình tự ITS cho thấy chủng MPN18 có mức tương đồng dao động từ 79,32% đến 100% với 409 trình tự ITS của các chủng thuộc loài *Pleurotus pulmonarius* được công bố trên ngân hàng GenBank. Từ các kết quả phân loại dựa trên phương pháp sinh học phân tử, có thể kết luận rằng mẫu nấm phân lập ký hiệu MPN18 là loài *Pleurotus pulmonarius*, một loài nấm mục trắng thuộc họ Pleurotaceae. Tên đầy đủ của mẫu phân lập là *Pleurotus pulmonarius* MPN18 (NCBI Accession number: OP758161).



Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm MPN18 với các loài/thứ trong chi *Pleurotus* xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).

Trình tự nucleotide vùng ITS của chủng nấm MPG14:

Trình tự ITS của chủng nấm MPG14 tương đồng cao 100% với chủng *Coprinellus aureogranulatus* GQ249274. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm MPG14 và một số loài thuộc chi *Coprinellus* đã được xây dựng theo phương pháp ML (Hình 3.5). Chủng nấm MPG14 và loài nấm *C. aureogranulatus* tạo thành một nhóm riêng với giá trị bootstrap 100%. Kết quả này cho phép nhận định chủng nấm MPG14 có chung nguồn gốc với loài *C. aureogranulatus*. Phân tích tỷ lệ tương đồng trình tự ITS cho thấy chủng MPG14 có mức tương đồng dao động từ 97,71% đến 100% với 36 trình tự ITS của các chủng thuộc loài *C. aureogranulatus* được công bố trên ngân hàng GenBank. Như vậy, từ kết quả phân loại bằng phương pháp sinh học phân tử có thể kết luận mẫu nấm phân lập ký hiệu MPG14 là loài nấm mục trắng *Coprinellus aureogranulatus* MPG14 thuộc họ Psathyrellaceae (NCBI Accession number: OP758133).

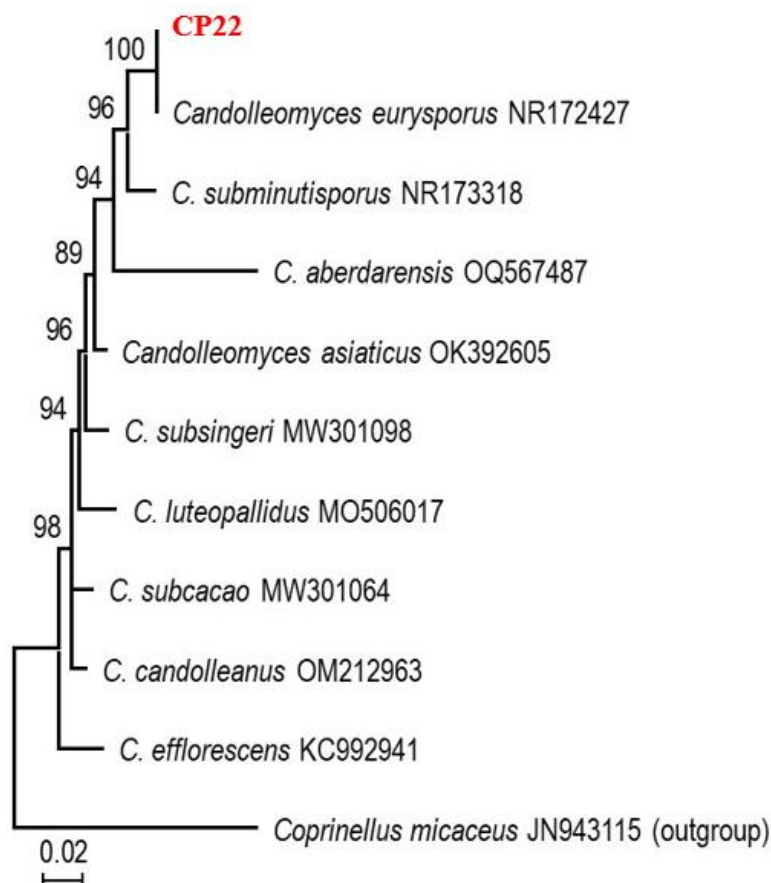


Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm MPG14 với các loài trong chi *Coprinellus* xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).

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 (Hình 3.6). 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 (NCBI Accession number: MW369459).



Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm CP22 với các loài trong chi *Candolleomyces* xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).

3.2. Nghiên cứu tinh sạch và xác định đặc tính của các enzyme từ nấm lựa chọn

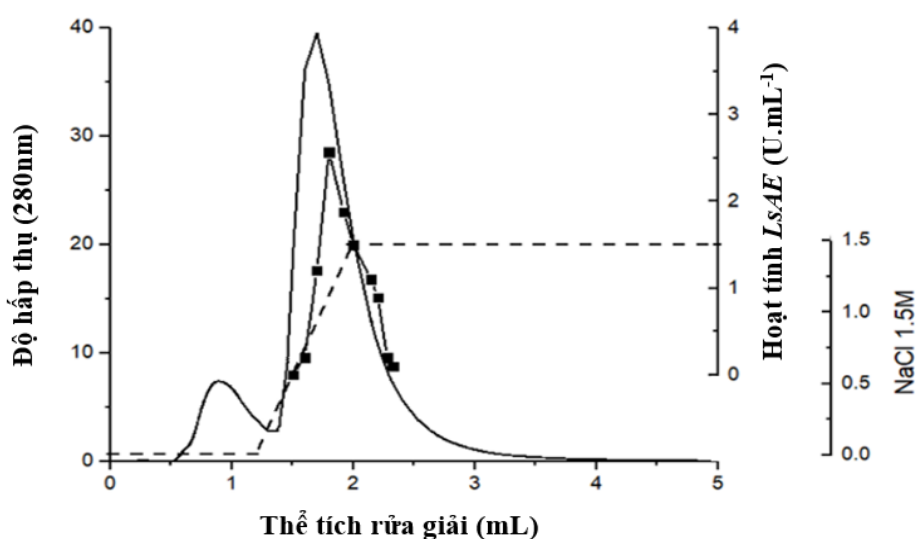
Sau khi sàng lọc và lựa chọn được 04 chủng nấm có tiềm năng, nghiên cứu tiếp tục với việc khảo sát các điều kiện nuôi cấy nhằm tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào. Trong đó, rơm – một nguồn nguyên liệu lignocellulose phổ biến – được sử dụng làm cơ chất cảm ứng để kích thích quá trình tiết enzyme. Đồng thời, các yếu tố môi trường quan trọng như

nhệt độ, pH và nguồn nitơ được đánh giá một cách hệ thống để xác định mức độ ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của nấm cũng như hoạt độ của enzyme. Trên cơ sở các kết quả thu được, điều kiện lên men sinh tổng hợp của từng chủng nấm đã được tối ưu hóa, chi tiết được trình bày trong Phụ lục. Sau giai đoạn này, dịch chiết enzyme được thu nhận và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo về quá trình tinh sạch và đặc tính hóa enzyme.

3.2.1. Nghiên cứu tinh sạch các enzyme

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

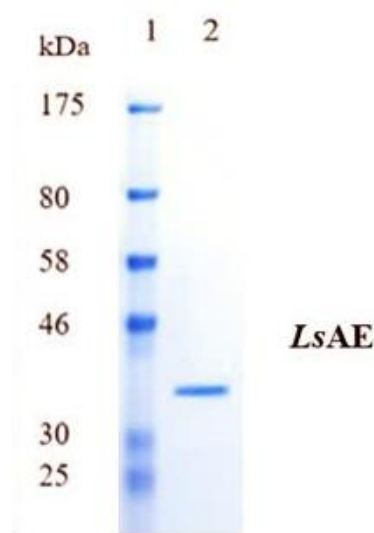
Quá trình tinh sạch enzyme esterase từ dịch enzyme thô của nấm mục trắng *L. squarrosulus* MPN 12 được tiến hành bằng phương pháp sắc ký lỏng protein nhanh (FPLC). Trước tiên, dịch enzyme thô được xử lý qua cột trao đổi ion DEAE Cellulose và lọc gel Sephadex G100, thu được 57 mg protein enzyme/mẻ với tổng hoạt tính enzyme đạt 789 U. Sau đó, các phân đoạn có hoạt tính enzyme được gom lại và tiếp tục tinh sạch trên cột HiTrap™ Q XL, sử dụng đệm Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 1,5 M NaCl (Hình 3.7). Quá trình rửa giải khi tăng dần nồng độ NaCl xuất hiện 2 đỉnh protein, trong đó đỉnh thứ hai có tổng hoạt tính đạt 2,55 U/mL. Sau bước tinh sạch cuối tổng lượng protein enzyme thu được là 17,0 mg với tổng hoạt tính 391 U. Hoạt tính riêng của enzyme tăng lên 23 U/mg, đạt hiệu suất 7,5% và độ tinh sạch được nâng cao 12,1 lần so với dịch thô ban đầu (Bảng 3.2).



Hình 3.7 . Tinh sạch enzyme *LsAE* từ *L. squarrosulus* MPN 12 qua cột HiTrap™ Q XL. Trong đó: (—) độ hấp thụ ở $\lambda=280$ nm và (●) hoạt tính *LsAE*.

Bảng 3.2. 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	2.709	5.214	1,9	100,0	1,0
DEAE Cellulose	210	2.540	12,1	48,9	6,4
Sephadex G100	57	789	13,8	15,2	7,3
HiTrap™ Q XL	17	391	23,0	7,5	12,1

**Hình 3.8.** Điện di đồ protein sau tinh sạch *LsAE*.

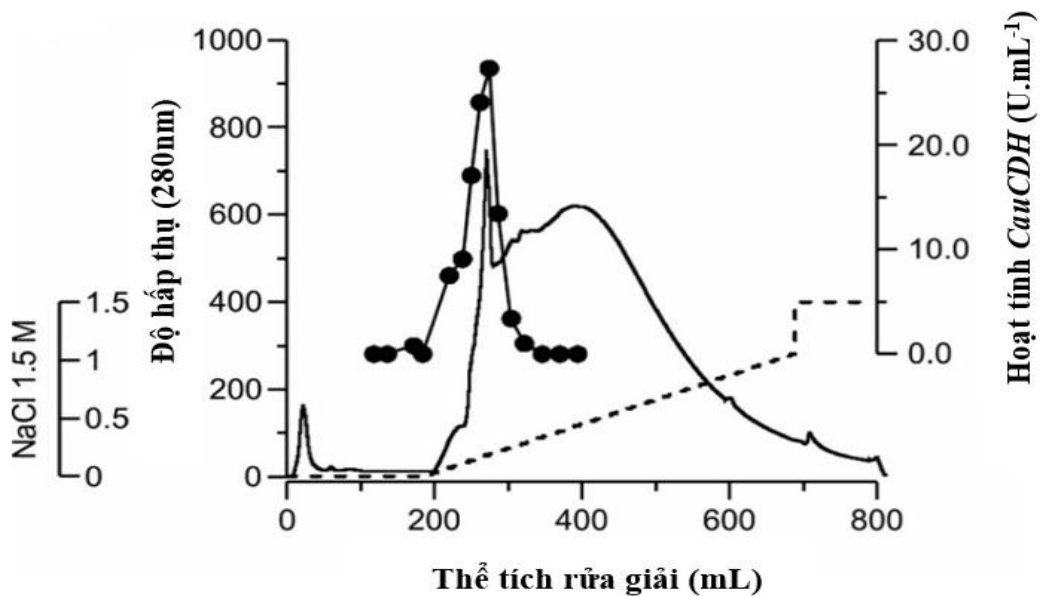
(Trong đó: (1) protein marker, (2) *LsAE* tinh sạch thu được sau cột HiTrap™ Q XL.)

Độ tinh sạch của protein thu được được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Kết quả cho thấy vạch protein *LsAE* sau khi nhuộm có khối lượng phân tử (M_w) là 41,4 kDa, như thể hiện ở Hình 3.8. Kích thước tương đối của enzyme được tính dựa trên công thức tương ứng của băng chuẩn so với quãng đường di chuyển của protein. Kích thước enzyme *LsAE* trong nghiên cứu tương ứng với enzyme cùng loại thu được trong các nghiên cứu trước đây. Ví dụ như enzyme AE từ loài nấm *Xylaria polymorpha* có khối lượng phân tử xấp xỉ 44 kDa [151], hoặc từ loài nấm *Penicillium purpurogenum* có khối lượng phân tử 48 kDa [152]. Phân đoạn enzyme tinh

sạch này được bảo quản ở -20°C và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc tính cũng như chuyển hóa in vitro vật liệu giàu lignocellulose.

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

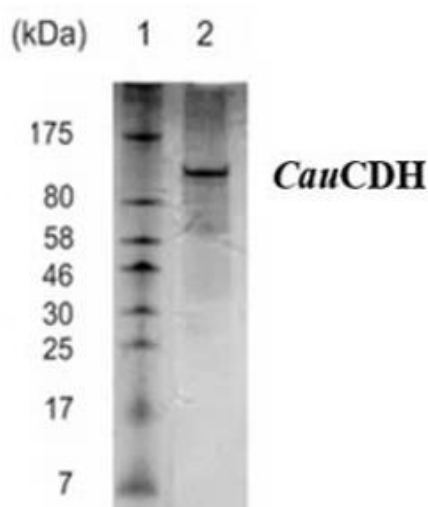
Dịch chiết có hoạt tính cellobiose dehydrogenase được tinh sạch bằng sắc ký FPLC qua các cột trao đổi ion và sắc ký lọc gel. Bước đầu, dịch chiết thô được rửa giải qua cột trao đổi ion DEAE Sepharose bằng gradient muối 0-1,5 M NaCl thu được đỉnh hoạt tính enzyme ghi nhận tại phân đoạn tương ứng với 28 U/mL (Hình 3.9). Sau bước sắc ký lọc gel Superdex G100 tiếp theo đã thu được 549,2 mg protein với tổng hoạt tính enzyme đạt 25,7 U. Các phân đoạn hoạt tính CDH (*CauCDH*) được tiếp tục tinh sạch qua cột sắc ký HiTrap™ Q FF thu được tổng lượng protein enzyme sau bước tinh sạch cuối cùng đạt 411,8 mg, với tổng hoạt tính enzyme là 14,3 U. Hoạt tính riêng của enzyme tăng lên 28,86 U/mg, mức độ tinh sạch cao hơn đáng kể so với dịch thô ban đầu (Bảng 3.3). Độ tinh sạch đạt được sau toàn bộ quy trình tăng 41,9 lần, với hiệu suất thu hồi enzyme ở mức 22,7%.



Hình 3.9. Tinh sạch enzyme *CauCDH* từ *Coprinellus aureogranulatus* MPG14.

(Tinh sạch enzyme trên cột DEAE Sepharose trong đó (—): độ hấp thụ quang học ở bước sóng 280 nm. (●): Hoạt tính *CauCDH* (U/mL).)

Độ tinh sạch của *CauCDH* sau bước cuối cùng trên cột HiTrap Q FF được đánh giá bằng phân tích điện di gel polyacrylamide 12% SDS, cho thấy một dải band rõ ràng với khối lượng phân tử là 109 kDa ở Hình 3.10. Baminger và cộng sự đã chỉ ra khối lượng phân tử của CDH từ chủng *Sclerotium rolfsii* là 101 kDa [72]. *CauCDH* ở nghiên cứu này có khối lượng phân tử gần giống với những nghiên cứu trước đó. Gần đây nhất, Vinita và cộng sự đã tiến hành tinh sạch CDH từ chủng nấm mục trắng *Schizophyllum commune* với khối lượng phân tử xấp xỉ 100 kDa [153].



Hình 3.10. Điện di đồ protein sau tinh sạch *CauCDH*

(Trong đó, (1) protein marker, (2) *CauCDH* tinh sạch thu được sau cột HiTrapTM Q FF.)

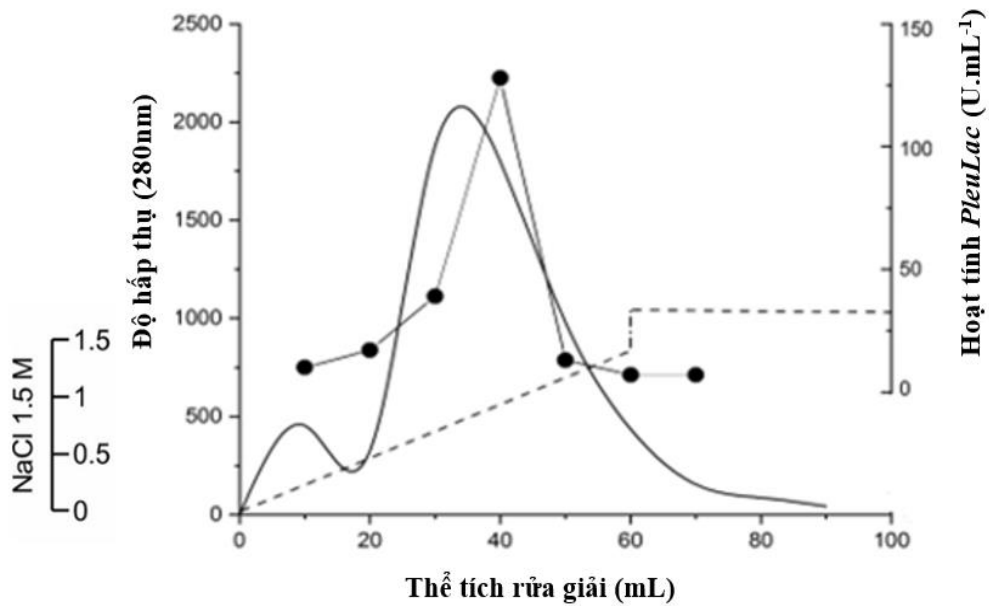
Bảng 3.3. Tinh sạch enzyme *CauCDH* từ dịch lên men *C. aureogranulatus* MPG14.

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	1.817,1	2.635,6	0,69	100,0	1,0
Siêu lọc 10 kDa	1.687,1	2.239,3	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 TM 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*)

Dịch chiết có hoạt tính *PleuLac* được tinh sạch qua ba cột sắc ký: DEAE Cellulose, Sephadex G100 và HiTrap™ Q XL. Bước đầu, dịch chiết được xử lý qua cột trao đổi ion DEAE Cellulose và lọc gel Sephadex G100, thu được phân đoạn chứa hoạt tính với tổng lượng protein đạt 54 mg và tổng hoạt tính enzyme là 889 U. Tiếp theo, các phân đoạn có hoạt tính được đưa lên cột HiTrap™ Q XL và rửa giải bằng gradient muối NaCl (0–1,5 M).

Kết quả cho thấy đỉnh hoạt tính laccase cao nhất được ghi nhận tại đỉnh thứ hai (128 U/mL), xuất hiện sau khoảng 42 mL dung dịch rửa giải. Sau khi hoàn thành quy trình tinh sạch, thu được tổng lượng protein enzyme là 19 mg, tương ứng với tổng hoạt tính enzyme 532 U. Hoạt tính riêng của enzyme đạt 28 U/mg, hiệu suất tinh sạch đạt 8,3%, và độ tinh sạch tăng 9,6 lần so với dịch thô ban đầu (Hình 3.11). Enzyme sau tinh sạch được bảo quản ở -20°C, sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo (Bảng 3.4).



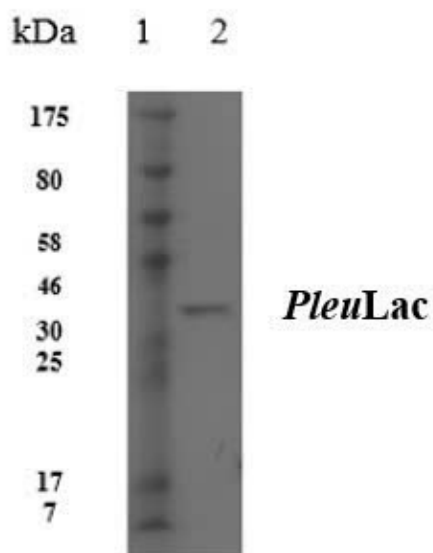
Hình 3.11. Tinh sạch enzyme *PleuLac* từ *Pleurotus pulmonarius* MPN18 qua cột HiTrap™ Q XL.

(Trong đó: (—) độ hấp thụ ở $\lambda=280$ nm và (●) hoạt tính *PleuLac* trên cơ chất ABTS.)

Bảng 3.4. 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	2.243	6.432	2,9	100,0	1,0
Cột DEAE Cellulose	205	3.011	14,7	46,8	5,1
Sephadex G100	54	889	16,5	13,8	5,7
HiTrap™ Q XL	19	532	28,0	8,3	9,6

Điện di SDS-PAGE của phân đoạn có hoạt tính qua các bước tinh sạch ở trên cho thấy vạch protein *PleuLac* sau khi nhộm có khối lượng phân tử $M_w = 35$ kDa được thể hiện ở Hình 3.12. Trong khi đó, gần đây một số nghiên cứu đã chỉ ra khối lượng phân tử của laccase từ một số chủng nấm lớn hơn gấp đôi so với *PleuLac*, như laccase từ chủng *Ganoderma leucocontextum* (65 kDa) [154] và *Gymnopus luxurians* (64 kDa) [155].



Hình 3.12. Điện di đồ protein sau tinh sạch *PleuLac*

(Trong đó, (1) protein marker, (2) *PleuLac* tinh sạch thu được sau cột HiTrap™ Q XL.)

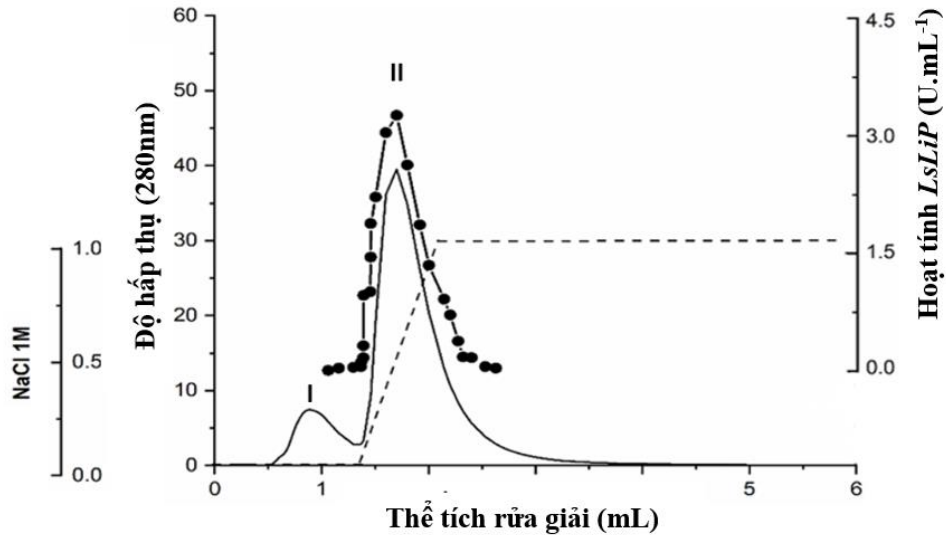
3.2.1.4. Tinh sạch lignin peroxidase từ *L. squarrosulus* MPN 12 (*LsLiP*)

Dịch chiết có hoạt tính enzyme *LsLiP* được tinh sạch qua ba bước sắc ký liên tiếp: DEAE Cellulose, Sephadex G100, và cuối cùng HiTrap™ Q XL. Bước đầu, dịch chiết được xử lý qua cột DEAE Cellulose và Sephadex G100, thu được 80 mg protein với tổng hoạt tính enzyme đạt 831 U. Sau đó, dịch enzyme tiếp tục được đưa lên cột HiTrap™ Q XL và rửa giải bằng gradient muối NaCl (0–1,0 M). Hình 3.13 mô tả hai đỉnh hoạt tính thu được (I và II), trong đó đỉnh II có hoạt tính *LsLiP* cao vượt trội, đạt giá trị lớn hơn 4,5 U/mL. 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 3.5). Protein tinh sạch được bảo quản ở nhiệt độ -20°C, sẵn sàng cho các nghiên cứu và ứng dụng 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 Hình 3.14, băng protein (*LsLiP*) 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 [156], hay LiP từ chủng *Phanerochaete sordida* YK-624 có kích thước khoảng 50 kDa [157]. Do vậy, *LsLiP* cũng có khối lượng phân tử tương tự như nhiều loài nấm khác.

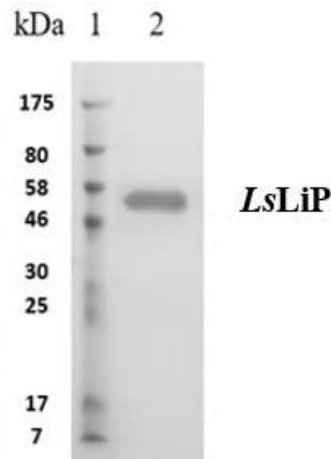
Bảng 3.5. Tinh sạch enzyme *LsLiP* từ dịch lên men *L. squarrosulus* MPN12.

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	100,0	1,0
Cột DEAE Cellulose	350	1250	4,0	35,0	6,7
Sephadex G100	80	831	10,4	23,0	17,3
HiTrap™ Q XL	20	566	28,3	15,7	47,1



Hình 3.13. Tinh sạch LsLiP qua cột HiTrapTM Q XL

(Trong đó: (—) độ hấp thụ ở $\lambda=280\text{nm}$, (●) hoạt tính LsLiP, (---) nồng độ NaCl.).



Hình 3.14. Điện di đồ protein sau tinh sạch LsLiP.

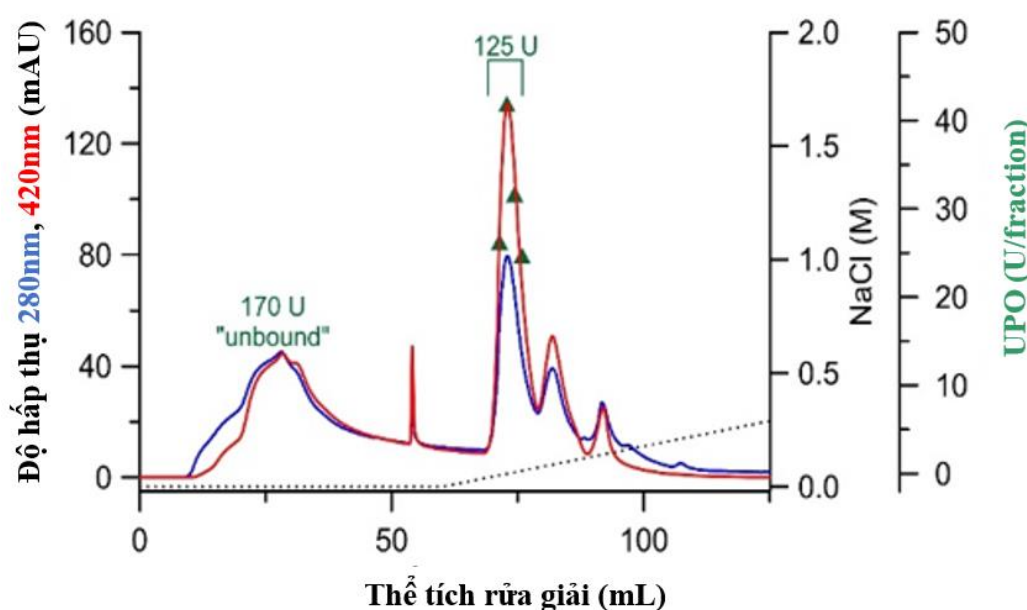
(Trong đó: (1) protein marker, (2) LsLiP tinh sạch thu được sau cột HiTrapTM Q XL.)

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

Dịch chiết thô có hoạt tính unspecific peroxygenase (*CeuUPO*) được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lỏng nhanh (FPLC) qua các bước sử dụng cột trao đổi ion và lọc gel. Bước đầu, dịch chiết thô được xử lý qua cột trao đổi ion DEAE Cellulose và tiếp tục qua cột lọc gel Superdex G-75. Kết quả từ giai đoạn này đạt tổng hoạt tính enzyme đạt 787 U, với lượng protein thu

được là 83 mg. Các phân đoạn chứa hoạt tính enzyme sau đó được tiếp tục tinh sạch qua cột Mono Q™, sử dụng đệm thích hợp và rửa giải bằng gradient muối từ 0 đến 0,25 M NaCl. Kết quả sắc ký cho thấy đỉnh hoạt tính cao nhất của enzyme *CeuUPO* đạt 125 U, xuất hiện sau khi thu được khoảng 75 mL dung dịch rửa giải (Hình 3.15).

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 (Bảng 3.6).



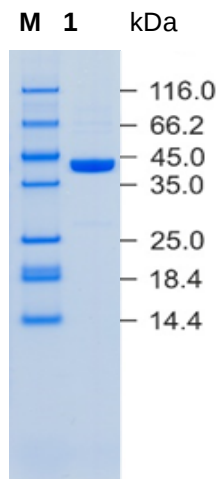
Hình 3.15. Tinh sạch *CeuUPO* với cột Mono Q™.

Protein được phát hiện ở $\lambda=280$ nm (tổng protein, màu xanh lam), $\lambda=420$ nm (nhân heme đặc hiệu UPO, màu đỏ) và phân đoạn hoạt tính UPO (▲).

Bảng 3.6. Tinh sạch enzyme *CeuUPO* từ dịch lên men *C. eurypous* 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	0,6	100,0	1,0
Cột 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

Quá trình tinh sạch được thực hiện trên hệ sắc ký FPLC-ÄKTA™ qua các bước sắc ký trao đổi anion đã thu được enzyme tinh sạch *CeuUPO*. 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 (Hình 3.16).



Hình 3.16. Điện di đồ protein sau tinh sạch *CeuUPO*

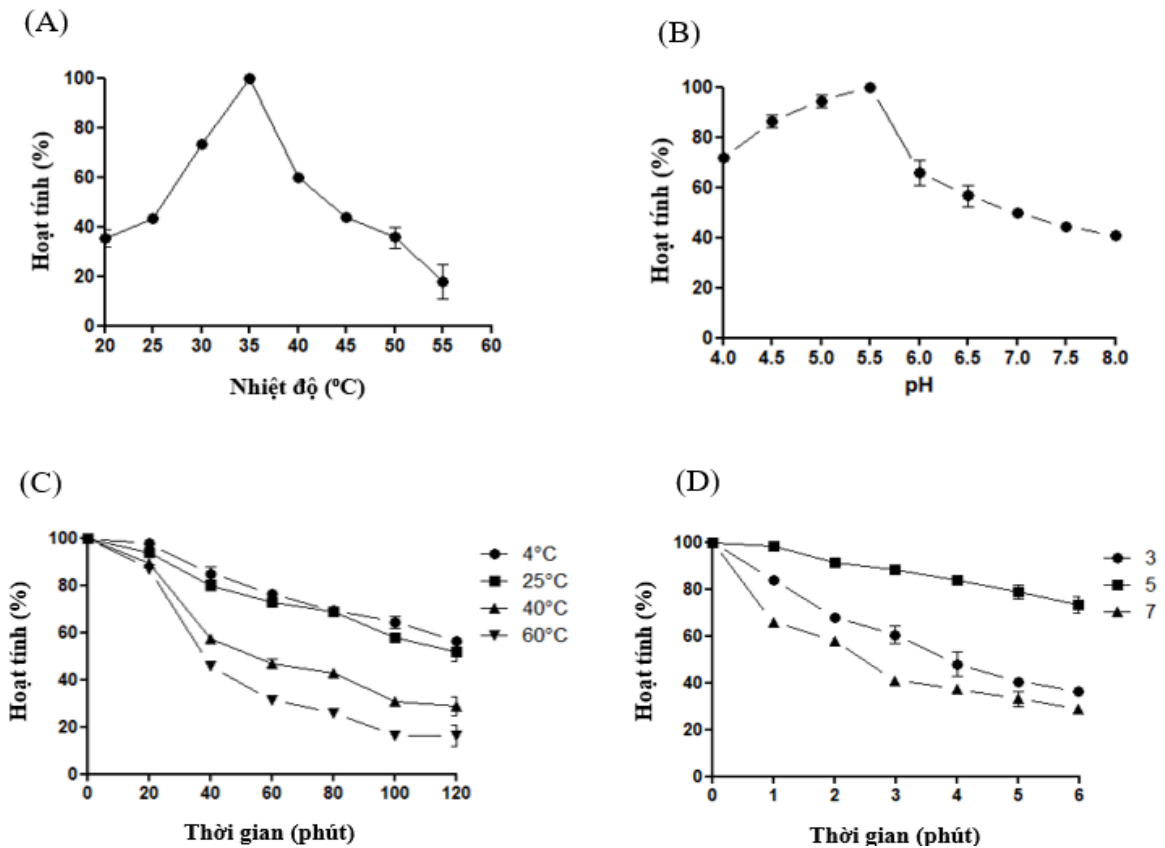
(Trong đó: (M) protein marker, (1) *CeuUPO* tinh sạch thu được sau cột Mono Q™)

3.2.2. Xác định đặc tính của enzyme

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

Nhiệt độ và pH tối ưu:

Để xác định pH tối ưu của *LsAE*, hoạt tính AE đã được xác định ở dải pH 4.0-8.0, ủ ở 37°C trong 10 phút. Hoạt tính cao nhất của AE cho thấy ở pH 5,5 và giảm dần khi pH tăng, ở pH 8 hoạt tính của AE giảm xuống còn 40% so với pH 5,5 (Hình 3.17). Thêm vào đó, hoạt tính AE cũng đạt giá trị tối ưu ở 35°C khi được so sánh với những nhiệt độ lân cận (từ 20-55°C), và giảm mạnh ở nhiệt độ 55°C (chỉ còn xấp xỉ 20% so với hoạt tính của AE ở 35°C). Vậy nên, ở pH 5,5 và 35°C, hoạt tính của *LsAE* sẽ đạt giá trị cao nhất.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới hoạt tính của enzyme *LsAE*.

(A) nhiệt độ, (B) pH, (C) độ bền nhiệt độ, (D) độ bền pH.

Độ bền nhiệt và pH của LsAE:

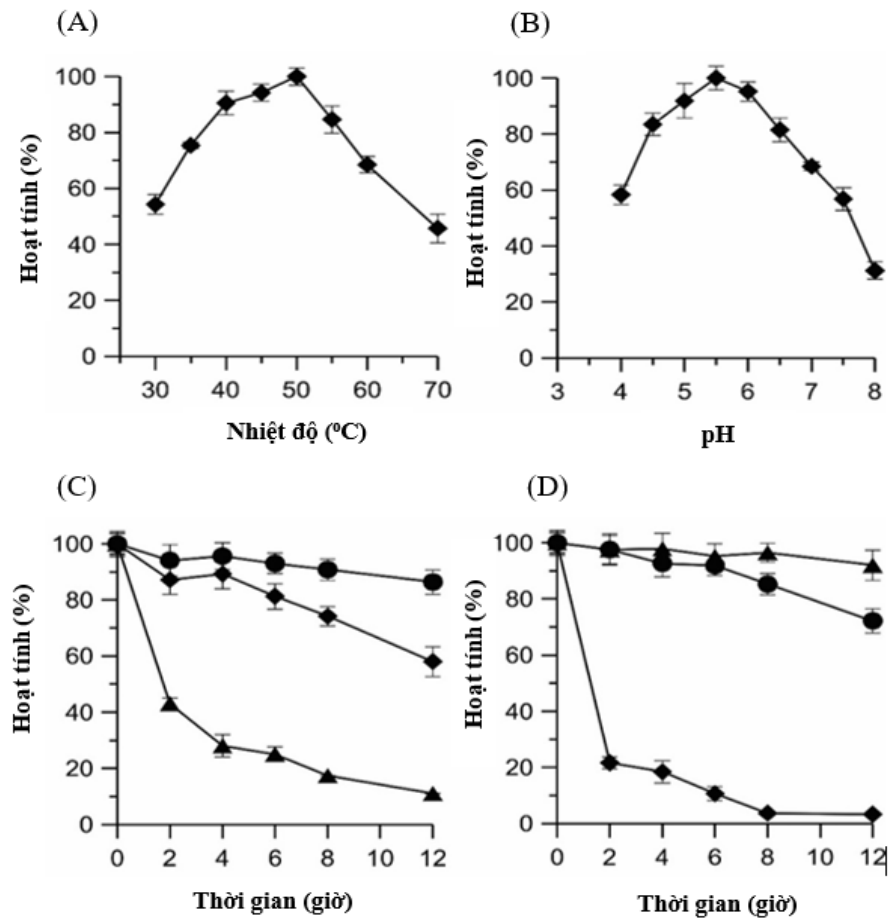
Độ bền hoạt tính AE phụ thuộc vào nhiệt độ được xác định ở pH 5,5 và 35°C trong khoảng ủ enzyme khác nhau (từ 0 tới 120 phút) ở những nhiệt độ khác nhau (4, 25, 40 và 60°C). Enzyme hoạt động tốt ở 4 và 25°C sau 1 giờ ủ, tuy nhiên hoạt tính giảm dần ở 1h tiếp theo. Sau 2h ủ thì hoạt tính giảm xuống xấp xỉ 60% so với ban đầu. Ở 40 và 60°C, hoạt tính bắt đầu giảm sau 40 phút ủ và sau 2h ủ thì hoạt tính giảm xuống tương ứng còn xấp xỉ 25% so với ban đầu. Enzyme tinh sạch cho thấy bền hoạt tính ở pH axit (pH 5,0), sau 6 giờ 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 6 giờ ủ.

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

Nhiệt độ và pH tối ưu:

Tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính của *CauCDH*, enzyme được ủ ở dải nhiệt độ 30-70°C ở pH 5,0, trong 10 phút.

Hoạt tính của *CauCDH* cao nhất ở 50°C khi so với những nhiệt độ khác lân cận. Ở 70°C hoạt tính *CauCDH* giảm xuống chỉ còn xấp xỉ 40% so với 50°C. Để khảo sát pH tối ưu, *CauCDH* được ủ ở dải pH (3-8), ở nhiệt độ 50°C, trong 10 phút. Hoạt tính *CauCDH* cao nhất ở pH 5,5, chứng tỏ *CauCDH* thích hợp với pH axit. Ở pH trung tính, hoạt tính *CauCDH* giảm dần dần, ở pH 8,0 hoạt tính giảm xuống còn xấp xỉ 25% so với pH 5,5. CDH từ chủng *Schizophyllum commune* cũng hoạt động tốt ở pH 5,5 tuy nhiên nhiệt độ tối ưu lại thấp hơn so với *CauCDH* (35°C) [153].



Hình 3.18. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới hoạt tính của *CauCDH*.

(A) nhiệt độ, (B) pH, (C) độ bền nhiệt độ, 25°C (●), 40°C (◆), 70°C (▲), (D) độ bền pH, pH 4 (▲), pH 7 (●), pH 8 (◆).

Độ bền nhiệt và pH:

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 12 giờ ủ,

tuy nhiên hoạt tính giảm dần ở 70°C, hoạt tính bắt đầu giảm sau 6 giờ ủ, sau 12 giờ ủ thì hoạt tính giảm xuống tương ứng còn xấp xỉ 15% so với ban đầu. Enzyme tinh sạch cho thấy bền hoạt tính ở pH axit (pH 4.0), sau 12 giờ 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 2 giờ ủ, và sau chỉ sau 8 giờ ủ enzyme hầu như không còn hoạt tính (Hình 3.18).

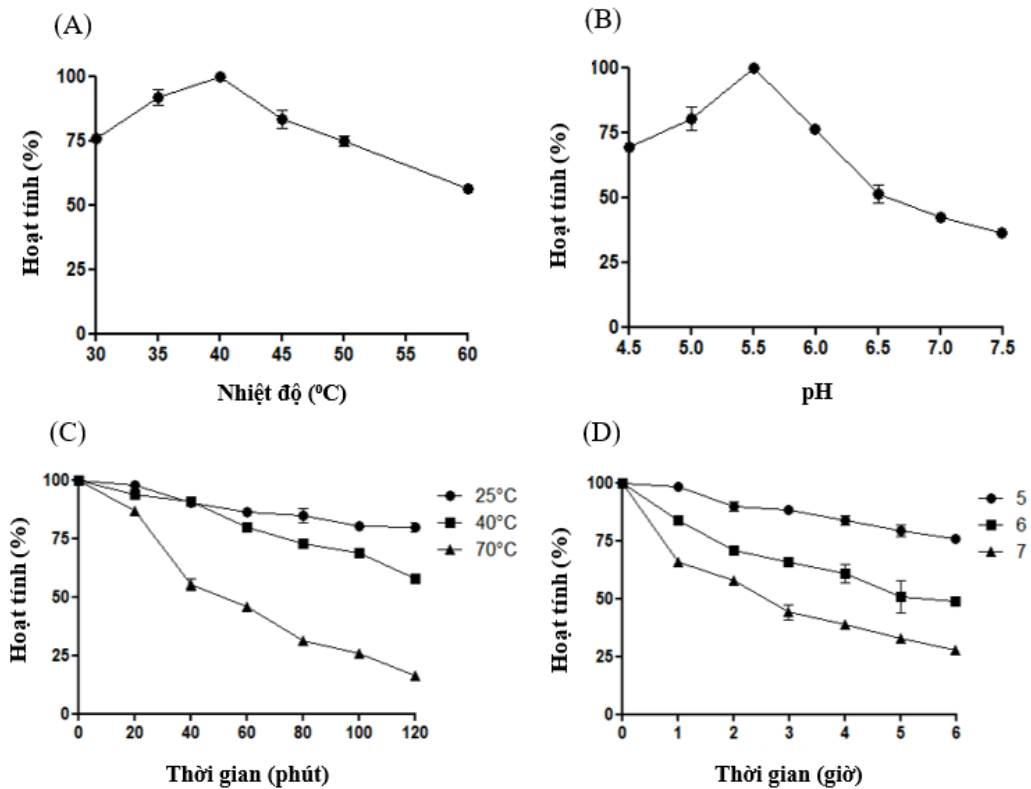
3.2.2.3. Xác định đặc tính của laccase (*PleuLac*) từ chủng *Pleurotus pulmonarius* MPN18

Nhiệt độ và pH tối ưu:

Để khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính của *PleuLac*, tiến hành ủ enzyme ở dải nhiệt độ 30-60°C ở pH 5,0, ủ trong 2 phút. Hoạt tính của *PleuLac* cao nhất ở 40°C khi so với những nhiệt độ khác lân cận. Ở 60°C hoạt tính *PleuLac* giảm xuống chỉ còn xấp xỉ 50% so với 40°C. Khảo sát pH tối ưu, *PleuLac* được ủ ở dải pH (4,5-7,5), ở nhiệt độ 40°C, trong 2 phút. Hoạt tính *PleuLac* cao nhất ở pH 5,5, chứng tỏ *PleuLac* thích hợp với pH axit. Ở pH trung tính, hoạt tính *PleuLac* giảm dần dần, ở pH 7,5 hoạt tính giảm xuống còn xấp xỉ 30% so với pH 5,5.

Độ bền nhiệt độ và pH:

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 hoạt động tốt 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. Ở pH trung tính (pH 7,0), hoạt tính enzyme giảm mạnh sau 6h, hoạt tính chỉ còn xấp xỉ 25% so với ban đầu (Hình 3.19).



Hình 3.19. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới hoạt tính của *PleuLac*.

A: Nhiệt độ tối ưu; B: pH tối ưu; C: độ bền nhiệt độ; D: độ bền pH

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

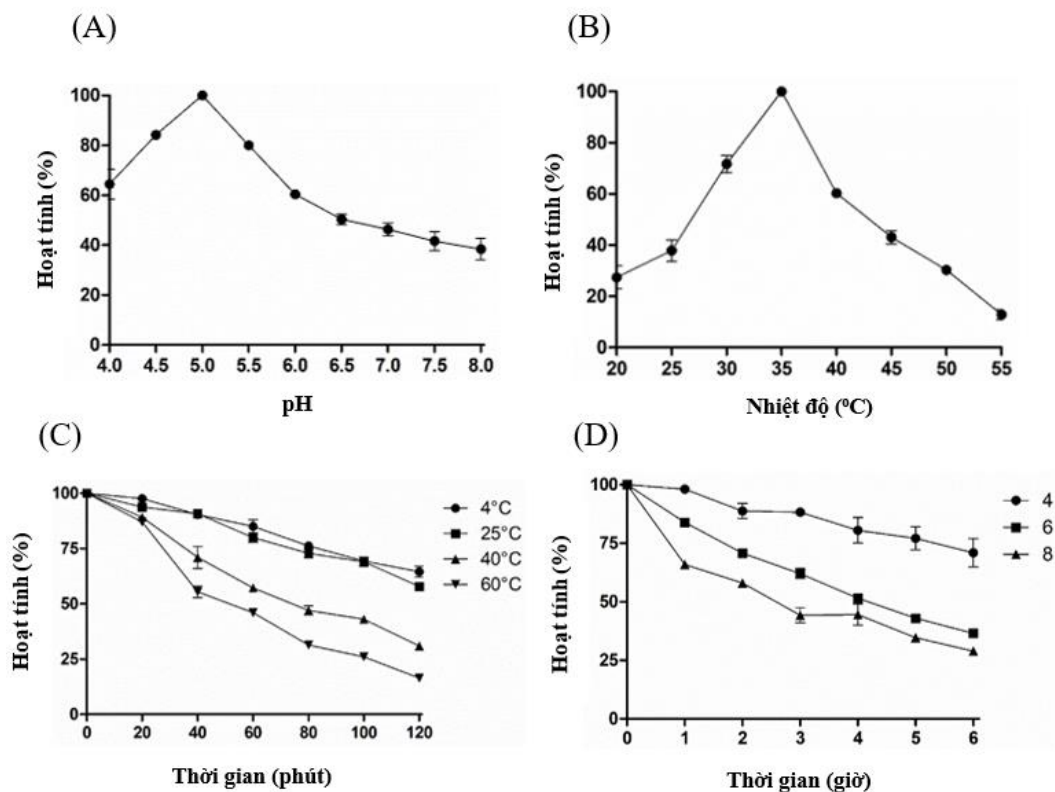
Nhiệt độ và pH tối ưu:

Để xác định pH tối ưu của *LsLiP*, hoạt tính peroxidase đã được xác định ở dải pH 4.0-8.0, ủ ở 2 phút, 37°C. Hoạt tính cao nhất của LiP cho thấy ở pH 5,0 và giảm dần khi pH tăng, ở pH 8 hoạt tính của LiP giảm xuống còn 40% so với pH 5,0 (Hình 3.20A). Thêm vào đó, hoạt tính LiP cũng đạt giá trị tối ưu ở 35°C khi được so sánh với những nhiệt độ lân cận (từ 20-55 °C), và giảm mạnh ở nhiệt độ 55 °C (chỉ còn xấp xỉ 10% so với hoạt tính của LiP ở 35 °C) (Hình 3.20B). Vậy nên, ở pH 5,0 và 35°C, hoạt tính của *LsLiP* sẽ đạt giá trị cao nhất.

Độ bền nhiệt độ và pH:

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 1 giờ

ủ, tuy nhiên hoạt tính giảm dần ở 1 giờ tiếp theo. Sau 2 giờ ủ thì hoạt tính giảm xuống xấp xỉ 60% so với ban đầu. Ở 40 và 60°C, hoạt tính bắt đầu giảm sau 40 phút ủ và sau 2 giờ ủ thì hoạt tính giảm xuống tương ứng còn 40 và 25% so với ban đầu (Hình 3.20C). 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 3 giờ ủ. Ở pH trung tính (pH 6.0), hoạt tính enzyme giảm dần đều từ 1 tới 6 giờ ủ. Tuy nhiên ở điều kiện pH 8.0, LiP mất xấp xỉ 80% hoạt tính trong thời gian ủ 6 giờ (Hình 3.20D).



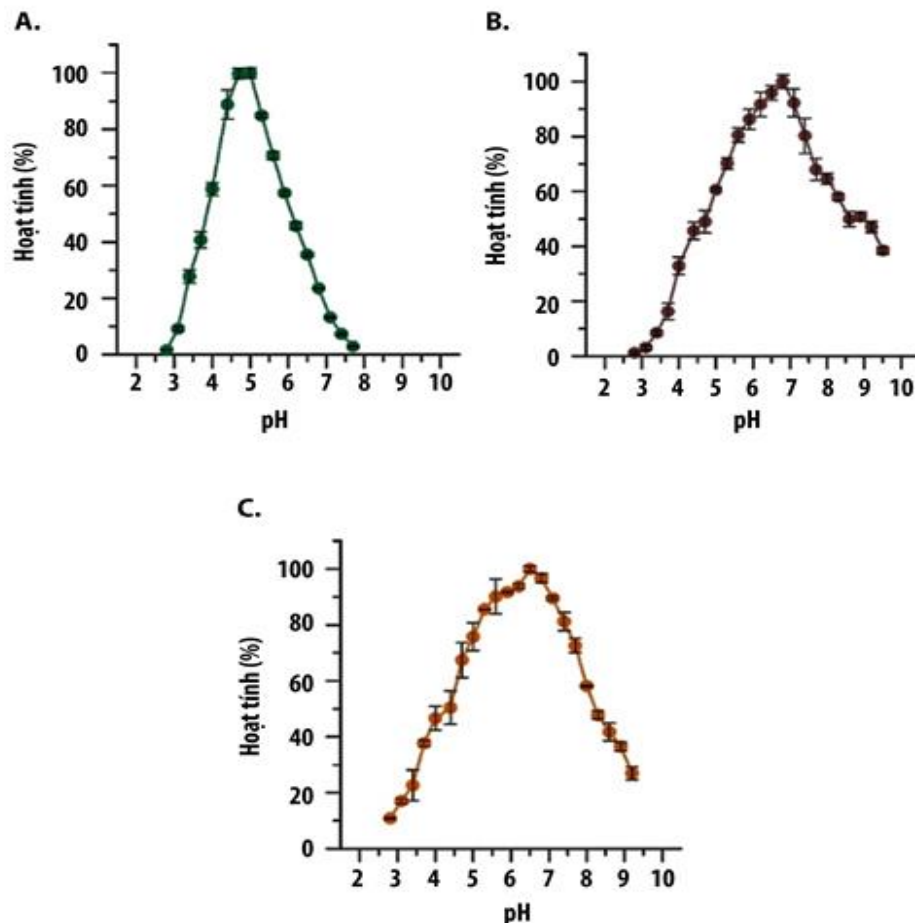
Hình 3.20. Ảnh hưởng pH và nhiệt độ tới hoạt tính *LsLiP*.

A: Nhiệt độ tối ưu; B: pH tối ưu; C: độ bền nhiệt độ; D: độ bền pH

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 được trình bày trong Hình 3.21. 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.



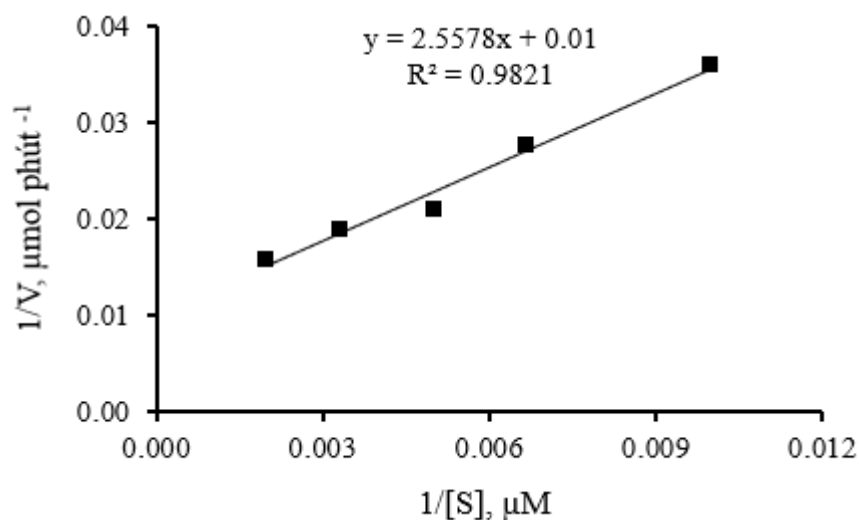
Hình 3.21. Ảnh hưởng pH tới hoạt tính *CeuUPO* đối với ABTS (A), veratryl alcohol (B) và 2,6-DMP (C).

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 (Hình 3.22). Các nồng độ *p*-nitrophenyl acetate khác nhau, từ 100 đến 500 μM được sử dụng để xác định vận tốc (V_{max}). Kết quả xác định được giá trị K_m là 255,7 μM và giá trị V_{max} là 100 $\mu\text{M}/\text{phút}$. Giá trị tốc độ xúc tác (k_{cat}) của phản ứng xúc tác là 119,6 s^{-1} , dẫn đến hiệu suất xúc tác (k_{cat}/K_m) là 0,46 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Giuliano và cộng sự đã xác

định giá trị K_m của AE từ chủng *Bacillus pumilus* là 500 μM , cao gấp 2 lần so với K_m của *LsAE* [158]. Bên cạnh đó, giá trị K_m của AE từ chủng *Talaromyces leycettanus* cũng đã được xác định là cao hơn *LsAE* gần 3 lần (739 μM) [159]. Từ đó, cho thấy *LsAE* đặc hiệu rất tốt đối với cơ chất *p*-nitrophenyl acetate so với những nghiên cứu trước đó.

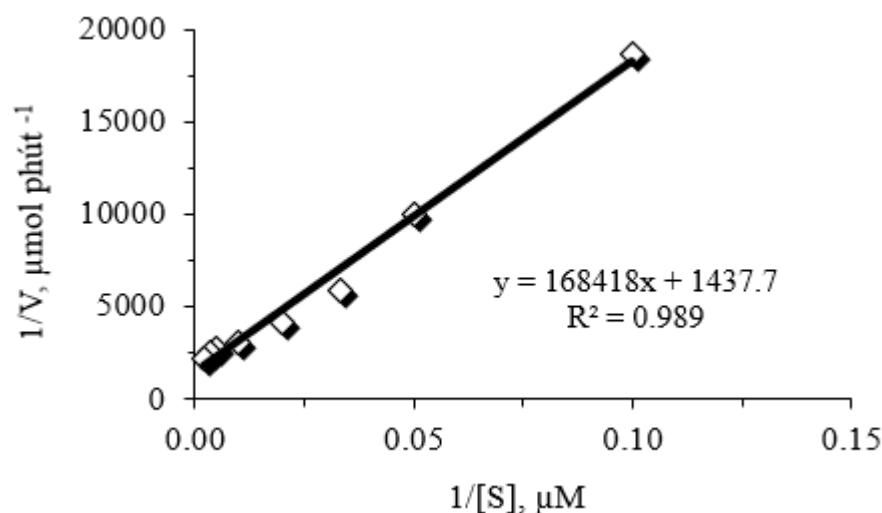


Hình 3.22. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của *LsAE* đối với cơ chất *p*-nitrophenyl acetate.

3.2.3.2. Động học xúc tác của *CauCDH*

Enzyme *CauCDH* có khả năng xúc tác phổ rộng các cơ chất, trong đó bao gồm cellobiose, lactose, cellotriose, cellotetraose, mannose và glucose. Thực vậy, 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 (Bảng 3.7). Ái lực cao nhất ($K_m = 117,1 \mu\text{M}$) 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 đặc hiệu nhất của *CauCDH* (Hình 3.23).

Trong số các carbohydrate khác nhau được thử nghiệm, di- và oligo-saccharide với liên kết β -(1,4) glycosidic là cơ chất mà *CauCDH* thể hiện tính đặc hiệu nhất, trong khi liên kết α -(1,4) có trong monosaccharide có ái lực và hiệu suất xúc tác thấp. Do đó, các CDH ưu tiên xúc tác các saccharide có liên kết β -(1,4) hòa tan hơn monosaccharide, dường như là đặc tính vốn có của các enzyme oxy hóa này từ các nguồn nấm [68].



Hình 3.23. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của *CauCDH* đối với cơ chất cellobiose.

Bảng 3.6. Đặc hiệu cơ chất của enzyme *CauCDH*.

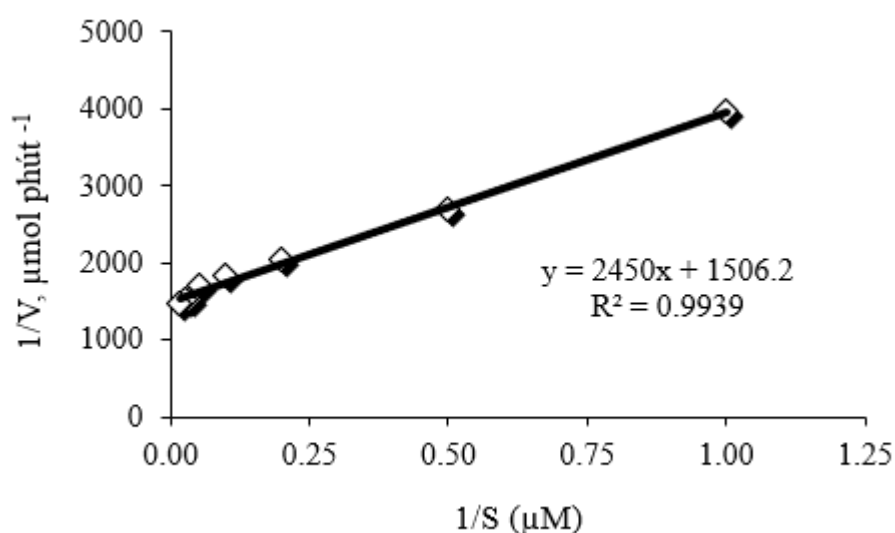
Cơ chất	K_m (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Cellobiose	117,1	30,2	$25,8 \times 10^4$
Cellotriose	205,5	26,6	$12,9 \times 10^4$
Cellotetraose	232,0	26,8	$11,6 \times 10^4$
Lactose	731,1	61,7	$84,5 \times 10^3$
Glucose	$49,2 \times 10^3$	8,9	180,3
Maltose	$1.354,0 \times 10^3$	29,4	21,7

Hơn nữa, sự kéo dài các đơn vị glucosyl của cello-oligosaccharide dẫn đến tăng ái lực cơ chất (giá trị K_m cao), ngược lại sẽ làm giảm hiệu suất xúc tác (k_{cat}/K_m thấp), điều này cũng đã được quan sát đối với các CDH khác như từ *Volvariella volvacea* [67], *T. clypeatus* [71]. Lactose mặc dù có sự tương đồng về cấu trúc, tuy nhiên cellobiose dường như là cơ chất tốt nhất của *CauCDH* do thể hiện ái lực cao nhất ($K_m = 117,1 \mu\text{M}$) và hiệu suất xúc tác ($k_{cat}/K_m = 25,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

3.2.3.3. Động học xúc tác của *PleuLac*

Hằng số động học của *PleuLac* tinh sạch đã được xác định bằng cơ chất ABTS (Hình 3.24). Các nồng độ ABTS khác nhau, từ 0,1 mM đến 1 mM

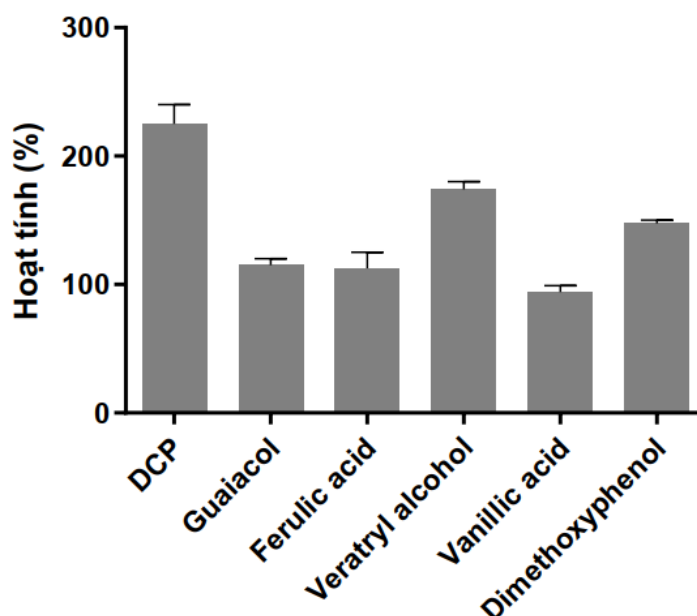
được sử dụng để xác định vận tốc (V_{max}). Kết quả xác định được giá trị K_m là 1,35 μM , nhỏ hơn giá trị K_m của laccase từ các chủng khác. Theo nghiên cứu của Han giá trị K_m của chủng nấm *T. versicolor* đạt 12,8 μM [160], K_m của *Y. lipolytica* là 50 μM [161]. Giá trị V_{max} của laccase đạt $30,4 \times 10^5 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) lớn hơn nhiều so với V_{max} của chủng *T. versicolor* ($135,4 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) [160], V_{max} của *Y. lipolytica* đạt $7,1 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ [161]. Giá trị k_{cat} của *PleuLac* là $10,39 \times 10^6 (\text{s}^{-1})$ lớn gấp nhiều lần so với chủng *T. versicolor* (5865s^{-1}) [161] và so với chủng *P. pastoris* (5899s^{-1}) [162]. Trong nghiên cứu này, giá trị k_{cat}/K_m đạt tới $7,72 \times 10^6 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, cao hơn nhiều so với enzyme các chủng nấm khác, chứng minh rằng hiệu quả xúc tác của *PleuLac* tinh sạch tốt hơn so với các nghiên cứu trước đó.



Hình 3.24. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của *PleuLac* đối với cơ chất ABTS.

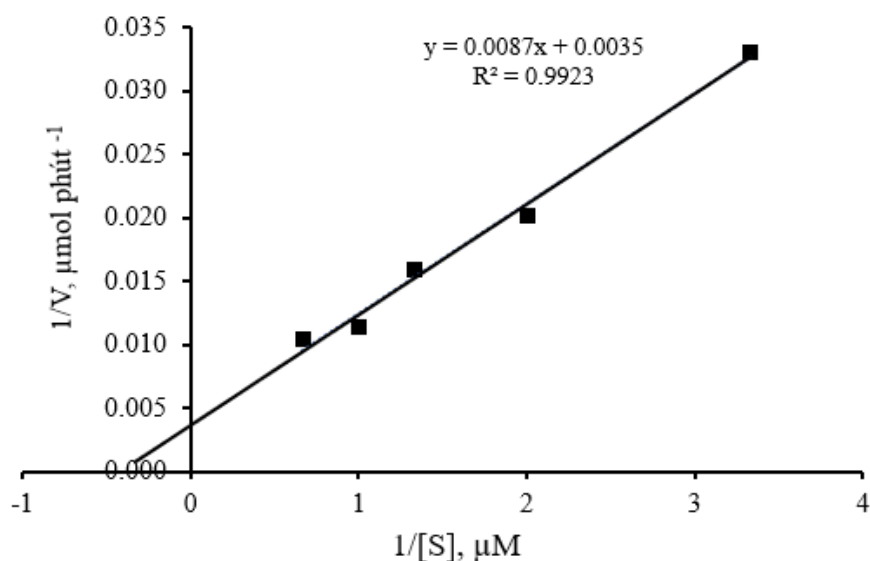
3.2.3.4. Động học xúc tác của *LsLiP*

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 ở Hình 3.25 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).



Hình 3.25. Đặc hiệu cơ chất của enzyme *LsLiP*.

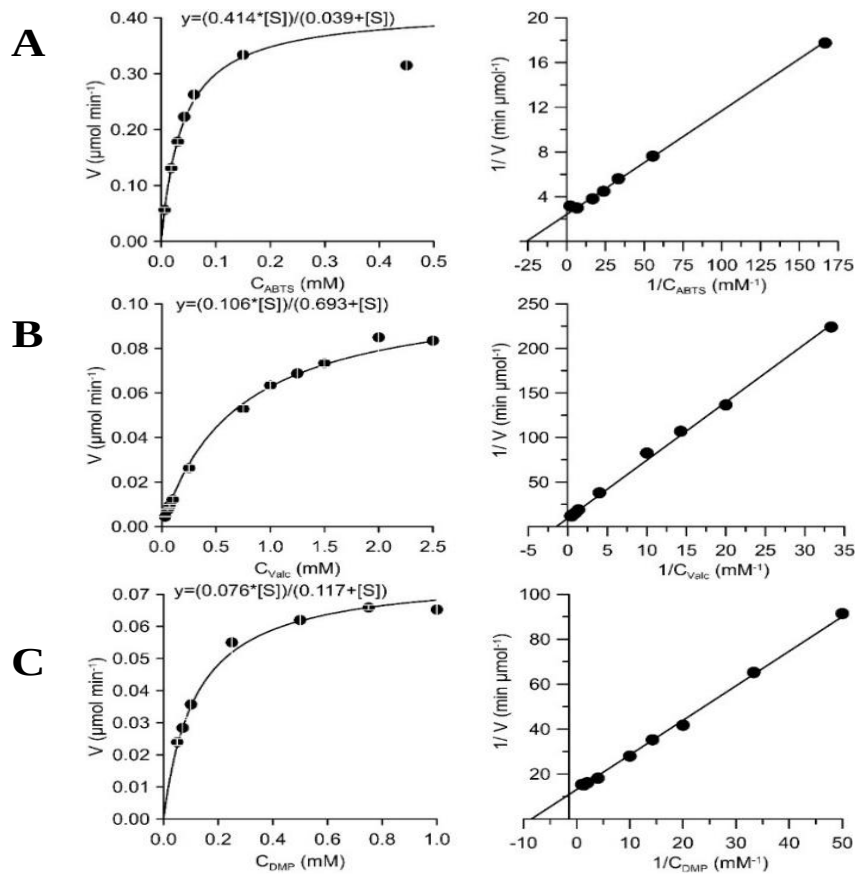
Hằng số động học của *LsLiP* tinh sạch đã được xác định với DCP làm cơ chất chính. Các nồng độ DCP khác nhau, từ 0,3 mM đến 1,5 mM được sử dụng để xác định vận tốc (V_{max}) (Hình 3.26). Kết quả xác định được giá trị K_m là 2,45 μM và giá trị V_{max} là 285 $\mu\text{M}/\text{phút}$. Giá trị tốc độ xúc 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 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. *LsLiP* có ái lực với cơ chất DCP lớn hơn 11 lần (28.5 μM) và hiệu suất xúc tác (k_{cat}/K_m) cao gấp 49 lần (0,098 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) so với LiP từ chủng nấm *Pleurotus pulmonarius* [163].



Hình 3.26. Động học xúc tác theo phương trình Lineweaver-Burk của *LsLiP* đối với cơ chất DCP.

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 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)], veratryl alcohol (VA), và 2,6-dimethoxyphenol (DMP) (Hình 3.27). 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 (Bảng 3.7). Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy rằng *CeuUPO* có thể xúc tác hiệu quả trong các phản ứng oxy hóa khác nhau, với khả năng xử lý DMP và VA mặc dù ái lực không mạnh bằng ABTS. Điều này mở ra khả năng sử dụng *CeuUPO* trong các ứng dụng xúc tác đa dạng, từ việc xử lý các hợp chất phenolic đến việc sản xuất các hợp chất hữu cơ có giá trị.



Hình 3.27. Động học xúc tác của *CeuUPO*.

Theo phương trình Michaelis-Menten (trái) và Lineweaver -Burk (phải), quá trình oxy hóa ABTS (A), veratryl alcohol (B) và 2,6-DMP (C).

Bảng 3.7. Các thông số động học xúc tác của *CeuUPO*

Cơ chất	K_m (μM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	pH
ABTS	39	0,414	270	$7,01 \times 10^6$	5,0
VA	693	0,106	69	$9,98 \times 10^4$	6,5
DMP	117	0,076	50	$4,23 \times 10^5$	6,5

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

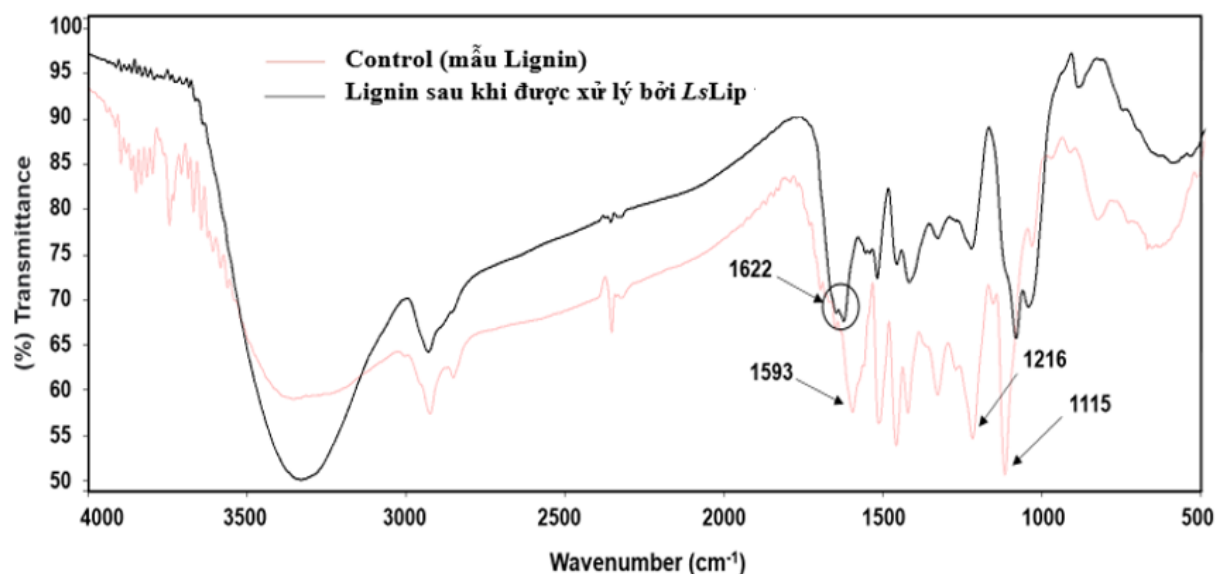
3.3.1. Nghiên cứu khả năng oxy hóa lignin bởi *LsLiP* từ nấm *L. squarrosulus* MPN12

Lignin có nguồn gốc từ rom, 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* được thể hiện trong Hình 3.28. Theo đó, vùng fingerprint ($1600\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) 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. Điều này chứng tỏ rằng cấu trúc tổng thể của lignin đã bị phá hủy ở một mức độ nhất định, sau khi xử lý bằng enzyme.

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. Cường độ của đỉnh tại 1216 cm^{-1} , đặc trưng cho sự kéo giãn của nhóm C-O thay đổi, điều này cho thấy nhóm carbonyl đã bị phá vỡ trong quá trình xử lý. Đỉnh 1450 cm^{-1} đặc trưng dao động biến dạng của C-H trong mặt phẳng dao động của khung vòng thơm của lignin, có cường độ giảm, chứng tỏ liên kết C-H của vòng thơm trong lignin có thể bị thế hoặc bị biến đổi.

Tuy nhiên, cũng không loại trừ khả năng sau khi phân hủy có sự trùng hợp giữa các chất hữu cơ trung gian. Đỉnh ở 1593 cm^{-1} , đại diện sự kéo giãn vòng aryl đối xứng trong lignin, cường độ peak giảm sau khi thủy phân bằng

enzyme, cho thấy có sự mở vòng hoặc thế vào vòng thơm. Sự xuất hiện peak 1622 cm^{-1} chứng tỏ một số sản phẩm mở vòng sau xử lý có chứa các nối đôi liên hợp. Đỉnh hấp thụ ở 2930 cm^{-1} biểu thị dao động kéo giãn đối xứng của nhóm CH_3 - và $-\text{CH}_2$ - trong lignin. Cường độ của đỉnh này giảm đáng kể sau khi thủy phân bằng enzyme, cho thấy lignin đã bị cắt mạch. Vùng ($3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$), đặc trưng liên kết O-H sau khi xử lý, cường độ tăng chứng tỏ thu được nhiều hợp chất phenol và alcohol.



Hình 3.28. Phổ FTIR của các mẫu lignin. Đối chứng (đường màu đỏ) và sau khi xử lý với enzyme *LsLip* (đường màu đen).

Theo nghiên cứu của Zhichao Deng (2019) sử dụng enzyme LiP kết hợp với laccase trong chuyển hóa lignin, phương pháp FTIR chỉ ra sự thay đổi vùng ($1420, 1640\text{ cm}^{-1}$) trong phổ của lignin, hoặc vùng 1734 cm^{-1} biểu thị sự dao động của nhóm C=O và nhóm p-coumaroyl, chứng tỏ rằng nhóm este liên kết bị phân cắt trong cấu trúc của lignin [40].

Như vậy, kết quả phân tích FTIR đã chỉ ra được vai trò của *LsLiP* rất quan trọng 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

Nhằm cải tiến hiệu suất chuyển hóa, việc sử dụng phối hợp hỗn hợp “enzyme cocktail” có tác dụng hiệp đồng tốt hơn so với đơn enzyme trong chuyển hóa lignocellulose giải phóng carbohydrat. Do vậy, trong nghiên cứu

này, cơ chất rom (3%, w/v) được sử dụng là nguồn cơ chất giàu lignocellulose cho nghiên cứu chuyển hóa giải phóng sản phẩm carbohydrate (glucose, xylose) và axit gluconic bởi hỗn hợp “enzyme cocktail”, bao gồm enzyme cellobiose dehydrogenase (CDH, 28,86 U/mg; pH_{opt} 5,0; t_{opt} 45°C) xúc tác hiệp đồng với carboxymethyl cellulase/glucuronoxylanase (Cell/Xyl; hoạt độ riêng 1.6 U/mg; pH_{opt} 5,0-5.5; t_{opt} 50°C) và acetyl esterase (AE; 1,3 U/mg; pH_{opt} 5,0; t_{opt} 42°C).

Phản ứng chuyển hóa được thực hiện trong đệm MOPS 100 mM, pH 5,0, nhiệt độ 45°C và ủ 48 giờ, hoạt độ enzyme/cơ chất (U/g) của từng enzyme được thay đổi theo biên độ khảo sát. Trong hệ enzyme cocktail, mỗi loại enzyme đảm nhận một vai trò chuyên biệt nhưng có tính hỗ trợ, cùng tham gia vào quá trình giải phóng đường đơn và các hợp chất sinh học giá trị cao. Carboxymethyl cellulase (CMCase), một dạng endoglucanase, xúc tác sự cắt đứt liên kết β -1,4-glycosidic bên trong chuỗi cellulose, làm giảm tính nhớt và giải phóng các oligosaccharide cellulose, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho các enzyme khác tiếp cận cơ chất. Hoạt động này là bước khởi đầu quan trọng trong việc giải phóng glucose từ thành phần cellulose. Glucuronoxylanase, thuộc nhóm hemicellulase, có khả năng thủy phân các liên kết trong xylan mạch chính và loại bỏ các nhánh chứa axit gluconic, từ đó thúc đẩy giải phóng xylosen – loại đường pentose chủ yếu trong hemicellulose. Hỗ trợ cho hai enzyme này, acetyl esterase xúc tác sự loại bỏ các nhóm acetyl gắn trên hemicellulose, qua đó làm giảm độ che chắn cấu trúc và tăng hiệu quả thủy phân của glucuronoxylanase, giúp giải phóng nhiều xylose hơn. Đặc biệt, cellobiose dehydrogenase (CDH) đóng vai trò oxy hóa cellobiose và các oligosaccharide cello-oligosaccharide thành axit gluconic và các dẫn xuất. Do vậy, mục đích trong nghiên cứu này sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm để tối ưu hoạt độ của hỗn hợp enzyme làm tăng hiệu suất chuyển hóa cơ chất rom thành carbohydrate.

Trong 5 thí nghiệm đầu, tỷ lệ hoạt độ enzyme/cơ chất của Cell/Xyl thay đổi trong khi tỷ lệ này với enzyme CDH và AE được giữ cố định tương ứng là 25 và 40 U/g. Hình 3.29-a thể hiện khi Cell/Xyl tăng từ 6 đến 24 U/g thì hàm lượng glucose tăng từ 85,1 đến 142,1 mg/g, xylose tăng 18,6 - 48,3 mg/g và axit gluconic từ 2,55 - 3,63 mg/g. Trong giai đoạn này, sản phẩm sinh ra phụ

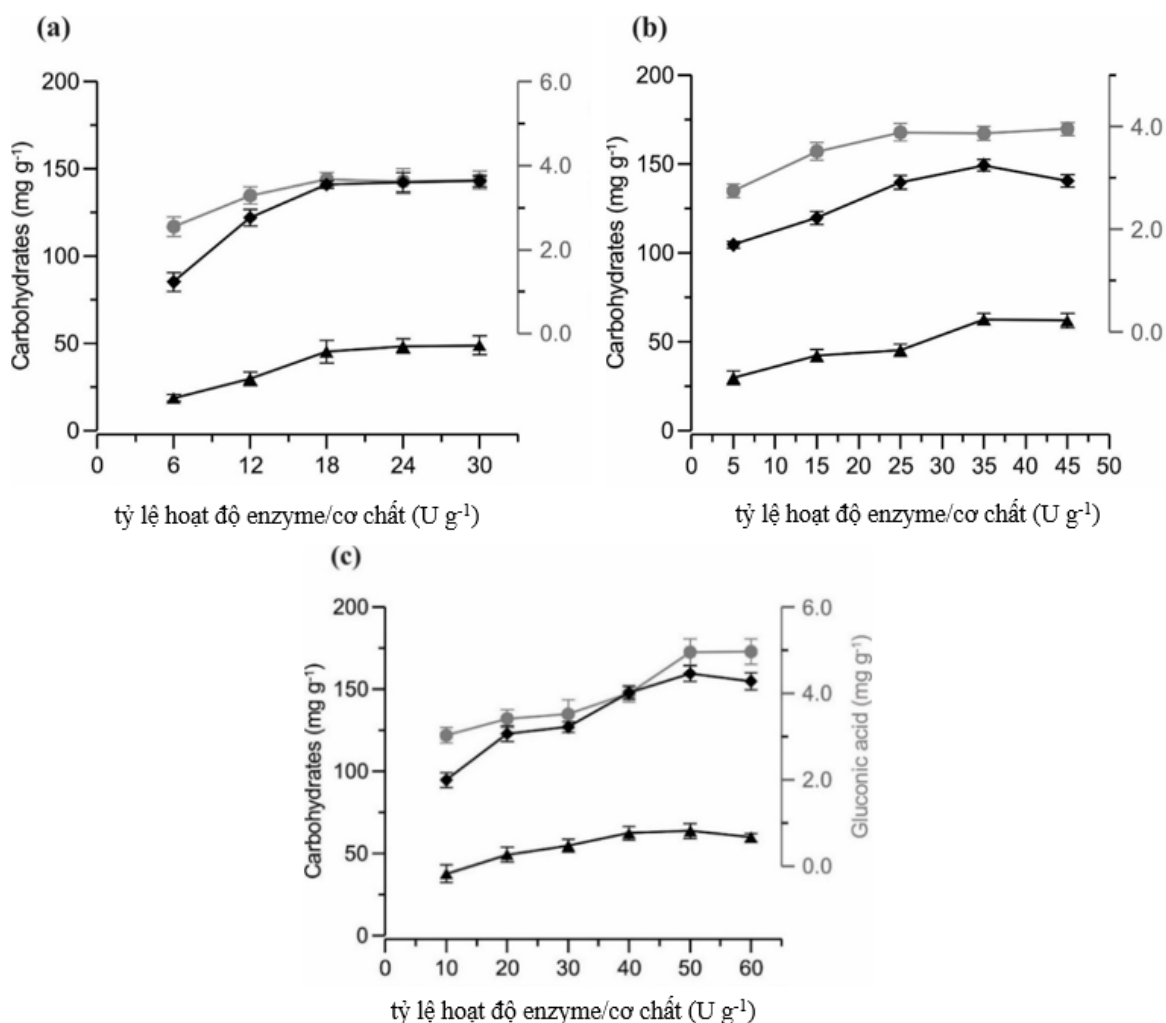
thuộc nhiều vào tác động của hỗn hợp enzyme lên cơ chất. Do đó, các cấu trúc dễ bị tấn công của cơ chất còn nhiều và không có chất ức chế hoạt tính nên enzyme bắt đầu chuyển hóa mạnh lượng cellulose được giải phóng. Đây là giai đoạn các đường đơn (glucose, xylose) được sinh ra nhanh và nhiều nhất trong suốt quá trình phản ứng. Tuy nhiên, khi tăng hoạt độ enzyme lên 30 U/g thì sản phẩm chuyển hóa tăng không nhiều, có thể do trong giai đoạn này sản phẩm glucose tích tụ trong dung dịch gây ức chế enzyme, đồng thời lượng cellulose được giải phóng đã giảm. Mặt khác, hoạt tính enzyme có thể giảm nhiều sau khoảng thời gian ủ dài và một phần enzyme “bị nhốt” trong cấu trúc xóp của cellulose. Như vậy, 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 và 18 U/g.

Trong 5 thí nghiệm tiếp theo, hoạt độ enzyme AE được khảo sát từ 5-45 U/g, khi đó Cell/Xyl được cố định ở tâm thí nghiệm (18 U/g) và CDH được giữ ở 40 U/g. Hình 3.29-b thể hiện khi hoạt độ AE tăng từ 5-35 U/g thì hàm lượng glucose tăng từ 104,5 – 149,2 U/g, xylose tăng từ 29,6 – 62,6 U/g và axit gluconic tăng từ 2,75 – 3,87 U/g. Nếu tiếp tục tăng hoạt độ AE lên 45 U/g thì hàm lượng glucose và gluconic tăng không đáng kể, tương ứng 140,3 và 3,96 mg/g, trong khi xylose giảm nhẹ (61,8 mg/g). Như vậy, miền khảo sát thích hợp và tâm thí nghiệm đối với enzyme AE từ 25 – 45 U/g và 35 U/g.

Trong 5 thí nghiệm cuối cùng thể hiện trên hình 3.29-c, ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme CDH từ 10 đến 50 U được khảo sát trong khi hai enzyme khác (Cell/Xyl 18 U/g và AE 35 U/g) được giữ cố định. Trong miền khảo sát, tăng tỷ lệ CDH từ 10 đến 60 U/g cho hiệu suất chuyển hóa tạo sản phẩm glucose, xylose và axit gluconic tăng, và lần lượt đạt 159,3; 63,6 và 4,96 mg/g ở tỷ lệ 50 U/g CDH/cơ chất. Ở hoạt độ CDH cao hơn (đến 60 U/g), sản phẩm tăng không đáng kể, tương ứng đạt 154,7; 59,7 và 4,97 mg/g. Do đó, miền khảo sát thích hợp và tâm thí nghiệm đối với enzyme CDH tương ứng là 40 – 60 U/g và 50 U/g.

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) 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 và 18 U/g, đối với enzyme AE từ 25 – 45 U/g và 35 U/g, và đối với enzyme CDH tương ứng là 40 – 60 U/g và 50 U/g.



Hình 3.29. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng đơn yếu tố.

Tỷ lệ hoạt độ enzyme/cơ chất (U /g) và sản phẩm tạo thành là carbohydrate [glucose (◆), xylose (▲)] và axit gluconic (●; mg/g). (a) Ảnh hưởng của nồng độ Cell/Xyl; (b): Ảnh hưởng của nồng độ AE; (c): Ảnh hưởng của nồng độ CDH.

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) được chọn là biến độc lập. Nhìn chung, sự gia tăng đáng kể nhất của các chất chuyển hóa được quan sát ở các tỷ lệ

enzyme/cơ chất 18 U/g đối với Cell/Xyl, 35 U/g đối với AE và 50 U/g 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 đối với Cell/Xyl, 25, 35, 45 U /g 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 3.8).

Bảng 3.8. 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)	A	6	12	18	24
Z ₂ : AE (U/g)	B	10	25	35	45
Z ₃ : CDH (U/g)	C	10	40	50	60

Các biến phụ thuộc, hiệu suất/hàm lượng (Y) của sản phẩm glucose (mg /g), xylose (mg /g) và axit gluconic (mg /g) được xác định qua thực nghiệm thể hiện trong thiết kế ma trận (Bảng 3.9). 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 (Bảng 3.10). 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 (Bảng 3.11). 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. 9. Thiết kế thực nghiệm và các giá trị tương ứng.

Run	A	B	C	Y ₁	Y ₂	Y ₃
	Cell/Xyl (U/g)	AE (U/g)	CDH (U/g)	Glucose (mg/g)	Xylose (mg/g)	Axit gluconic (mg/g)
1	-1	-1	0	114,12 ± 3,43	44,14 ± 0,55	2,75 ± 0,12
2	+1	-1	0	125,35 ± 2,54	51,45 ± 0,85	4,58 ± 0,20
3	-1	+1	0	147,21 ± 4,21	57,12 ± 1,54	3,91 ± 0,24
4	+1	+1	0	159,61 ± 3,67	62,04 ± 1,10	4,91 ± 0,16
5	-1	0	-1	135,12 ± 4,07	54,11 ± 0,87	3,16 ± 0,16
6	+1	0	-1	144,23 ± 2,98	59,21 ± 1,12	4,48 ± 0,21
7	-1	0	+1	146,22 ± 1,87	57,96 ± 0,67	3,42 ± 0,22
8	+1	0	+1	157,98 ± 4,12	64,23 ± 1,23	4,97 ± 0,18
9	0	-1	-1	115,34 ± 3,10	45,38 ± 0,98	3,52 ± 0,09
10	0	+1	-1	146,26 ± 2,59	57,31 ± 0,95	4,80 ± 0,16
11	0	-1	+1	126,77 ± 3,28	50,63 ± 1,05	3,92 ± 0,10
12	0	+1	+1	160,33 ± 5,23	63,71 ± 1,35	5,03 ± 0,13
13	0	0	0	156,27 ± 2,45	62,22 ± 1,38	4,94 ± 0,13
14	0	0	0	159,24 ± 2,60	63,35 ± 0,87	4,97 ± 0,12
15	0	0	0	163,11 ± 3,90	64,12 ± 0,90	5,12 ± 0,15

Bảng 3.10. Hệ số hồi quy của các mô hình đa thức bậc hai được dự đoán cho hàm lượng glucose (Y1), hàm lượng xylose (Y2) và hàm lượng axit gluconic (Y3)

Nguồn	Y ₁		Y ₂		Y ₃	
	Giá trị <i>F</i>	Giá trị <i>p</i>	Giá trị <i>F</i>	Giá trị <i>p</i>	Giá trị <i>F</i>	Giá trị <i>p</i>
Model	84,44	< 0,0001*	110,35	< 0,0001*	38,60	0,0004*
A	48,41	0,0009*	110,88	0,0001*	165,50	< 0,0001*
B	424,85	< 0,0001*	469,81	< 0,0001*	76,87	0,0003*
C	61,98	0,0005*	83,86	0,0003*	9,94	0,0253*
AB	0,067	0,8062 ^{NS}	2,27	0,1919 ^{NS}	6,89	0,0468*
AC	0,34	0,5833 ^{NS}	0,53	0,4946 ^{NS}	0,52	0,5032 ^{NS}
BC	0,34	0,5833 ^{NS}	0,53	0,5002 ^{NS}	0,30	0,6056 ^{NS}
A ²	36,70	0,0018*	35,64	0,0019*	62,11	0,0005*
B ²	181,16	< 0,0001*	294,88	< 0,0001*	16,63	0,0096*
C ²	30,73	0,0026*	21,00	0,0059*	19,82	0,0067*
<i>R</i> ²	0,9835		0,9850		0,9858	
<i>Adj R</i> ²	0,9617		0,9660		0,9603	

**p* < 0,05; NS = không tín hiệu

Bảng 3.11. Mô hình phương trình đa thức bậc hai, hàm lượng glucose (Y1), xylose (Y2) và axit gluconic (Y3).

Đáp ứng	Phương trình mô hình	Giá trị <i>R</i> ²	Giá trị <i>p</i>
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

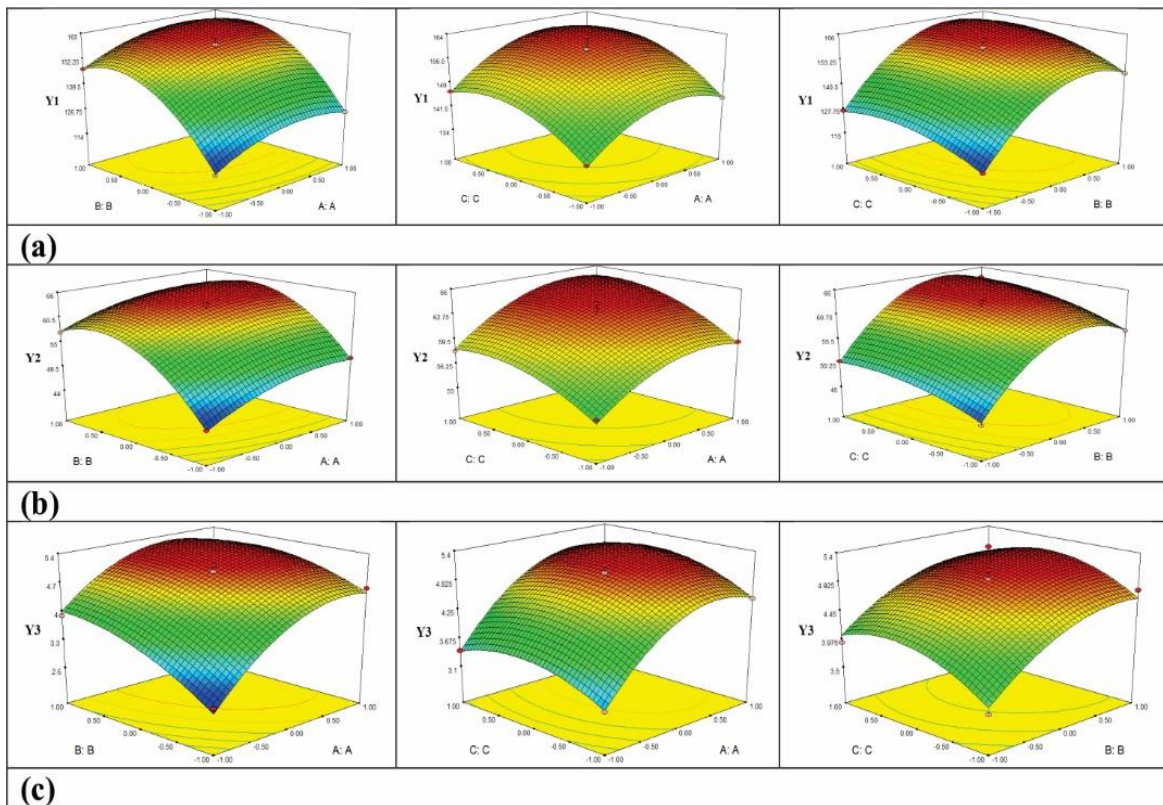
3.3.2.3. Phân tích đáp ứng bề mặt và xác minh mô hình

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); Cell/Xyl và CDH (AE, 35 U /g); AE và CDH (Cell/Xyl, 18 U /g). Trục z đại diện cho một trong ba chỉ số đánh giá (Y_1 -glucose, Y_2 -xylose và Y_3 -gluconic axit) và được dành riêng cho đáp ứng dự đoán, dẫn đến ba biểu đồ riêng biệt. Các đáp ứng bề mặt 3D được xây dựng như Hình 3.32. 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 3.12.

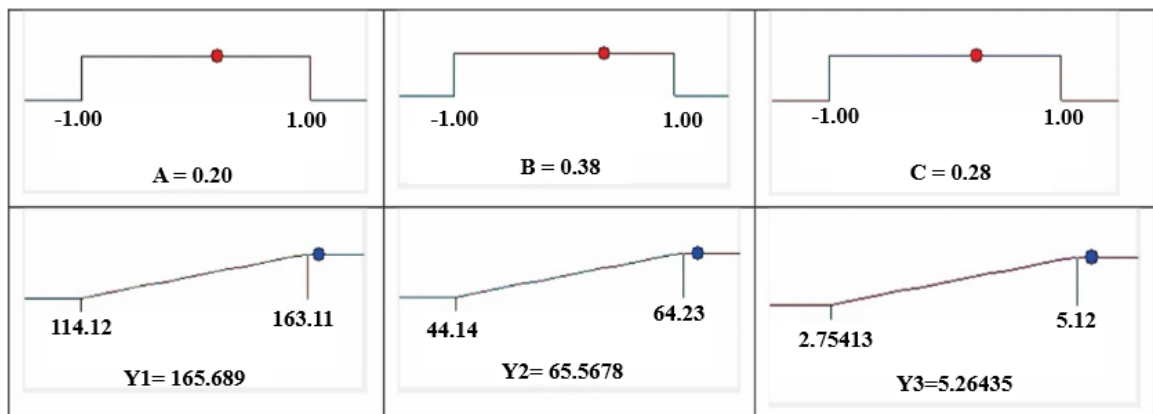
Như thể hiện ở Hình 3.30 a-b, có thể đạt được sự cải thiện trong các hàm mục tiêu, tức là Y_1 và Y_2 sau khi tăng giá trị của các tham số A, B, C và ngược lại. Đặc biệt, giá trị Y_3 đã được cải thiện đáng kể sau khi chỉ tăng các tham số A và B riêng lẻ, và giảm khi tăng tham số C. Do đó, có mối tương quan trực tiếp giữa các hàm mục tiêu (nghĩa là Y_1 , Y_2 , và Y_3) và các tham số riêng lẻ (A, B và C) của các phương trình mô hình như trong Bảng 3.12. Trong đó, mức độ ảnh hưởng của các tham số bậc hai A^2 , B^2 , C^2 là không đáng kể so với lần lượt A, B, C do độ biến thiên của chúng nằm trong khoảng (-1, +1).

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 Y_1 , Y_2 , và Y_3 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 (như trong Bảng 3.12 & 3.13). 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 đối với Cell/Xyl, 38,8 U/g đối với AE và 52,8 U/g 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 $165,18 \pm 3,19$; $64,21 \pm 1,22$ và $5,17 \pm 0,13$ (mg/g) tương ứng

với lượng (sản phẩm/cơ chất, w/w) là các đường C-5, C-6 (glucose, xylose) và gluconic axit.



Hình 3.30. Biểu đồ tương tác của các thông số của hiệu suất sản phẩm (Trong đó (a): Y_1 -glucose, (b): Y_2 -xylose, and (c): Y_3 - axit gluconic)



Hình 3.31. Điều kiện tối ưu bằng giải pháp đường dốc.

Bảng 3.12. Giá trị của biến độc lập và biến thực.

Biến mã			Biến thực		
A	B	C	Cell/xyl	AE	CDH
0,2	0,38	0,28	19,2	38,8	52,8

Bảng 3. 13. 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)	165,18 ± 3,19	165,69
Y ₂ – Xylose (mg/g)	64,21 ± 1,22	65,57
Y ₃ – Axit gluconic (mg/g)	5,17 ± 0,13	5,26

Cũng liên quan đến hướng nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu của Rossana Liguori và cộng sự đã sử dụng mô hình tối ưu thực nghiệm để xác định các điều kiện tối ưu cho hỗn hợp gồm 2 enzyme (cellulases, xylanases) tinh sạch từ *T. reesei* ATCC26921 sử dụng để chuyển hóa cây sậy. Kết quả thí nghiệm đã xác định được điều kiện để chuyển hóa hiệu quả diễn ra ở 45°C, pH 3.5, sau 96 giờ ủ, tổng đường khử thu được đạt 480,1 mg/g [164].

Theo nghiên cứu của Badal cũng đã xác định được các điều kiện tối ưu của hỗn hợp “enzyme cocktail” (cellulase, β -glucosidase, xylanase và esterase) trên cơ chất rơm rạ ở 45°C, pH 5,0, sau 72 giờ ủ. Tổng hàm lượng đường khử sinh ra đạt 465 mg/g bằng phương pháp sử dụng mô hình tối ưu thực nghiệm [165].

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, AE, 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.

CHƯƠNG IV: THẢO LUẬN

4.1. Khả năng sinh tổng hợp các enzyme của các chủng nấm

Khả năng sinh tổng hợp nhóm enzyme (lignin peroxidase, cellobiose dehydrogenase, laccase, acetyl esterase và unspecific peroxygenase) của 56 chủng nấm lựa chọn đã được đánh giá, cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các chủng. Trong số 56 chủng nấm, tất cả đều sinh tổng hợp ít nhất một loại enzyme, trong đó 21/56 chủng (chiếm 37,5%) có khả năng đồng thời sinh tổng hợp cả 5 loại enzyme. Các chủng tiêu biểu gồm CP5, CP7, CP13, CP19, CP21, CP22, CP26, CP29, MPN9, MPN11, MPN12, MPN15, MPN18, MPL13, MPN25, MPN29, MPG04, MPG05, MPG08 và MPG12. Tuy nhiên, mỗi chủng nấm có khả năng biểu hiện tốt ở từng loại enzyme khác nhau, cho thấy sự khác biệt đáng kể phụ thuộc vào loài, điều kiện nuôi cấy và loại cơ chất cảm ứng. Những kết quả này khẳng định rằng nguồn nấm thu thập từ rừng tự nhiên Việt Nam, cụ thể là Cúc Phương và Mùong Phăng, là nguồn tài nguyên tiềm năng để khai thác các enzyme có khả năng chuyển hóa sinh khối lignocellulose.

Từ kết quả định tên nấm và đánh giá hoạt độ enzyme, có thể thấy rằng bốn chủng MPN12, MPG14, MPN18 và CP22 được lựa chọn có khả năng biểu hiện tốt ở từng loại enzyme khác nhau. Chủng *L. squarrosulus* MPN 12 có khả năng sinh tổng hợp tốt nhất cả hai enzyme lignin peroxidase và acetyl esterase. Tuy nhiên, chủng *C. aureogranulatus* MPG14 và chủng *P. pulmonarius* MPN18 là hai chủng có khả năng sinh tổng hợp tốt lần lượt các enzyme cellobiose dehydrogenase và laccase. Trong khi đó, enzyme unspecific peroxygenase được sinh tổng hợp tốt nhất ở chủng *C. eurysporus* CP22. Nhiều loài nấm đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp lignin peroxidase, laccase, acetyl esterase và cellobiose dehydrogenase với năng suất cao, điển hình như *P. chrysosporium*, *T. versicolor* và *P. ostreatus* [57, 73, 113, 164]. Các loài này thường được sử dụng làm mô hình nghiên cứu enzyme liên quan đến phân hủy lignin. Enzyme unspecific peroxygenase lại thường được nghiên cứu nhiều nhất, với hoạt tính cao từ loài nấm *Agrocybe aegerita*, một loài nấm basidiomycete nổi bật trong việc phân hủy lignin và các hợp chất phenolic nhờ vào hoạt tính mạnh mẽ của UPO [66]. Vì

vậy, bốn chủng nấm được lựa chọn đều là những chủng nấm tiềm năng và cần được nghiên cứu thêm.

Trong nghiên cứu này, peptone và cao nấm men được xác định là các nguồn nitơ hữu cơ phù hợp, hỗ trợ hiệu quả quá trình sinh tổng hợp enzyme của các chủng nấm, vượt trội so với các nguồn nitơ vô cơ. Điều này có thể giải thích do nguồn nitơ hữu cơ cung cấp amino axit, peptide, và các yếu tố tăng trưởng khác hỗ trợ sự phát triển toàn diện của nấm, giúp nấm hấp thụ nitơ một cách hiệu quả hơn, dẫn đến sự gia tăng sinh khối và tăng sinh enzyme. Ngược lại, các nguồn nitơ vô cơ chỉ cung cấp nitơ dưới dạng ion, có thể không đầy đủ hoặc không dễ hấp thụ bằng nguồn nitơ hữu cơ, do đó, sự phát triển của nấm và sinh enzyme trong môi trường này kém hơn. Trong điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu, chủng *L. squarrosulus* MPN12 tạo enzyme AE với hoạt tính cao nhất, đạt 5.221,6 U/L trong môi trường chứa peptone, trong khi enzyme LiP của chủng này đạt mức cao nhất là 68,5 U/mL trong môi trường chứa cao nấm men. Chủng *P. pulmonarius* MPN18 và *C. aureogranulatus* MPG14 lần lượt đạt hoạt tính enzyme laccase và CDH cao nhất khi sử dụng peptone làm nguồn nitơ. Tuy nhiên, chủng *C. eurysporus* CP22 đạt hoạt tính enzyme UPO cao nhất trong môi trường chứa cao nấm men. Các kết quả trên cho thấy, loại nguồn nitơ và điều kiện nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa khả năng sinh enzyme của các chủng nấm. Peptone là nguồn nitơ hữu cơ ưu việt, đặc biệt phù hợp để thúc đẩy sinh tổng hợp enzyme AE, laccase và CDH, trong khi cao nấm men lại hiệu quả hơn trong việc kích thích sản xuất enzyme LiP và UPO. Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng nguồn nitơ đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp enzyme từ nấm [166, 167]. Levin và cộng sự đã chứng minh rằng việc bổ sung peptone vào môi trường nuôi cấy làm tăng đáng kể hoạt tính enzyme laccase ở các chủng nấm mục trắng *Lentinus edodes* IBB 363 và *Pleurotus dryinus* IBB 903. Tuy nhiên, đáng chú ý là sự thay đổi nồng độ peptone không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính enzyme peroxidase ở các chủng nấm này [168]. Điều này cho thấy rằng mỗi loại enzyme có thể phản ứng khác nhau với các nguồn nitơ và nồng độ của chúng trong môi trường nuôi cấy. Nghiên cứu của Elisashvili và cộng sự (2008) đã ghi nhận rằng các nguồn nitơ hữu cơ, như peptone và cao nấm men, thường có tác động mạnh hơn so với nguồn nitơ vô

cơ trong việc kích thích sinh tổng hợp các enzyme như laccase, peroxidase và esterase ở nhiều loài nấm khác nhau [169]. Một nghiên cứu khác của Baldrian (2004) cho thấy, việc kết hợp nguồn nitơ hữu cơ với các điều kiện môi trường tối ưu không chỉ thúc đẩy hoạt tính enzyme mà còn làm tăng tính ổn định và thời gian hoạt động của chúng [170]. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc lựa chọn loại và nồng độ nguồn nitơ phù hợp trong thiết kế môi trường nuôi cấy, đặc biệt khi mục tiêu là tối đa hóa hiệu suất sản xuất một loại enzyme cụ thể. Ngoài ra, các yếu tố như thời gian nuôi cấy và cách bổ sung nguồn nitơ cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp enzyme.

4.2. Đặc tính các enzyme từ các chủng nấm tiềm năng

Mỗi enzyme có cấu trúc và cơ chế hoạt động riêng, do đó việc hiểu rõ cách thức hoạt động của từng loại enzyme để tối ưu hóa chúng trong ứng dụng thực tế không hề dễ dàng. Trong nghiên cứu này, kết quả đã thu được 05 enzyme tinh sạch từ 4 chủng nấm tiềm năng, mỗi enzyme lại có điều kiện nuôi và quy trình tinh sạch khác nhau. Enzyme sau khi được tinh sạch đã được phân tích đặc điểm hoạt động sinh học, bao gồm nhiệt độ tối ưu, pH tối ưu, cũng như khả năng chịu nhiệt và độ ổn định trong điều kiện môi trường khác nhau. Kết quả cho thấy, một số enzyme có khả năng hoạt động mạnh ở nhiệt độ cao và môi trường pH trung tính, trong khi các enzyme khác lại phát huy hiệu quả trong điều kiện axit hoặc kiềm.

4.2.1. Enzyme acetyl esterase từ *L. squarrosulus* MPN12 (LsAE)

Hoạt tính của LsAE đạt giá trị cao nhất ở pH 5,5, trong khi đó ở nghiên cứu của Linden và cộng sự đã chỉ ra rằng AE từ chủng nấm *Aspergillus niger* hoạt động tối ưu ở pH trung tính (7,0) [171]. Sự khác biệt về pH tối ưu có thể là do sự khác biệt về cấu trúc phân tử và môi trường sống tự nhiên của các chủng nấm sản sinh ra enzyme. Ngoài ra, hoạt tính của LsAE cũng có khả năng bền ở pH 5,0, cho thấy tính thích nghi của enzyme này trong môi trường axit nhẹ. Đặc tính này rất quan trọng đối với các ứng dụng trong công nghiệp và sinh học, đặc biệt là trong các quy trình cần hoạt động ở pH thấp như: Công nghiệp thực phẩm, enzyme có thể được sử dụng trong quá trình xử lý thực phẩm lên men, sản xuất đồ uống lên men (như bia, rượu), hoặc trong quá trình tinh sạch các sản phẩm có tính axit tự nhiên, ví dụ nước ép trái cây. Hay

trong sản xuất bioethanol, quá trình thủy phân nguyên liệu sinh khối, pH môi trường thường giảm do sự hình thành các axit hữu cơ. Một enzyme ổn định ở pH 5,0 như acetyl esterase từ *L. squarrosulus* MPN12 sẽ phát huy hiệu quả trong các bước tiền xử lý hoặc chuyển hóa lignocellulose. Trong công nghiệp dệt nhuộm, enzyme này có thể được dùng để xử lý các chất nền có chứa acetyl trong môi trường axit, cải thiện chất lượng sợi và làm sạch màu. Hoặc xử lý chất thải hữu cơ, với khả năng hoạt động ở pH thấp, enzyme phù hợp để phân hủy các hợp chất hữu cơ trong các hệ thống xử lý nước thải hoặc compost, nơi pH môi trường thường dao động từ 4,0-6,0 [84, 92]. Khả năng bền hoạt tính của enzyme trong môi trường axit cũng gợi ý rằng cấu trúc protein của nó có khả năng chống lại sự biến tính trong điều kiện pH thấp, làm tăng tiềm năng ứng dụng trong các môi trường công nghiệp khắc nghiệt. Ngược lại, các esterase có nguồn gốc từ vi khuẩn, chẳng hạn như *Bacillus licheniformis*, thường thể hiện hoạt tính tối ưu trong môi trường kiềm (pH 8,0) [172]. Nhờ đặc tính này, chúng được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực công nghiệp yêu cầu điều kiện pH cao. Trong ngành công nghiệp chất tẩy rửa, esterase kiềm được sử dụng để xúc tác quá trình thủy phân các liên kết este và lipid, góp phần nâng cao hiệu quả làm sạch, đặc biệt đối với các vết bẩn có nguồn gốc dầu mỡ. Ngoài ra, enzyme này còn đóng vai trò quan trọng trong công nghệ xử lý da và dệt nhuộm, nơi môi trường kiềm được duy trì để thúc đẩy các phản ứng hóa học đặc thù.

Nhiệt độ tối ưu của LsAE và AE có nguồn gốc từ *A. niger* đều là 35°C [171]. Nhiệt độ này gần với nhiệt độ cơ thể (37°C) của sinh vật bậc cao, cho thấy các enzyme này có thể bắt nguồn từ sinh vật mesophilic (ưa nhiệt độ trung bình). Bên cạnh đó, nhiệt độ 35°C tương đối dễ kiểm soát trong các quy trình sinh học, không đòi hỏi các hệ thống gia nhiệt hoặc làm lạnh quá phức tạp, giúp tối ưu hóa hiệu quả ứng dụng trong thực tế. AE từ một số loài nấm khác như *Aspergillus Versicolor* hoặc *Candida guilliermondii* lại hoạt động tốt ở nhiệt độ 45-50 °C [173, 174]. Khả năng hoạt động trong các dải nhiệt độ khác nhau còn mở ra tiềm năng ứng dụng đa dạng cho enzyme AE, từ các quy trình sinh học ở nhiệt độ thấp để bảo vệ các thành phần nhạy cảm với nhiệt, đến các ứng dụng nhiệt độ cao để tăng tốc độ phản ứng và giảm nguy cơ nhiễm khuẩn.

4.2.2. Enzyme cellobiose dehydrogenase từ *C. aureogranulatus* MPG 14 (*CauCDH*)

Enzyme *CauCDH* hoạt động tốt nhất ở pH 5,5, tuy nhiên lại cho thấy khả năng bền hoạt tính đáng kể trong môi trường axit (pH 4,0). Sau 12 giờ ủ ở pH 4,0, hoạt tính enzyme hầu như không giảm so với ban đầu. Ursula Baminger và cộng sự cũng đã chỉ ra rằng CDH từ chủng *Sclerotium rolfsii* cũng có độ bền hoạt tính ở pH 4,0, tuy nhiên Justyna Sulej lại chứng minh rằng CDH từ chủng *Cerrena unicolor* lại có độ bền ở pH trung tính (6.0) [124]. Điều này cho thấy rằng hoạt tính và độ bền của enzyme CDH cũng có thể thay đổi tùy thuộc vào nguồn gốc chủng vi sinh vật. Một số nghiên cứu khác cũng đã chỉ ra rằng các điều kiện môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, và sự hiện diện của các ion kim loại cũng có thể ảnh hưởng đến hoạt tính và độ bền của CDH. Điều này mở ra tiềm năng cho việc sử dụng CDH trong các ứng dụng công nghiệp khác nhau, đặc biệt là trong các quy trình cần môi trường axit hoặc trung tính, như xử lý sinh học chất thải hoặc tổng hợp các hợp chất hữu cơ.

Nhiệt độ tối ưu của *CauCDH* là 50°C, cao hơn so với *LsAE* và *LsLiP*. Sự khác biệt này có thể liên quan đến cấu trúc và chức năng đặc thù của enzyme. Các enzyme chịu nhiệt có cấu trúc bền vững hơn nhờ vào các liên kết hóa học mạnh mẽ, chẳng hạn như liên kết hydro, liên kết ion, và các tương tác kỵ nước giữa các amino acid. Những liên kết này giúp giữ cho protein không bị biến tính hoặc mất cấu trúc ở nhiệt độ cao. Cấu trúc thứ cấp ổn định, một số enzyme có tỷ lệ các cấu trúc thứ cấp như alpha-helix và beta-sheet cao hơn, giúp duy trì hình dạng của enzyme khi nhiệt độ tăng. Ở nhiệt độ cao, các phân tử enzyme cần có tính linh hoạt để dễ dàng thay đổi hình dạng, cho phép enzyme dễ dàng gắn kết với cơ chất và thực hiện các phản ứng hóa học một cách hiệu quả. Các enzyme hoạt động tốt ở nhiệt độ cao thường ít bị biến tính nhiệt khi tiếp xúc với nhiệt độ cao. Nhờ những đặc điểm trên, các enzyme này có thể giữ được hoạt tính và thực hiện các phản ứng sinh học hiệu quả trong môi trường có nhiệt độ cao. Điều này giúp chúng thích nghi tốt với các quy trình công nghiệp yêu cầu nhiệt độ cao, chẳng hạn như trong sản xuất giấy, dệt nhuộm, hay xử lý chất thải. Tương tự, CDH từ một số loài khác như *Cerrena unicolor* hoặc *Schizophyllum commune*, đều có hoạt động tối ưu ở

hiệt độ 50°C [153, 175]. Khả năng hoạt động ở nhiệt độ cao của CDH còn mở ra tiềm năng sử dụng chúng trong các quy trình sinh học nhằm tăng tốc độ phản ứng và hiệu suất sản xuất.

CDH là một trong những enzyme có khả năng chuyển hóa carbohydrate và phân hủy lignin. CDH thuộc nhóm hemoflavoenzyme và chủ yếu được tìm thấy ở các loài nấm. Trong nghiên cứu này, enzyme CDH từ chủng nấm *C. aureogranulatus* đã được xác định có khả năng oxy hóa 6 loại đường khác nhau, bao gồm cellobiose, cellotriose, cellotetraose, lactose, glucose và maltose. Trong số các carbohydrate đã được thử nghiệm, các di- và oligosaccharide có liên kết β -(1,4) glycosidic là cơ chất mà *Cau*CDH thể hiện tính đặc hiệu cao nhất, trong khi các monosaccharide với liên kết α -(1,4) lại có ái lực và hiệu suất xúc tác thấp. Do đó, enzyme CDH có xu hướng ưu tiên xúc tác các saccharide có liên kết β -(1,4) hòa tan hơn là các monosaccharide, điều này dường như là đặc tính vốn có của các enzyme oxy hóa từ nguồn nấm. Gần đây, các nhà khoa học đã chứng minh rằng, ngoài khả năng chuyển hóa carbohydrate, CDH còn có khả năng khử tại vị trí C1 của nhiều cơ chất khác nhau trong cấu trúc lignocellulose (LLC). Điều này cho phép nó tham gia vào quá trình phân hủy lignocellulose, làm tăng hiệu quả của việc tiêu hóa các polymer phức tạp thành những đơn vị đường có thể sử dụng.

Daniel Kracher và cộng sự đã chỉ ra rằng enzyme CDH có hiệu quả xúc tác cao đối với β -D-cellobiose, một tiểu đơn vị dimeric của cellulose, cũng như lactose, một epimer của cellobiose [68]. Khả năng xúc tác của CDH đối với các hợp chất carbohydrate mở ra cơ hội cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm tối ưu hóa quá trình phân giải sinh học cũng như phát triển các phương pháp sản xuất nhiên liệu sinh học từ nguồn tài nguyên tái tạo. Các nghiên cứu về CDH đã gợi mở tiềm năng trong việc ứng dụng enzyme này để cải thiện hiệu suất trong các quy trình công nghiệp liên quan đến việc xử lý sinh khối.

4.2.3. Enzyme laccase từ *Pleurotus pulmonarius* MPN 18 (*PleuLac*)

Laccase từ chủng *P. pulmonarius* MPN 18 có nhiệt độ tối ưu là 40°C và mất 50% hoạt tính sau 1 giờ ở 70°C. Điều này cho thấy enzyme có độ ổn định nhiệt tương đối tốt trong khoảng nhiệt độ thấp hơn 70°C. Khả năng chịu nhiệt của laccase có thể phù hợp cho các ứng dụng trong công nghiệp với quy trình cần hoạt động enzyme ở nhiệt độ trung bình đến cao. Yue Sun và cộng sự lại

chỉ ra rằng laccase từ chủng nấm *Gymnopus luxurians* có hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 60°C và bền ở 40°C trong 4 giờ, cho thấy sự khác biệt về đặc tính nhiệt của laccase giữa các loài nấm khác nhau [155]. Tuy nhiên, laccase từ loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* thường có nhiệt độ tối ưu thấp hơn, khoảng 30–40°C, và mất hoạt tính nhanh hơn khi tiếp xúc với nhiệt độ cao, cho thấy khả năng chịu nhiệt kém hơn so với laccase từ nấm như *P. pulmonarius* hay *G. luxurians* [176]. Những khác biệt này có thể xuất phát từ sự đa dạng trong cấu trúc protein hoặc điều kiện môi trường sống của từng loài.

PleuLac cho thấy khả năng duy trì hoạt tính tốt ở pH axit yếu (5,0). Một số laccase từ các loài nấm khác, như *Ganoderma leucocontextum* hoặc *Pleurotus* sp., lại hoạt động tối ưu ở pH thấp hơn (3,0–4,0) [143, 154]. Ngược lại, laccase từ loài *Trichoderma harzianum* được Alshaimaa và cộng sự chứng minh có khả năng duy trì hoạt tính bền ở pH kiềm (9,0) [177]. Sự khác biệt về dải pH tối ưu và độ bền của các laccase phản ánh tính đa dạng trong cấu trúc và chức năng của enzyme từ các loài nấm khác nhau. Những đặc tính này có thể được khai thác để ứng dụng laccase trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Cụ thể, các laccase hoạt động tốt ở pH axit (3,0–5,0) thường phù hợp cho các quy trình sinh học như xử lý phenol, hợp chất thơm, hoặc tẩy màu phẩm nhuộm. Laccase hoạt động tốt ở môi trường trung tính (6,0–7,0), thường được ứng dụng trong ngành công nghiệp rượu vang và nước trái cây, laccase loại bỏ các polyphenol dư thừa, giảm thiểu hiện tượng kết tủa và làm đục sản phẩm, hoặc sản xuất sinh dược phẩm. Trong khi đó, các laccase bền ở pH kiềm (8,0–10,0) có tiềm năng ứng dụng trong các ngành công nghiệp như xử lý nước thải, khử mùi, và sản xuất bột giấy. Nhờ đặc tính của laccase từ các nguồn khác nhau, người ta có thể kết hợp các enzyme này trong quy trình xử lý có nhiều bước, ví dụ bước đầu laccase hoạt động ở pH axit để loại bỏ phenol [178, 179]. Bước sau, laccase hoạt động ở pH kiềm để oxy hóa các amin thơm hoặc hợp chất phức tạp hơn. Việc tận dụng đặc tính hoạt động của laccase ở dải pH khác nhau không chỉ giúp mở rộng ứng dụng mà còn tăng hiệu quả xử lý trong các quy trình công nghiệp và môi trường.

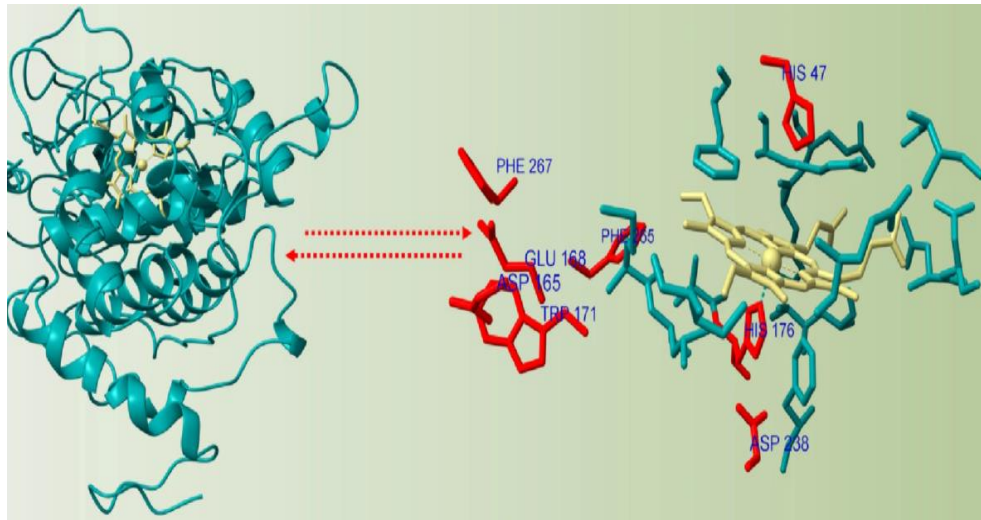
4.2.4. Enzyme lignin peroxidase từ *L. squarrosulus* MPN 12 (*LsLiP*)

Hoạt tính của *LsLiP* sẽ đạt giá trị cao nhất ở pH 5,0 và 35°C. Khác với *LsLiP*, LiP từ các loài nấm *Pleurotus sajor caju* được chỉ ra có hoạt động tối

ưu ở pH axit (3,0) [180]. Nhiệt độ tối ưu của *LsLiP* cũng khác với một số nghiên cứu trước đó, như LiP từ chủng nấm *Penicillium decumbens* hoạt động tốt ở nhiệt độ 45°C [181]. Tương tự như enzyme laccase, lignin peroxidase cũng là một enzyme được đánh giá cao trong nhiều ngành công nghiệp nhờ khả năng oxy hóa đa dạng các loại chất nền. Trong nghiên cứu này, *LsLiP* đã chứng minh khả năng oxy hóa nhiều cơ chất vòng thơm, bao gồm DCP, veratryl alcohol và các hợp chất phenolic khác như guaiacol, axit ferulic, axit vanillic và dimethoxyphenol. Đáng chú ý, kết quả cho thấy enzyme này có tính đặc hiệu cao đối với DCP hơn so với các hợp chất phenolic được khảo sát. Trong khi đó, nghiên cứu trước đó của Vandana và cộng sự lại cho thấy rằng LiP từ chủng *P. chrysosporium* lại đặc hiệu tốt nhất với cơ chất veratryl alcohol [113]. Điều này cho thấy rằng đặc tính đặc hiệu của LiP có thể thay đổi tùy theo chủng vi sinh vật và điều kiện phản ứng. Ngoài ra, để xác định tiềm năng của *LsLiP*, nghiên cứu này đã sử dụng *LsLiP* để phân hủy lignin được tách từ rơm. Kết quả phân tích FTIR cho thấy cấu trúc lignin trước và sau khi xử lý *LsLiP* đã thay đổi đáng kể, đặc biệt là ở vùng ($1600-1000\text{ cm}^{-1}$). Hơn nữa, cường độ của đỉnh ở 2930 cm^{-1} thay đổi nhẹ sau khi xử lý *LsLiP*, được dự đoán là nguyên nhân chính gây ra sự phân cắt lignin. Điều này gợi mở tiềm năng ứng dụng của *LsLiP* trong các quá trình công nghiệp như phân hủy lignin, xử lý chất thải hoặc tổng hợp các sản phẩm hữu ích từ các hợp chất phenolic. Việc hiểu rõ các yếu tố ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của LiP sẽ giúp cải thiện hiệu suất và khả năng áp dụng enzyme này trong các ứng dụng thực tiễn [60, 180].

Để giải thích đặc tính oxy hóa cao của enzyme lignin peroxidase, các nhà khoa học đã chỉ ra rằng cấu trúc không gian của LiP có ảnh hưởng quan trọng [182]. Enzyme LiP có một cấu trúc ba chiều phức tạp với các yếu tố cấu trúc quyết định khả năng tương tác với các cơ chất và thực hiện quá trình oxy hóa. Các yếu tố cấu trúc không gian chính của LiP bao gồm, thứ nhất do cấu trúc vùng hoạt động (active site), vùng hoạt động của LiP là nơi enzyme thực hiện phản ứng oxy hóa các cơ chất phenolic hoặc lignin. Các nhóm amino axit quan trọng trong vùng hoạt động, như histidine và tryptophan, tham gia vào quá trình oxy hóa, liên kết với các nguyên tử oxi để chuyển electron từ cơ chất sang phân tử oxy, tạo ra các gốc tự do và peroxit. Tác giả Singh và cộng

sự (2024) đã chỉ ra vai trò quan trọng của histidine 176, histidine 47, và tryptophan 171 trong vùng trung tâm hoạt động của LiP từ loài *P. chrysosporium* (PDB: 1LGA), các amino axit này có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng enzyme nhận và oxy hóa các cơ chất khác nhau (Hình 4.1) [55].



Hình 4.1. Cấu trúc tinh thể của LiP từ *P. chrysosporium* (PDB: 1LGA).

Thứ hai, cấu trúc bậc ba và các cầu nối disulfide: LiP có một cấu trúc bậc ba phức tạp, với các cầu nối disulfide (cầu nối giữa các cysteine) đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì cấu trúc không gian ổn định và đảm bảo enzyme có khả năng hoạt động ở điều kiện khắc nghiệt. Những cầu nối này cũng có thể ảnh hưởng đến khả năng enzyme thay đổi hình dạng trong quá trình phản ứng, từ đó ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình oxy hóa. Thứ ba, vùng liên kết với heme: LiP chứa nhóm heme, một yếu tố quan trọng trong khả năng oxy hóa của enzyme. Nhóm heme có thể tạo ra các gốc peroxit và gốc hydroxyl trong phản ứng oxy hóa, giúp enzyme thực hiện quá trình phá vỡ cấu trúc lignin. Cấu trúc không gian của vùng liên kết heme có thể thay đổi tùy thuộc vào điều kiện môi trường và ảnh hưởng đến khả năng tương tác của enzyme với cơ chất. Cuối cùng, các vùng không hoạt động và cấu trúc phụ, ngoài vùng hoạt động, các phần còn lại của enzyme, như các vùng không hoạt động và các vùng phụ, cũng có thể ảnh hưởng đến tính ổn định và khả năng đặc hiệu của enzyme đối với các cơ chất khác nhau [54]. Cấu trúc phụ có thể ảnh hưởng đến sự tương tác giữa enzyme và môi trường xung quanh, chẳng hạn như pH, nhiệt độ, và sự có mặt của các ion kim loại hoặc chất đồng vận. Như vậy, cấu trúc không gian của LiP không chỉ quyết định hoạt tính oxy hóa mà còn ảnh hưởng đến tính đặc hiệu đối với các cơ chất khác nhau.

4.2.5. Enzyme unspecific peroxygenase từ *Candolleomyces euryspous* CP22 (*CeuUPO*)

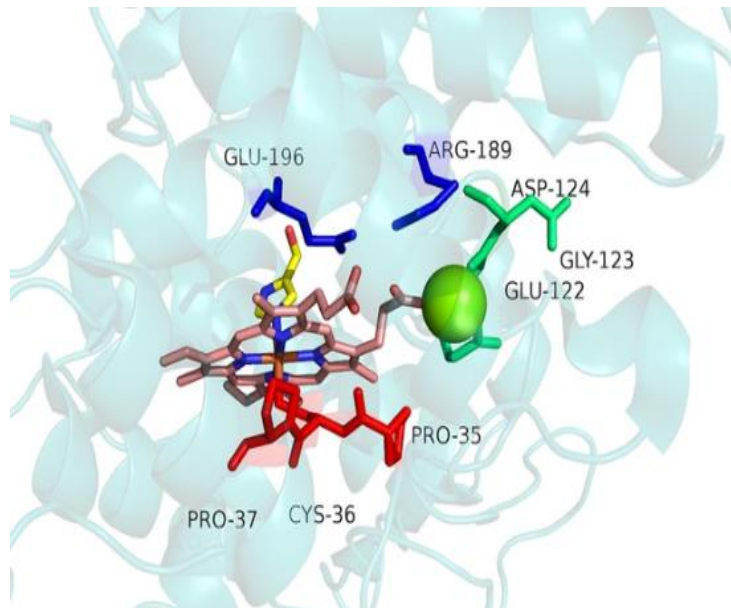
CeuUPO trong nghiên cứu này được chỉ ra có khả năng oxy hóa các hợp chất vòng thơm như ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)], veratryl alcohol (VA) và 2,6-dimethoxyphenol (DMP). Enzyme này có thể thực hiện các phản ứng hydroxyl hóa trên alkanes, epoxidation trên alkenes, và oxy hóa các hợp chất có cấu trúc dị vòng chứa nitơ hoặc lưu huỳnh. Điều này mở ra tiềm năng ứng dụng rộng rãi của UPO trong nhiều ngành công nghiệp, từ xử lý môi trường đến sản xuất hóa chất dược phẩm. Đặc biệt, UPO có thể hoạt động mà không cần đồng xúc tác kim loại, làm giảm chi phí và độ phức tạp trong quá trình phản ứng, đồng thời hạn chế tạo ra các sản phẩm phụ không mong muốn. Bên cạnh *C. euryspous*, unspecific peroxygenase (UPO) còn được tìm thấy ở nhiều loài vi sinh vật khác, trong đó phổ biến nhất là các loài thuộc chi *Agrocybe*, *Marasmius*, *Chaetomium*, và *Coprinopsis* [66, 183, 184]. Tuy cùng thuộc nhóm UPO nhưng đặc tính xúc tác và mức độ đa dạng cơ chất của enzyme từ các loài này có thể rất khác nhau. Chẳng hạn, UPO từ *Agrocybe aegerita* (*AaeUPO*) được biết đến rộng rãi với khả năng xúc tác các phản ứng tương tự như enzyme cytochrome P450, bao gồm hydroxyl hóa, epoxid hóa và thậm chí là phản ứng N- hoặc S-oxidation với hiệu suất cao. Tuy nhiên, *AaeUPO* thường có hoạt tính kém hơn đối với các cơ chất công kênh hoặc có nhóm thế gây cản trở không gian gần vị trí phản ứng. So với *AaeUPO*, enzyme từ *C. euryspous* trong nghiên cứu này cho thấy phổ cơ chất tương đối rộng, có khả năng oxy hóa cả hợp chất phenolic như ABTS và DMP, lẫn những phân tử dị vòng chứa dị tố, điều này gợi ý một vùng hoạt động linh hoạt và khả năng tương thích cao với các cơ chất có cấu trúc phức tạp. Ngoài ra, một số UPO từ vi sinh vật khác như *Coprinopsis cinerea* hay *Chaetomium globosum* cũng cho thấy khả năng hoạt động mạnh trong môi trường chứa hydrogen peroxide, nhưng thường nhạy cảm với nồng độ H_2O_2 cao và dễ bị bất hoạt oxy hóa [184, 185]. Tóm lại, tuy cùng một nhóm enzyme, nhưng đặc tính xúc tác, ổn định hóa học, độ chọn lọc và phổ cơ chất của unspecific peroxygenase phụ thuộc mạnh mẽ vào nguồn gốc vi sinh vật. Việc khai thác và so sánh các UPO từ nhiều loài khác nhau sẽ

là cơ sở quan trọng để chọn lọc enzyme phù hợp cho từng mục tiêu ứng dụng trong sinh tổng hợp, xử lý môi trường hay công nghiệp dược phẩm.

Gần đây, vào năm 2019, Muniba Faiza và các cộng sự đã chỉ ra rằng enzyme UPO là đại diện cho một phân lớp tiềm năng của oxidoreductase, thuộc nhóm các protein heme có hoạt tính peroxygenase và peroxidase [61]. Enzyme này có khả năng oxy hóa hơn 300 chất nên đã được xác định, xúc tác cho nhiều phản ứng oxy hóa khác nhau, bao gồm oxy hóa một hoặc hai electron, cũng như các phản ứng oxy hóa có tính chọn lọc cao. Những đặc điểm này khiến UPO trở nên đặc biệt quan trọng trong tổng hợp hữu cơ và có tiềm năng trở thành chất xúc tác sinh học cho các ứng dụng công nghiệp. Điều này đã khơi dậy sự quan tâm của các nhà khoa học trong việc tìm kiếm thêm các enzyme UPO từ hệ sinh thái nấm. Ngoài việc tìm kiếm thêm các enzyme UPO từ hệ sinh thái nấm, các nhà nghiên cứu cũng đang tập trung vào việc hiểu rõ hơn về cấu trúc và cơ chế hoạt động của enzyme này.

Những nghiên cứu sâu hơn về UPO có thể mở ra những hướng đi mới trong việc cải tiến và tối ưu hóa các phản ứng oxy hóa. Hình 4.2 cho thấy vùng trung tâm hoạt động của enzyme UPO từ chủng *A. aegerita* bao gồm 8 axit amin: Glu-196, Ar/g89, Asp-124, Gly-123, Glu-122, Pro-35, Cys-36 và Pro-37 [66]. Nghiên cứu chỉ ra rằng Cys-36 nằm gần nhóm heme nhất và được bảo tồn trong hầu hết các UPO từ nhiều nguồn khác nhau. Glu-196 và Ar/g89 đóng vai trò ổn định điện tích trong vùng hoạt động trung tâm, hoạt động như một cặp xúc tác axit-bazơ. Cặp xúc tác này rất quan trọng cho việc hình thành Hợp chất-I, một yếu tố thiết yếu trong tất cả các peroxidase. Mô típ EGD (Glu122-Gly123-Asp124) tham gia gián tiếp vào quá trình phân cắt liên kết peroxide, giúp định hướng Glu-196 vào trung tâm heme. Ngoài ra, Pro-35, Pro-37 và Gly-123 có vai trò quan trọng trong việc duy trì cấu trúc không gian của vùng trung tâm hoạt động, tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác giữa các axit amin khác với nhóm heme. Các nghiên cứu so sánh cho thấy rằng những vị trí axit amin này không chỉ có vai trò trong việc ổn định cấu trúc mà còn ảnh hưởng đến tính chọn lọc và hoạt tính xúc tác của enzyme. Điều này chứng tỏ rằng vùng trung tâm hoạt động của UPO được tối ưu hóa cao để thực hiện các phản ứng oxy hóa liên quan đến peroxide, đồng

thời cho thấy sự thích nghi đáng kể của enzyme với các điều kiện môi trường và chất nền khác nhau.



Hình 4.2. Cấu trúc enzyme UPO (PDB ID: 2YOR từ loài nấm *Agrocybe aegerita* (<https://www.rcsb.org>)).

Tóm lại, các enzyme tự nhiên đã được đề cập ở trên đều có đặc tính và cấu trúc riêng biệt, nhưng đều đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa cấu trúc của lignocellulose. Dựa trên các đặc tính đã được xác định, chúng có thể được ứng dụng vào thực tiễn và các quy trình công nghiệp liên quan nhằm nâng cao hiệu quả. Sự hiểu biết sâu sắc về cơ chế hoạt động của enzyme cũng góp phần vào việc thiết kế các giải pháp sinh học hiệu quả hơn trong tương lai.

4.3. Xúc tác hiệp đồng bởi hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”) trong chuyển hóa hiệu quả vật liệu lignocellulose

Xúc tác hiệp đồng bởi hỗn hợp enzyme (“enzyme cocktail”) trong chuyển hóa vật liệu lignocellulose là một phương pháp quan trọng trong việc sản xuất nhiên liệu sinh học và các sản phẩm hóa học từ nguyên liệu tái tạo. Hỗn hợp enzyme này thường bao gồm các enzyme như cellulase, hemicellulase, và ligninase, mỗi loại đóng vai trò riêng trong việc phân giải các thành phần cấu trúc chính của lignocellulose (cellulose, hemicellulose, và lignin). Sự kết hợp chính xác và tối ưu của các enzyme giúp cải thiện hiệu quả phân giải sinh học, tăng cường khả năng thu nhận đường đơn từ lignocellulose, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho các quá trình lên men tiếp

theo. Trong nghiên cứu này, việc áp dụng mô hình tối ưu thực nghiệm đã xác định được các điều kiện tốt nhất cho hỗn hợp “enzyme cocktail” (CDH, AE, và Cell/Xyl) trong quá trình chuyển hóa cơ chất từ rom, nhằm nâng cao hiệu quả tạo thành các đường đơn C-5 và C-6 (glucose, xylose). Kết quả một lần nữa khẳng định rằng “enzyme cocktail” giúp quá trình thủy phân polysaccharide thành các mono và dimer diễn ra dễ dàng hơn.

Gần đây, tác giả Mello Lopes và cộng sự đã giới thiệu thêm các loại enzyme cocktail nhằm phân hủy lignocellulose [30]. Thách thức lớn nhất trong quá trình này là thành tế bào thực vật đã tiến hóa để chống lại sự phân hủy bởi enzyme. Do đó, các enzyme dùng để chuyển hóa thành tế bào cần có hiệu suất xúc tác cao và khả năng ổn định nhiệt tốt. Việc lựa chọn các enzyme phù hợp để xúc tác quá trình phân hủy cellulose thành glucose và hemicellulose thành các loại đường tự do được coi là chiến lược khả thi nhất, giúp cung cấp nguồn cơ chất hiệu quả về mặt chi phí cho sản xuất nguyên liệu sinh học. Raulo và cộng sự (2021) cũng đã chứng minh tác dụng của “enzyme cocktail” trong quá trình thủy phân lignocellulose, những enzyme chính tham gia vào quá trình phá vỡ cấu trúc của lignocellulose phải kể đến như endoglucanases, cellobiohydrolases, β -glucosidase,...[41]. Nghiên cứu của Heidi và cộng sự (2020) đã kết hợp các enzyme cellobiose dehydrogenase (CDH), lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO), β -glucosidase (BG), và endoglucanase (EG) ở nhiệt độ 45°C, pH 5,0, sau 72 giờ ủ. Kết quả HPLC cho thấy lượng đường C5 và C6 được tạo ra trong quá trình thủy phân [186]. Tại trường Đại học Monash ở Úc, Eugene và cộng sự (2021) đã tiến hành kết hợp các enzyme cellulase, hemicellulose, và laccase ở điều kiện ủ tối ưu ở 40°C, pH 6,0, trong 24 giờ tạo ra lượng đường đạt 2,431 mg/mL lớn hơn so với việc sử dụng đơn enzyme (1,67-1,77 mg/mL). Kết quả chỉ ra sự kết hợp hiệu quả khi sử dụng “enzyme cocktail” trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose [187]. Dựa trên những phân tích về kết quả nghiên cứu của nhiều nhóm tác giả đã công bố cho thấy, hiện nay việc sử dụng “enzyme cocktail” trong chuyển hóa sinh khối lignocellulose là hướng đi mới rất được quan tâm và nhiều triển vọng, đặc biệt ứng dụng trong ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học.

Ngày nay, các công ty lớn bán nhiều loại enzyme cocktail cho nhiều mục đích khác nhau. Novozymes đã ra mắt dòng cocktail Spirizyme® với ba phiên bản, nhằm mục tiêu chuyên hóa toàn bộ lượng đường trong ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học. Cocktail này được bổ sung enzyme trehalase, giúp chuyển đổi trehalose thành các loại đường có thể lên men, từ đó làm tăng đáng kể sản lượng đường thu được từ quá trình thủy phân. Một công ty khác trong lĩnh vực nhiên liệu sinh học, DuPont, đã giới thiệu Acellerase®, bao gồm hỗn hợp cellulase và các enzyme phụ trợ, với nhiều phiên bản khác nhau để phù hợp với các phương pháp xử lý trước và loại sinh khối khác nhau.

Bên cạnh việc lựa chọn enzyme phù hợp, các nghiên cứu gần đây cũng tập trung vào việc cải tiến kỹ thuật để tăng cường khả năng tương tác giữa enzyme và cơ chất. Điều này bao gồm việc kết hợp các enzyme có hoạt tính bổ trợ, tối ưu hóa điều kiện phản ứng. Ngoài ra, việc hiểu rõ cơ chế phân hủy và vai trò của từng loại enzyme trong quá trình này sẽ giúp cải thiện quy trình sản xuất sinh học, từ đó giảm chi phí và nâng cao tính bền vững của công nghệ sản xuất nhiên liệu sinh học và các sản phẩm hóa sinh. Xu hướng nghiên cứu hiện nay còn tập trung vào việc cải tiến và phát triển các enzyme tái tổ hợp với khả năng hoạt động ổn định trong điều kiện khắc nghiệt của quy trình công nghiệp, như nhiệt độ cao, pH thay đổi hoặc có sự hiện diện của các chất ức chế. Nhờ vào công nghệ sinh học hiện đại, các enzyme tái tổ hợp này có thể được thiết kế để có độ bền và hiệu suất cao hơn, mở ra nhiều tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nhiên liệu sinh học, vật liệu sinh học, và các hợp chất hữu cơ tái tạo.

Hiện nay, việc khám phá và tối ưu hóa nguồn enzyme từ các loài nấm khác nhau cũng đang được triển khai mạnh mẽ, với mục tiêu tìm kiếm các chủng nấm mới có khả năng sản xuất enzyme với hoạt tính cao hơn và chi phí sản xuất thấp hơn. Từ đó, không chỉ nâng cao hiệu quả phân hủy sinh khối mà còn giảm thiểu tác động đến môi trường, hướng đến một nền công nghiệp sinh học bền vững và thân thiện hơn với môi trường. Thành phần secretome của bất kỳ loại nấm nào cũng thay đổi tùy theo đặc điểm sinh học của vi sinh vật và liên tục biến đổi để thích ứng với các điều kiện môi trường [188]. Hơn nữa, cùng một loại nấm khi được nuôi cấy trên các sinh khối lignocellulosic khác nhau sẽ tạo ra các cấu hình protein khác biệt. Đây là một yếu tố quan

trọng trong việc thiết kế hỗn hợp enzyme phù hợp với một cơ chất cụ thể. Để đạt được điều này, có thể điều chỉnh các yếu tố môi trường nhằm tạo ra sự thay đổi trong secretome. Đơn enzyme có hoạt động thủy phân rất hạn chế, trong khi hỗn hợp enzyme có thể biểu hiện tác dụng hiệp đồng [189]. Hỗn hợp enzyme là lựa chọn tối ưu để thủy phân thành tế bào thực vật nhờ tác động phối hợp của các enzyme với tính đặc hiệu khác nhau, cho phép một enzyme tác động lên sản phẩm của enzyme khác. Ngoài ra, trong hỗn hợp enzyme, có thể thay thế một enzyme đơn lẻ để phù hợp với yêu cầu của từng loại cơ chất. Do các tương tác phức tạp có thể xảy ra giữa enzyme và cơ chất, cùng với việc các chất ức chế enzyme có thể được tạo ra trong quá trình thủy phân, việc nghiên cứu cơ chế hoạt động của enzyme là rất cần thiết. Hơn nữa, việc tối ưu hóa các hỗn hợp được thiết kế là điều cần thiết để tăng cường chuyển đổi lignocellulose, vì mỗi chất nền đều có các đặc điểm riêng và đòi hỏi các điều kiện riêng biệt để chuyển hóa hoàn toàn.

Để xây dựng một hỗn hợp enzyme hiệu quả, điều quan trọng là phải xác định điều kiện nuôi cấy nấm trên nhiều loại sinh khối khác nhau và xác minh các enzyme mà chúng tổng hợp, cùng với trình tự enzyme cần thiết [190]. Nghiên cứu về secretome của *Aspergillus niger* và *Trichoderma reesei* khi nuôi cấy trên bã mía cho thấy các loài nấm này sử dụng các loại enzyme khác nhau để phân hủy cùng một loại sinh khối [191]. Hơn nữa, có sự khác biệt đáng kể trong secretome của *T. reesei* và *A. niger* khi sử dụng hai phương pháp nuôi cấy khác nhau: lên men kết hợp môi trường rắn và lỏng, và lên men chỉ trong môi trường lỏng. Quá trình lên men kết hợp rắn-lỏng cho thấy lượng enzyme cellulolytic và hemicellulolytic thu được cao hơn so với quá trình lên men lỏng.

Những kết quả này cho thấy rằng phương pháp nuôi cấy và loại môi trường nuôi cấy có tác động mạnh mẽ đến khả năng sản xuất enzyme của nấm, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất phân hủy sinh khối. Do đó, việc lựa chọn chiến lược nuôi cấy phù hợp là yếu tố quan trọng để tối ưu hóa quá trình phân giải sinh khối nhằm sản xuất bioethanol và các sản phẩm có giá trị khác từ nguyên liệu sinh học. Ngoài ra, sự hiểu biết sâu sắc hơn về các yếu tố điều hòa quá trình biểu hiện enzyme ở các loài nấm như *A. niger* và *T. reesei* sẽ mở ra tiềm năng phát triển các hệ thống enzyme tùy chỉnh, từ đó gia tăng

hiệu quả sản xuất các sản phẩm sinh học tái tạo. Để tối ưu hóa hỗn hợp enzyme trong quá trình thủy phân lignocellulose, cần xem xét một loạt các yếu tố, bao gồm nồng độ enzyme, tỉ lệ giữa các loại enzyme và điều kiện môi trường như pH, nhiệt độ và thời gian ủ. Bằng cách điều chỉnh các yếu tố này, hiệu suất thủy phân có thể được cải thiện đáng kể. Bên cạnh đó, việc bổ sung các phụ gia hóa học hoặc sinh học, chẳng hạn như chất hoạt hóa hoặc chất ổn định enzyme, cũng có thể giúp tăng cường hoạt động của enzyme, giảm sự ức chế và tối đa hóa hiệu quả phân giải lignocellulose.

Trong thực tiễn, việc sử dụng các hệ thống enzyme đa chức năng, bao gồm cả enzyme endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidase, đã được chứng minh là hiệu quả trong việc phân hủy cellulose thành glucose, thành phần đường đơn có thể lên men để sản xuất bioethanol. Tương tự, hệ thống enzyme phân giải hemicellulose cũng cần phải được tối ưu hóa với sự kết hợp của các loại enzyme như xylanase, mannanase và α -L-arabinofuranosidase để phá vỡ cấu trúc phức tạp của polysaccharide này. Tuy nhiên, một thách thức lớn là các sản phẩm phụ của quá trình thủy phân, như axit acetic, furfural và hydroxymethylfurfural, có thể ức chế hoạt động của enzyme và vi sinh vật lên men [192]. Do đó, việc phát triển các chiến lược giảm thiểu hoặc loại bỏ các chất ức chế này, chẳng hạn như tiền xử lý sinh học hoặc hóa học trước khi thủy phân, cũng là một bước quan trọng trong quá trình nghiên cứu và ứng dụng thực tiễn.

Cuối cùng, mặc dù quá trình chuyển hóa Lignocellulose bằng xúc tác enzyme hiện tại đã đạt được những tiến bộ đáng kể, việc tiếp tục nghiên cứu các loại enzyme mới, các phương pháp tối ưu hóa điều kiện phản ứng, cũng như các chiến lược tiền xử lý và tái sử dụng enzyme vẫn là cần thiết để nâng cao hiệu quả và giảm chi phí sản xuất trong tương lai.

Nhu cầu ngày càng tăng đối với một thế giới bền vững đã dẫn đến sự phát triển và cải thiện nhiều kỹ thuật khác nhau nhằm sử dụng chất thải nông nghiệp. Các loại enzyme cocktail có tiềm năng phân hủy vật liệu lignocellulose, vì chúng bao gồm một nhóm các enzyme với các đặc tính khác nhau và có khả năng phối hợp để phá vỡ các vật liệu này. Các chế phẩm enzyme cocktail có nhiều lợi thế: chúng thân thiện với môi trường hơn so với các hóa chất được sử dụng để phân hủy lignocellulose, có thể cải thiện tốc độ

thủy phân so với các enzyme đơn lẻ, và có thể điều chỉnh loại enzyme cũng như tải lượng để thủy phân hoàn toàn từng cơ chất. Xu hướng cho thấy mức tiêu thụ năng lượng sinh học sẽ tiếp tục tăng dưới ảnh hưởng của các chính sách năng lượng tái tạo và biến đổi khí hậu hiện tại. Bioethanol từ sinh khối lignocellulose là một trong những lĩnh vực năng lượng sinh học và năng lượng tái tạo phát triển mạnh mẽ nhất, với tiềm năng tăng trưởng cao trong tương lai gần. Các phương pháp tiếp cận mới cần được khai thác, chẳng hạn như các nền tảng enzyme tập trung vào đặc điểm địa hình và tính an ninh lương thực (không cạnh tranh nguồn cây ngũ cốc...) của cơ chất, giúp mở rộng khả năng sử dụng nhiều loại sinh khối lignocellulose. Các nguồn enzyme khác nhau vẫn cần được đánh giá để mở ra những khả năng mới cho việc thiết kế một hỗn hợp enzyme cocktail. Để khám phá các nguồn enzyme mới, có thể áp dụng các công cụ sinh học phân tử và tinh sinh như metagenomics, secretomics cũng như nghiên cứu tiềm năng sinh học của nấm và vi sinh vật.

Việc phát triển và tối ưu hóa các hỗn hợp enzyme mới để phân hủy các cơ chất khác nhau là rất cần thiết. Hơn nữa, việc thúc đẩy nghiên cứu về cơ chế hoạt động của các enzyme phụ trợ và các enzyme không thủy phân cũng rất quan trọng để tối ưu hóa các hỗn hợp này. Từ góc độ ứng dụng công nghiệp, việc hiểu rõ sự kết hợp tối ưu cho xúc tác hiệp đồng của hỗn hợp nhiều enzyme hoạt tính khác nhau hết sức có ý nghĩa và cần thiết.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

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

1. Phân lập được 56 chủng nấm thuộc ngành nấm đảm Basidiomycota và nấm túi Ascomycota, sàng lọc hoạt tính một số enzyme liên quan chuyển hóa lignocellulose, kết quả cho thấy 38 chủng biểu hiện enzyme AE, trong đó MPN12 có hoạt độ cao nhất (3.650,8 U/L); 25 chủng biểu hiện enzyme LiP, trong đó MPN12 có hoạt độ cao nhất (39,3 U/mL); 35 chủng biểu hiện enzyme CDH, trong đó MPG14 có hoạt độ cao nhất (77,4 U/L); 31 chủng biểu hiện enzyme Lac, trong đó MPN18 có hoạt độ cao nhất (7.658,5 U/L); 24 chủng biểu hiện enzyme UPO, trong đó CP22 có hoạt độ cao nhất (41,2 U/mL). Từ đó, lựa chọn được 04 chủng nấm tiềm năng là MPN12, MPG14, MPN18, và CP22.

2. Nghiên cứu thu nhận và tinh chế 05 enzyme tự nhiên từ các chủng nấm tiềm năng, gồm acetyl esterase (*LsAE*) và lignin peroxidase (*LsLiP*) từ nấm *Lentinus squarrosulus* MPN12; cellobiose dehydrogenase (*CauCDH*) từ *Coprinellus aureogranulatus* MPG14, laccase (*PleuLac*) từ *Pleurotus pulmonarius* MPN18, và unspecific peroxygenase (*CeuUPO*) từ *Candolleomyces euryspous* CP22. Đặc tính của các enzyme tinh sạch cũng đã được xác định:

- *LsAE* có trọng lượng phân tử $M_w = 41,4$ kDa, hoạt tính riêng đạt 23 U/mg, enzyme hoạt động tối ưu ở 35 °C, pH 5,5;

- *LsLiP* có $M_w = 53$ kDa, hoạt tính đặc hiệu đạt 28,3 U/mg, enzyme hoạt động tối ưu ở 35 °C, pH 5,0;

- *CauCDH* có $M_w = 109$ kDa, hoạt tính riêng đạt 28,86 U/mg, enzyme hoạt động tối ưu ở 50 °C, pH 5,5;

- *PleuLac* $M_w = 35$ kDa, hoạt tính riêng đạt 28 U/mg, enzyme hoạt động tối ưu ở 40 °C, pH 5,5;

- *CeuUPO* $M_w = 40$ kDa, hoạt tính riêng đạt 28,1 U/mg, enzyme hoạt động tối ưu ở pH 5,0 đối với ABTS và pH 7,0 đối với VA và DMP.

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 rơm 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, 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 SÁCH CÔNG BỐ KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

A. Tạp chí quốc tế (ISI):

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.

B. Tạp chí chuyên ngành trong nước:

3. Vu Dinh Giap, **Dang Thu Quynh**, and Do Huu Nghi. *Investigation of lignin peroxidase (LiP) production from fungi grown on liquid culture medium*. Vietnam Journal of Biotechnology 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>.

C. Hội thảo khoa học

5. Giap Dinh Vu, **Quynh Thu Dang**, and Nghi Do Huu (2021). *Screening carbohydrate esterase and oxidase enzyme from fungi isolated in Cuc Phuong (Ninh Binh) and Muong Phang (Dien Bien)*. Proceedings of the 3rd national scientific conference of Vietnam museum system.
6. Đỗ Hữu Nghi, **Đặng Thu Quỳnh**, Enrico Büttner, Christiane Liers, Harald Kellner, Martin Hofrichter (2023). *Nghiên cứu hệ enzyme chuyển hóa lignocellulose từ nấm Candolleomyces euryspous và tính chất thu nhận, xác định một số đặc tính của uspecific proxygenase từ nấm*. Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hongzhang Chen, 2014, Chemical composition and structure of natural lignocellulose, *Biotechnology of lignocellulose*. Springer. pp. 25-71.
2. Betts WB., Dart RK., Ball AS., Pedlar SL., 1991, Biosynthesis and structure of lignocellulose, *Biodegradation*. Springer. pp. 139-155.
3. Parveen Kumar, Diane M Barrett, Michael J Delwiche, Pieter Stroeve, 2009, Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8), pp. 3713-3729.
4. Revathy Sankaran, Kalaimani Markandan, Kuan Shiong Khoo, Chin Kui Cheng, Veeramuthu Ashokkumar, B Deepanraj, Pau Loke Show, 2021, The expansion of lignocellulose biomass conversion into bioenergy via nanobiotechnology, *Frontiers in Nanotechnology*, 3, pp. 96.
5. Alfred D French, Noelle R Bertoniere, OA Battista, John A Cuculo, Derek G Gray, 2000, Cellulose, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
6. Thomas Heinze, 2015, Cellulose: structure and properties, *Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials*, pp. 1-52.
7. KH Gardner, John Blackwell, 1974, The structure of native cellulose, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 13(10), pp. 1975-2001.
8. Sunkyu Park, John O Baker, Michael E Himmel, Philip A Parilla, David K Johnson, 2010, Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance, *Biotechnology for biofuels*, 3(1), pp. 1-10.
9. Anuj Chandel, Silvio Silverio Da Silva, 2013, *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization*.
10. Francisco M Gírio, César Fonseca, Florbela Carvalheiro, Luís Chorão Duarte, Susana Marques, Rafal Bogel-Lukasik, 2010, Hemicelluloses for fuel ethanol: a review, *Bioresource technology*, 101(13), pp. 4775-4800.
11. E Kontturi, 2015, Hemicellulose: structure, characterization, dissolution, modification, *no. November*.
12. Ling-Ping Xiao, Guo-Yong Song, Run-Cang Sun, 2017, Effect of hydrothermal processing on hemicellulose structure, *Hydrothermal processing in biorefineries*. Springer. pp. 45-94.

13. Raimo Alén, 2000, Structure and chemical composition of wood, *Forest products chemistry*, 3, pp. 11-57.
14. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, ACS Rizzatti, Rubens Monti, Héctor Francisco Terenzi, J Amrim Jorge, Dalmo de Souza Amorim, 2005, Xylanases from fungi: properties and industrial applications, *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), pp. 577-591.
15. Jennie Berglund, Shoaib Azhar, Martin Lawoko, Mikael Lindström, Francisco Vilaplana, Jakob Wohler, Gunnar Henriksson, 2019, The structure of galactoglucomannan impacts the degradation under alkaline conditions, *Cellulose*, 26(3), pp. 2155-2175.
16. John Ralph, Catherine Lapierre, Wout Boerjan, 2019, Lignin structure and its engineering, *Current opinion in biotechnology*, 56, pp. 240-249.
17. Hyoe Hatakeyama, Tatsuko Hatakeyama, 2009, Lignin structure, properties, and applications, *Biopolymers*. Springer. pp. 1-63.
18. Yao Lu, Yong-Chao Lu, Hong-Qin Hu, Feng-Jin Xie, Xian-Yong Wei, Xing Fan, 2017, Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods, *Journal of Spectroscopy*, 2017.
19. Ning Ding, Huai Liu, Yong Sun, Xing Tang, Tingzhou Lei, Feng Xu, Xianhai Zeng, Lu Lin, 2021, Lignin degradation in cooking with active oxygen and solid Alkali process: A mechanism study, *Journal of Cleaner Production*, 278, pp. 123984.
20. A Hatakka, *Biodegradation of lignin In: Hofrichter M, Steinbüchel A, editors. Biopolymers 1. Lignin, humic substances and coal*. 2001, Weinheim: Wiley.
21. Stephen Y Lin, Carlton W Dence, 2012, *Methods in lignin chemistry*.
22. Bernard Monties, Kazuhiko Fukushima, 2005, Occurrence, function and biosynthesis of lignins, *Biopolymers Online: Biology Chemistry Biotechnology Applications*, 1.
23. Seungdo Kim, Bruce E Dale, 2004, Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass and bioenergy*, 26(4), pp. 361-375.
24. Doan Thi Tuyet Le Phan Thi Pham, Le Phu Dong, 2017, Conversion of lignocellulosic biomass: From waste to promising feedstock for bioethanol production of second generation in Vietnam *Journal of Science of Lac Hong University* pp. 159-164.
25. Aicha Asma Houfani, Nico Anders, Antje C Spiess, Petr Baldrian, Said Benallaoua, 2020, Insights from enzymatic degradation of cellulose and

- hemicellulose to fermentable sugars—a review, *Biomass and Bioenergy*, 134, pp. 105481.
26. Yilu Wu, Changsheng Su, Zicheng Liao, Gege Zhang, Yongjie Jiang, Yankun Wang, Changwei Zhang, Di Cai, Peiyong Qin, Tianwei Tan, 2024, Sequential catalytic lignin valorization and bioethanol production: an integrated biorefinery strategy, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1), pp. 8.
 27. Muhammad Jahangeer, Muti Ur Rehman, Rubina Nelofer, Muhammad Nadeem, Bushra Munir, Wojciech Smulek, Teofil Jesionowski, Sarmad Ahmad Qamar, 2025, Biotransformation of lignocellulosic biomass to value-added bioproducts: insights into bio-saccharification strategies and potential concerns, *Topics in catalysis*, 68(9), pp. 929-950.
 28. Antonio D Moreno, Pablo Alvira, David Ibarra, Elia Tomás-Pejó, 2017, Production of ethanol from lignocellulosic biomass, *Production of platform chemicals from sustainable resources*, pp. 375-410.
 29. Nikolajs Vedernikovs, Galina Khroustalyova, Indrikis Muiznieks, Alexander Rapoport, 2023, New concept for conversion of lignocellulose to ethanol and furfural, *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 1-8.
 30. A de M Lopes, EX Ferreira Filho, LRS Moreira, 2018, An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown, *Journal of applied microbiology*, 125(3), pp. 632-645.
 31. Marknoah Chinenye Nwamba, Guojie Song, Fubao Sun, Marie Rose Mukasekuru, Hongyan Ren, Qing Zhang, Tishuang Cao, Huaming Wang, Haiyan Sun, Jiong Hong, 2021, Efficiency enhancement of a new cellulase cocktail at low enzyme loading for high solid digestion of alkali catalyzed atmospheric glycerol organosolvent pre-treated sugarcane bagasse, *Bioresource Technology*, 338, pp. 125505.
 32. Abu Yousuf, 2012, Biodiesel from lignocellulosic biomass—prospects and challenges, *Waste Management*, 32(11), pp. 2061-2067.
 33. Amith Abraham, Anil K Mathew, Hyojung Park, Okkyoung Choi, Raveendran Sindhu, Binod Parameswaran, Ashok Pandey, Jung Han Park, Byoung-In Sang, 2020, Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 301, pp. 122725.
 34. Cornelius Basil Tien Loong Lee, Ta Yeong Wu, 2021, A review on solvent systems for furfural production from lignocellulosic biomass, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, pp. 110172.
 35. Grzegorz Izydorczyk, Dawid Skrzypczak, Małgorzata Mironiuk, Katarzyna Mikula, Mateusz Samoraj, Filip Gil, Rafał Taf, Konstantinos Moustakas, Katarzyna Chojnacka, 2024, Lignocellulosic biomass

- fertilizers: Production, characterization, and agri-applications, *Science of The Total Environment*, pp. 171343.
36. Kuan-Ting Hsin, HueyTyng Lee, Yu-Chun Huang, Guan-Jun Lin, Pei-Yu Lin, Ying-Chung Jimmy Lin, Pao-Yang Chen, 2025, Lignocellulose degradation in bacteria and fungi: cellulosomes and industrial relevance, *Frontiers in Microbiology*, 16, pp. 1583746.
 37. Julian Detain, Ludovic Besaury, 2024, Degradation of lignocellulose by different bacterial and fungal co-cultures, *Current Research in Microbial Sciences*, 7, pp. 100271.
 38. N. T. X. and Đ. T. Thu Sâm, *Production of b-glucosidase by Aspergillus niger PBC using sugar cane bagasse*, *ASEAN Food* 2003, p. 8-11.
 39. Đặng Tất Thành, 2016, Phân lập và đánh giá đặc tính chủng *Aspergillus Brunneoviolaceus* fec 156 sinh tổng hợp hệ enzyme thủy phân xylan, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 54(4A), pp. 267-267.
 40. Zhichao Deng, Ao Xia, Qiang Liao, Xianqing Zhu, Yun Huang, Qian Fu, 2019, Laccase pretreatment of wheat straw: effects of the physicochemical characteristics and the kinetics of enzymatic hydrolysis, *Biotechnology for biofuels*, 12(1), pp. 1-12.
 41. Roxane Raulo, Egon Heuson, Renato Froidevaux, Vincent Phalip, 2021, Combining analytical approaches for better lignocellulosic biomass degradation: a way of improving fungal enzymatic cocktails?, *Biotechnology Letters*, 43, pp. 2283-2298.
 42. Ángel T Martínez, Francisco J Ruiz-Duenas, María Jesús Martínez, José C Del Río, Ana Gutierrez, 2009, Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill, *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), pp. 348-357.
 43. Grzegorz Janusz, Anna Pawlik, Urszula Świdorska-Burek, Jolanta Polak, Justyna Sulej, Anna Jarosz-Wilkolazka, Andrzej Paszczyński, 2020, Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), pp. 966.
 44. G Mathur, R Nigam, A Jaiswal, C Kumar, 2013, Bioprocess parameter optimization for laccase production in solid state fermentation, *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(2013), pp. 521-530.
 45. Harald Claus, 2004, Laccases: structure, reactions, distribution, *Micron*, 35(1-2), pp. 93-96.
 46. Khushal Brijwani, Anne Rigdon, Praveen V Vadlani, 2010, Fungal laccases: production, function, and applications in food processing, *Enzyme Research*, 2010.

47. Madhavi S Revankar ,SS Lele, 2006, Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1, *Process Biochemistry*, 41(3), pp. 581-588.
48. Everton Skoronski, Diego Hoefling Souza, Cyntia Ely, Felipe Broilo, Mylena Fernandes, Agenor Fúrigo Júnior, Marcos Gomes Ghislandi, 2017, Immobilization of laccase from *Aspergillus oryzae* on graphene nanosheets, *International journal of biological macromolecules*, 99, pp. 121-127.
49. D Slomczynski, JPK Nakas, SW1388373 Tanenbaum, 1995, Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34, *Applied and environmental microbiology*, 61(3), pp. 907-912.
50. HISASHI Tamaru ,HIROKAZU Inoue, 1989, Isolation and characterization of a laccase-derepressed mutant of *Neurospora crassa*, *Journal of bacteriology*, 171(11), pp. 6288-6293.
51. Ming Tien, T Kent Kirk, Christopher Bull, James A Fee, 1986, Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3, 4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds, *Journal of biological chemistry*, 261(4), pp. 1687-1693.
52. Shouzhi Li, Lu He, Na Shi, Yanzhen Chen, Muhammad Saeed, Zhong Ni, Huayou Chen, 2024, Preparing the pure lignin peroxidase and exploring the effects of chemicals on the activity, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 54(5), pp. 660-667.
53. KE Hammel, 1997, Fungal degradation of lignin, *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*, 33, pp. 45.
54. K Piontek, AT Smith, W Blodig, 2001, Lignin peroxidase structure and function, *Biochemical Society Transactions*, 29(2), pp. 111-116.
55. Anil Kumar Singh, Roberto Fernandez-Lafuente, Jens Ejbye Schmidt, Grzegorz Boczkaj, Muhammad Bilal, 2024, Biocatalytic Functionalities of Lignin Peroxidase-Based Systems in Lignin Depolymerization and Pollutants Removal from Environmental Matrices, *Current Pollution Reports*, pp. 1-17.
56. Ming Tien ,T Kent Kirk, 1988, Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods in enzymology*. Elsevier. pp. 238-249.
57. JERZY Rogalski, T Lundell, ANDRZEJ Leonowicz, A Hatakka, 1991, Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions.
58. Anne Kantelinen, Annele Hatakka, Liisa Viikari, 1989, Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3), pp. 234-239.

59. Anil Kumar Singh, Muhammad Bilal, Hafiz MN Iqbal, Anne S Meyer, Abhay Raj, 2021, Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: Status, opportunities and challenges, *Science of the Total Environment*, 777, pp. 145988.
60. Pauli Ollikka, Kirsi Alhonmäki, Veli-Matti Leppänen, Tuomo Glumoff, Timo Rajola, Ilari Suominen, 1993, Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and environmental microbiology*, 59(12), pp. 4010-4016.
61. Muniba Faiza, Shengfeng Huang, Dongming Lan, Yonghua Wang, 2019, New insights on unspecific peroxygenases: superfamily reclassification and evolution, *BMC Evolutionary Biology*, 19, pp. 1-19.
62. Alina Kinner, Katrin Rosenthal, Stephan Lütz, 2021, Identification and expression of new unspecific peroxygenases—Recent advances, challenges and opportunities, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, pp. 705630.
63. Huanhuan Li, Yawen Huang, Fuqiang Chen, Zhigang Zeng, Frank Hollmann, Xin Wu, Xiyang Zhang, Peigao Duan, Hao Su, Jianjun Shi, 2024, Unspecific peroxygenase enabled formation of azoxy compounds, *Nature Communications*, 15(1), pp. 8312.
64. Riin Kont, Bastien Bissaro, Vincent GH Eijsink, Priit Väljamäe, 2020, Kinetic insights into the peroxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs), *Nature Communications*, 11(1), pp. 5786.
65. Angel T Martínez, Francisco J Ruiz-Dueñas, Susana Camarero, Ana Serrano, Dolores Linde, Henrik Lund, Jesper Vind, Morten Tovborg, Owik M Herold-Majumdar, Martin Hofrichter, 2017, Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations, *Biotechnology advances*, 35(6), pp. 815-831.
66. Patricia Molina-Espeja, Eva Garcia-Ruiz, David Gonzalez-Perez, René Ullrich, Martin Hofrichter, Miguel Alcalde, 2014, Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*, *Applied and environmental microbiology*, 80(11), pp. 3496-3507.
67. Kaixiang Chen, Xingchen Liu, Liangkun Long, Shaojun Ding, 2017, Cellobiose dehydrogenase from *Volvariella volvacea* and its effect on the saccharification of cellulose, *Process biochemistry*, 60, pp. 52-58.
68. Daniel Kracher, Roland Ludwig, 2016, Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature—A review/Cellobiosedehydrogenase: Ein essentielles Enzym für den Lignozelluloseabbau in der Natur—Eine Übersicht, *Die Bodenkultur*:

- Journal of Land Management, Food and Environment*, 67(3), pp. 145-163.
69. Marcel Zamocky, R Ludwig, C Peterbauer, BM Hallberg, Christina Divne, P Nicholls, D Haltrich, 2006, Cellobiose dehydrogenase-a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi, *Current protein and peptide science*, 7(3), pp. 255-280.
 70. Gunnar Henriksson, Gunnar Johansson, Göran Pettersson, 2000, A critical review of cellobiose dehydrogenases, *Journal of biotechnology*, 78(2), pp. 93-113.
 71. Tanima Saha, Debi Ghosh, Srijata Mukherjee, Shilpi Bose, Mina Mukherjee, 2008, Cellobiose dehydrogenase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus*, *Process Biochemistry*, 43(6), pp. 634-641.
 72. Ursula Baminger, Sai S Subramaniam, V Renganathan, Dietmar Haltrich, 2001, Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*, *Applied and environmental microbiology*, 67(4), pp. 1766-1774.
 73. Naoto Habu, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima, Bert Pettersson, Karl-Erik L Eriksson, 1997, Enhanced production of cellobiose dehydrogenase in cultures of *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with bovine calf serum, *Biotechnology and applied biochemistry*, 26(2), pp. 97-102.
 74. Stefan Scheiblbrandner, Florian Csarman, Roland Ludwig, 2022, Cellobiose dehydrogenase in biofuel cells, *Current opinion in biotechnology*, 73, pp. 205-212.
 75. Ellie Ashcroft, Jose Munoz-Munoz, 2024, A review of the principles and biotechnological applications of glycoside hydrolases from extreme environments, *International Journal of Biological Macromolecules*, 259, pp. 129227.
 76. Priit Väljamäe, Göran Pettersson, Gunnar Johansson, 2001, Mechanism of substrate inhibition in cellulose synergistic degradation, *European Journal of Biochemistry*, 268(16), pp. 4520-4526.
 77. Madhavi Latha Gandla, Carlos Martín, Leif J Jönsson, 2018, Analytical enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for conversion to biofuels and bio-based chemicals, *Energies*, 11(11), pp. 2936.
 78. Martina Andlar, Tonči Rezić, Nenad Marđetko, Daniel Kracher, Roland Ludwig, Božidar Šantek, 2018, Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation, *Engineering in Life Sciences*, 18(11), pp. 768-778.

79. Parmeshwar Vitthal Gavande ,Arun Goyal, 2023, Endo- β -1, 4-glucanase, *Glycoside Hydrolases*. Elsevier. pp. 55-76.
80. James R Ketudat Cairns ,Asim Esen, 2010, β -Glucosidases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20), pp. 3389-3405.
81. JG Shewale, 1982, β -Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose, *International Journal of Biochemistry*, 14(6), pp. 435-443.
82. David B Wilson, 2009, Cellulases and biofuels, *Current opinion in biotechnology*, 20(3), pp. 295-299.
83. Xin-Liang Li, Christopher D Skory, Michael A Cotta, Vladimir Puchart,Peter Biely, 2008, Novel family of carbohydrate esterases, based on identification of the *Hypocrea jecorina* acetyl esterase gene, *Applied and environmental microbiology*, 74(24), pp. 7482-7489.
84. Giap Vu Dinh, Duy Vu Dinh,Thang Bui Van, 2022, Bioconversion of lignocellulosic materials with the contribution of a feruloyl esterase hydrolase from *alternaria tenuissima* to release carbohydrates.
85. Dominic WS Wong, 2006, Feruloyl esterase, *Applied biochemistry and biotechnology*, 133(2), pp. 87-112.
86. Jinguang Hu, Valdeir Arantes,Jack N. Saddler, 2011, The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?, *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), pp. 36.
87. Peter Biely, 2012, Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides, *Biotechnology advances*, 30(6), pp. 1575-1588.
88. Aglaia Popa, Florentina Israel-Roming, Călina Petruța Cornea,Maria Mihaela Zugravu, 2020, A short review on acetyl xylan esterases.
89. Divakar Dahiya ,Poonam Singh Nigam, 2022, Sustainable biosynthesis of esterase enzymes of desired characteristics of catalysis for pharmaceutical and food industry employing specific strains of microorganisms, *Sustainability*, 14(14), pp. 8673.
90. Maija Sundberg, Kaisa Poutanen, Pertti Markkanen,Matti Linko, 1990, An extracellular esterase of *Aspergillus awamori*, *Biotechnology and applied biochemistry*.
91. Paul Christakopoulos, D Mamma, D Kekos,BJ Macris, 1999, Enhanced acetyl esterase production by *Fusarium oxysporum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(4), pp. 443-446.
92. Craig B Faulds ,Gary Williamson, 1994, Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose, *Microbiology*, 140(4), pp. 779-787.

93. Jiabao Li, Shichun Cai, Yuanming Luo, Xiuzhu Dong, 2011, Three Feruloyl Esterases in *Cellulosilyticum ruminicola* H1 Act Synergistically To Hydrolyze Esterified Polysaccharides, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), pp. 6141-6147.
94. Sindhu Mathew, T Emilia Abraham, 2004, Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications, *Critical reviews in biotechnology*, 24(2-3), pp. 59-83.
95. V F[†] Crepin, C B[†] Faulds, IF Connerton, 2004, Functional classification of the microbial feruloyl esterases, *Applied microbiology and biotechnology*, 63(6), pp. 647-652.
96. H Mori, K Kawabata, N Yoshimi, T Tanaka, T Murakami, T Okada, H Murai, 1999, Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis, *Anticancer research*, 19(5A), pp. 3775-3778.
97. E Fazary Ahmed, Ju Yi-Hsu, 2008, The large-scale use of feruloyl esterases in industry, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(5), pp. 95-110.
98. Adiphol Dilokpimol, Miia R Mäkelä, Maria Victoria Aguilar-Pontes, Isabelle Benoit-Gelber, Kristiina S Hildén, Ronald P de Vries, 2016, Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications, *Biotechnology for biofuels*, 9(1), pp. 1-18.
99. Yan-Ling Liang, Zheng Zhang, Min Wu, Yuan Wu, Jia-Xun Feng, 2014, Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1, *BioMed research international*, 2014.
100. Saritha Mohanram, Dolamani Amat, Jairam Choudhary, Anju Arora, Lata Nain, 2013, Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries, *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), pp. 1-12.
101. Michael E Himmel, Shi-You Ding, David K Johnson, William S Adney, Mark R Nimlos, John W Brady, Thomas D Foust, 2007, Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production, *science*, 315(5813), pp. 804-807.
102. Mukund Adsul, Simranjeet Kaur Sandhu, Reeta Rani Singhania, Ravi Gupta, Suresh K Puri, Anshu Mathur, 2020, Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels, *Enzyme and microbial technology*, 133, pp. 109442.

103. Yi-Heng Percival Zhang ,Lee R Lynd, 2004, Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems, *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), pp. 797-824.
104. Petr Baldrian, 2006, Fungal laccases–occurrence and properties, *FEMS microbiology reviews*, 30(2), pp. 215-242.
105. R Jason Quinlan, Matt D Sweeney, Leila Lo Leggio, Harm Otten, Jens-Christian N Poulsen, Katja Salomon Johansen, Kristian BRM Krogh, Christian Isak Jørgensen, Morten Tovborg, Annika Anthonsen, 2011, Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), pp. 15079-15084.
106. Katja S Johansen, 2016, Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases, *Biochemical Society Transactions*, 44(1), pp. 143-149.
107. Svein Jarle Horn, Gustav Vaaje-Kolstad, Bjørge Westereng, VincentGH Eijsink, 2012, Novel enzymes for the degradation of cellulose, *Biotechnology for biofuels*, 5(1), pp. 45.
108. Veera Gnaneswar Gude, Nagamany Nirmalakhandan, Shuguang Deng, 2010, Renewable and sustainable approaches for desalination, *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(9), pp. 2641-2654.
109. Rajeev Kumar ,Charles E Wyman, 2009, Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies, *Biotechnology progress*, 25(2), pp. 302-314.
110. Vanessa J Melino, Mark A Tester, Mamoru Okamoto, 2022, Strategies for engineering improved nitrogen use efficiency in crop plants via redistribution and recycling of organic nitrogen, *Current Opinion in Biotechnology*, 73, pp. 263-269.
111. Herman Suryadi, Jessica J Judono, Merianda R Putri, Alma D Eclessia, Jiihan M Ulhaq, Dinar N Agustina, Triyani Sumiati, 2022, Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi, *Heliyon*, pp. e08865.
112. Wagner Rodrigo De Souza, 2013, Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. InTech.
113. Thammaiah Vandana, Samanta Ashish Kumar, Senani Swaraj, Sridhar Manpal, 2019, Purification, characterization, and biodelignification potential of lignin peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, *BioResources*, 14(3), pp. 5380-5399.
114. A Ravichandran, RG Rao, MS Gopinath, M Sridhar, 2019, Purification and characterization of versatile peroxidase from *Lentinus squarrosulus*

- and its application in biodegradation of lignocellulosics, *J Appl Biotechnol Bioeng*, 6(6), pp. 280-286.
115. Adarsh Kumar ,Ram Chandra, 2020, Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment, *Heliyon*, 6(2), pp. e03170.
 116. Tatsuki Sugiura, Kenji Yamagishi, Toshiyuki Kimura, Tomoaki Nishida, Hirokazu Kawagishi,Hirofumi Hirai, 2009, Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(8), pp. 1793-1798.
 117. Xiao-Jun Li, Ren-Chao Zheng, Zhe-Ming Wu, Xu Ding,Yu-Guo Zheng, 2014, Thermophilic esterase from *Thermomyces lanuginosus*: molecular cloning, functional expression and biochemical characterization, *Protein expression and purification*, 101, pp. 1-7.
 118. Trần Liên Hà ,Nguyễn Thị Ngọc Ngà, 2013, Tách dòng và biểu hiện gene mã hóa enzyme xylanase từ nấm mốc *Aspergillus niger* C1 vào *E. coli* BL21, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 51(1), pp. 73-73.
 119. Miia R Mäkelä, Adiphol Dilokpimol, Salla M Koskela, Jaana Kuuskeri, Ronald P de Vries,Kristiina Hilden, 2018, Characterization of a feruloyl esterase from *Aspergillus terreus* facilitates the division of fungal enzymes from Carbohydrate Esterase family 1 of the carbohydrate-active enzymes (CAZy) database, *Microbial biotechnology*, 11(5), pp. 869-880.
 120. Oyindamola Olajumoke Abiodun, Adenike Martha Alege, Precious Ulomma Ezurike, Abraham Nkumah, Oluwatosin Adelowo,Tolulope Aderinola Oke, 2022, *Lentinus squarrosulus* Mont. Mushroom: molecular identification, in vitro anti-diabetic, anti-obesity, and cytotoxicity assessment, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(6), pp. 642.
 121. Jean-Marie Polèse, 2000, *Le mini-guide des champignons*. HF Ullmann Editions, 560.
 122. Mei Huang ,Tolgor Bau, 2018, New findings of *Coprinellus* species (Psathyrellaceae, Agaricales) in China.
 123. DE Desjardin ,BA Perry, 2016, Dark-spored species of agaricineae from Republic of São Tomé and Príncipe, West Africa, *Mycosphere*, 7(3), pp. 359-391.
 124. Jegadeesh Raman, Kab-Yeul Jang, Youn-Lee Oh, Minji Oh, Ji-Hoon Im, Hariprasath Lakshmanan,Vikineswary Sabaratnam, 2021, Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: an overview, *Mycobiology*, 49(1), pp. 1-14.

125. Hao Jiang, Lei Gao, Xin Hu, Junsheng Fu, Junli Zhang, 2025, Identification and Nutrient Composition of a Wild *Pleurotus pulmonarius* Strain from Tibet, and the Antioxidant and Cytotoxic Activities of Polysaccharides from This Fungus, *Foods*, 14(7), pp. 1198.
126. Muhammad Haqnawaz, Muhammad Usman, Nadia Fatima, Abdul Rehman Niazi, Abdul Nasir Khalid, 2024, Three new species of the genus *Candolleomyces* (Psathyrellaceae) from Pakistan, *Plant Systematics and Evolution*, 310(6), pp. 42.
127. Mainak Mukhopadhyay, Rintu Banerjee, 2015, Purification and biochemical characterization of a newly produced yellow laccase from *Lentinus squarrosulus* MR13, *3 Biotech*, 5(3), pp. 227-236.
128. Nadezhda V Psurtseva, Anna A Kiyashko, Svetlana V Senik, Thi Ha Giang Pham, 2025, Ex Situ Conservation, DNA Barcoding and Enzymatic Potential Evaluation of Macrofungi (Basidiomycota, Ascomycota) from Vietnam, *Journal of Fungi*, 11(1), pp. 34.
129. Trinh Tam Kiet, 2012, Macrofungi of Vietnam, *Natural Science and Technology Publishing House, Hanoi (in Vietnamese)*.
130. Virginia K Duwe, Lien Van Vu, Thomas von Rintelen, Eckhard von Raab-Straube, Stefan Schmidt, Sinh Van Nguyen, Thong Dinh Vu, Tu Van Do, Truong Hong Luu, Vuong Ba Truong, 2022, Contributions to the biodiversity of Vietnam—Results of VIETBIO inventory work and field training in Cuc Phuong National Park, *Biodiversity Data Journal*, 10.
131. Đỗ Đức Quế, Dương Minh Lam, Vương Trọng Hào, Ghi nhận mới chi nấm túi Biscogniauxia thuộc họ Xylariaceae ở Việt Nam.
132. Duong Minh Lam, Truong Thi Chien, 2013, Characteristics of laccase producing *Trametes maxima* CPB30 and its application in decolorization of dye polluted water, *Academia Journal of Biology*, 35(4), pp. 477-483.
133. Doan Thi Phuong Linh, Bui Thi Thu Hien, Do Due Que, Duong Minh Lam, Norbert Arnold, Jürgen Schmidt, Andrea Porzel, Dang Ngoc Quang, 2014, Cytotoxic constituents from the Vietnamese fungus *Xylaria schweinitzii*, *Natural product communications*, 9(5), pp. 1934578X1400900518.
134. Duong Minh Lam, Vu Thi Thanh Tam, 2009, Three new records of Xylariaceous fungi in Muong Phang, Dien Bien, *Journal of Science of HNUE*, 54(1), pp. 105-111.
135. Nghi H Do, Hieu H Pham, Tan M Le, Jeroen Lauwaert, Ludo Diels, An Verberckmoes, Nga HN Do, Viet T Tran, Phung K Le, 2020, The novel

- method to reduce the silica content in lignin recovered from black liquor originating from rice straw, *Scientific reports*, 10(1), pp. 1-11.
136. ELIZABETH N Bannerman ,J Nicolet, 1976, Isolation and characterization of an enzyme with esterase activity from *Micropolyspora faeni*, *Applied and Environmental Microbiology*, 32(1), pp. 138-144.
 137. Peter Roberts ,Shelley Evans, 2014, *The book of fungi: a life-size guide to six hundred species from around the world*.
 138. Thomas J White, Thomas Bruns, SJWT Lee,John Taylor, 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), pp. 315-322.
 139. Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski,Sudhir Kumar, 2013, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular biology and evolution*, 30(12), pp. 2725-2729.
 140. Claude Dupont, Nicole Daigneault, Francois Shareck, Rolf Morosoli,Dieter Kluepfel, 1996, Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*, *Biochemical journal*, 319(3), pp. 881-886.
 141. Ursula Baminger, Bernd Nidetzky, Klaus D Kulbe,Dietmar Haltrich, 1999, A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase, *Journal of microbiological methods*, 35(3), pp. 253-259.
 142. Wolfgang Harreither, Christoph Sygmund, Evelyn Dünhofen, Rafael Vicuna, Dietmar Haltrich,Roland Ludwig, 2009, Cellobiose dehydrogenase from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), pp. 2750-2757.
 143. Sunil S More, Renuka PS, S Malini,Veena SM, 2011, Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp, *Enzyme Research*, 2011.
 144. Dennis C Yee ,Thomas K Wood, 1997, 2, 4-Dichlorophenol degradation using *Streptomyces viridosporus* T7A lignin peroxidase, *Biotechnology progress*, 13(1), pp. 53-59.
 145. Marion M Bradford, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), pp. 248-254.
 146. Klaus Weber ,Mary Osborn, 1969, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), pp. 4406-4412.

147. Jakub M Tomczak ,Ewelina Węglarz-Tomczak, 2019, Estimating kinetic constants in the Michaelis–Menten model from one enzymatic assay using Approximate Bayesian Computation, *FEBS letters*, 593(19), pp. 2742-2750.
148. Tharaka Ruwan Bandara ,Gregory John Griffin, 2022, Transport of sugars contained in an ionic liquid medium via a supported liquid membrane, *Journal of Ionic Liquids*, 2(1), pp. 100026.
149. Jack PC Kleijnen, 2014, Response surface methodology, *Handbook of simulation optimization*. Springer. pp. 81-104.
150. Meega Reji ,Rupak Kumar, 2022, Response surface methodology (RSM): An overview to analyze multivariate data, *Indian J. Microbiol. Res*, 9, pp. 241-248.
151. Vu Dinh Giap, *Nghiên cứu phối hợp esterase và hệ enzyme thủy phân từ nấm trong chuyển hóa phụ phẩm công-nông nghiệp để thu nhận bioethanol*, Học viện Khoa học và Công nghệ. 2018.
152. Loreto Egaña, Rodrigo Gutiérrez, Valentina Caputo, Alessandra Peirano, Jeannette Steiner,Jaime Eyzaguirre, 1996, Purification and characterization of two acetyl xylan esterases from *Penicillium purpurogenum*, *Biotechnology and applied biochemistry*, 24(1), pp. 33-99.
153. Vinita Yadav ,Sadhana Nighojkar, 2023, Cellobiose Dehydrogenase from *Schizophyllum commune* Bcc26414: Purification And Characterization, *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 20(3).
154. Aisha Umar ,Shakil Ahmed, 2022, Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship, *Scientific Reports*, 12(1), pp. 2416.
155. Yue Sun, Zi-Lu Liu, Bo-Yang Hu, Qing-Jun Chen, Ai-Zhen Yang, Qiu-Ying Wang, Xiao-Feng Li, Jia-Yan Zhang, Guo-Qing Zhang,Yong-Chang Zhao, 2021, Purification and characterization of a thermo-and pH-stable laccase from the litter-decomposing fungus *Gymnopus luxurians* and laccase mediator systems for dye decolorization, *Frontiers in Microbiology*, 12, pp. 672620.
156. Meera Yadav, Pratibha Yadav,Kapil Deo Singh Yadav, 2009, Purification and characterization of lignin peroxidase from *Loweporus lividus* MTCC-1178, *Engineering in Life Sciences*, 9(2), pp. 124-129.
157. Mutsumi Sugiura, Hirofumi Hirai,Tomoaki Nishida, 2003, Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, *FEMS microbiology letters*, 224(2), pp. 285-290.

158. Giuliano Degrassi, Milan Kojic, Goran Ljubijankic, Vittorio Venturi, 2000, The acetyl xylan esterase of *Bacillus pumilus* belongs to a family of esterases with broad substrate specificity, *Microbiology*, 146(7), pp. 1585-1591.
159. Yueqi Zhang, Hong Yang, Xinrui Yu, Haiyang Kong, Jiaming Chen, Huiying Luo, Yingguo Bai, Bin Yao, 2019, Synergistic effect of acetyl xylan esterase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and xylanase from *Neocallimastix patriciarum* achieved by introducing carbohydrate-binding module-1, *AMB Express*, 9(1), pp. 1-12.
160. Moon-Jeong Han, Hyoung-Tae Choi, Hong-Gyu Song, 2005, Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*, *The Journal of Microbiology*, 43(6), pp. 555-560.
161. Catherine Madzak, MC Mimmi, E Caminade, A Brault, S Baumberger, P Briozzo, C Mougin, C Jolival, 2006, Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis, *Protein Engineering Design and Selection*, 19(2), pp. 77-84.
162. Maria Chiara Colao, Stefania Lupino, Anna Maria Garzillo, Vincenzo Buonocore, Maurizio Ruzzi, 2006, Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme, *Microbial Cell Factories*, 5(1), pp. 1-11.
163. Vu Dinh Giap, Hoang Thanh Duc, Pham Thi Mai Huong, DT Hanh, DH Nghi, Vu Dinh Duy, Dang Thu Quynh, 2022, Purification and characterization of lignin peroxidase from white-rot fungi *Pleurotus pulmonarius* CPG6 and its application in decolorization of synthetic textile dyes, *The Journal of General and Applied Microbiology*.
164. Rossana Liguori, Elena Ionata, Loredana Marcolongo, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Francesco La Cara, Vincenza Faraco, 2015, Optimization of *Arundo donax* Saccharification by (Hemi) cellulolytic Enzymes from *Pleurotus ostreatus*, *BioMed Research International*, 2015.
165. Badal C Saha, Loren B Iten, Michael A Cotta, Y Victor Wu, 2005, Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol, *Process biochemistry*, 40(12), pp. 3693-3700.
166. Jinjing Zhang, Xinyi Zhuo, Qian Wang, Hao Ji, Hui Chen, Haibo Hao, 2023, Effects of different nitrogen levels on lignocellulolytic enzyme production and gene expression under straw-state cultivation in *Stropharia rugosoannulata*, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), pp. 10089.

167. Laura Levin, Eliana Malignani, Araceli Marcela Ramos, 2010, Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates, *Bioresource technology*, 101(12), pp. 4554-4563.
168. Eva Kachlishvili, Michel J Penninckx, Nino Tsiklauri, Vladimir Elisashvili, 2006, Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, pp. 391-397.
169. Vladimir Elisashvili, Eva Kachlishvili, Michel Penninckx, 2008, Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), pp. 1531-1538.
170. Petr Baldrian, 2004, Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi, *FEMS microbiology ecology*, 50(3), pp. 245-253.
171. James Linden, Meropi Samara, Stephen Decker, Ellen Johnson, Michele Boyer, Miklos Pecs, William Adney, Michael Himmel, 1994, Purification and characterization of an acetyl esterase from *Aspergillus niger*, *Applied biochemistry and biotechnology*, 45, pp. 383-393.
172. Kamal K Bhardwaj, Adarsh Dogra, Smita Kapoor, Akshita Mehta, Reena Gupta, 2020, Purification and Properties of an Esterase from *Bacillus licheniformis* and its Application in Synthesis of Octyl Acetate, *The Open Microbiology Journal*, 14(1), pp. 113-121.
173. Pervin Basaran, YD Hang, 2000, Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*, *Letters in applied microbiology*, 30(2), pp. 167-171.
174. Aiswarya Rajan, Vijayalakshmi Shankar, 2023, Purification and Characterization of Esterase enzyme from *Aspergillus versicolor*, *Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Article Vol*, 42(5).
175. Justyna Sulej, Grzegorz Janusz, Monika Osńska-Jaroszuk, Patrycja Rachubik, Andrzej Mazur, Iwona Komaniecka, Adam Choma, Jerzy Rogalski, 2015, Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important *Cerrena unicolor* strain, *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, pp. 1638-1658.
176. Narayanan P Muthukumarasamy, Beenie Jackson, Antony Joseph Raj, Murugan Sevanan, 2015, Production of extracellular laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 using agroresidues as a potential substrate, *Biochemistry research international*, 2015(1), pp. 765190.
177. Alshaimaa M Elsayed, Mohamed Mahmoud, Ghada SA Abdel Karim, Mohamed Abdelraof, Abdelmageed M Othman, 2023, Purification and

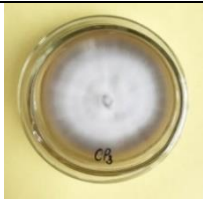
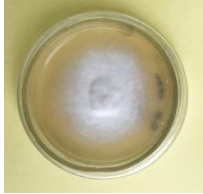
- biochemical characterization of two laccase isoenzymes isolated from *Trichoderma harzianum* S7113 and its application for bisphenol A degradation, *Microbial Cell Factories*, 22(1), pp. 1-12.
178. Kana Puspita, Williams Chiari, Syahrin N Abdulmadjid, Rinaldi Idroes, Muhammad Iqhrammullah, 2022, Four Decades of Laccase Research for Wastewater Treatment: Insights from Bibliometric Analysis, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(1), pp. 308.
 179. Josée-Anne Majeau, Satinder K Brar, Rajeshwar Dayal Tyagi, 2010, Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, *Bioresource technology*, 101(7), pp. 2331-2350.
 180. M Yadav, SK Singh, KDS Yadav, 2009, Purification and Characterization of Lignin Peroxidase from *Pleurotus sajor caju* MTCC-141, *Journal of wood chemistry and technology*, 29(1), pp. 59-73.
 181. JinShui Yang, HongLi Yuan, HeXiang Wang, WenXin Chen, 2005, Purification and characterization of lignin peroxidases from *Penicillium decumbens* P6, *World Journal of microbiology and Biotechnology*, 21, pp. 435-440.
 182. Ayodeji O Falade, Uchechukwu U Nwodo, Benson C Iweriebor, Ezekiel Green, Leonard V Mabinya, Anthony I Okoh, 2017, Lignin peroxidase functionalities and prospective applications, *MicrobiologyOpen*, 6(1), pp. e00394.
 183. Xin Fu, Kexin Lin, Xiaodong Zhang, Zhiyong Guo, Lixin Kang, Aitao Li, 2024, Identification, heterologous expression and characterization of a new unspecific peroxygenase from *Marasmius fiardii* PR-910, *Bioresources and Bioprocessing*, 11(1), pp. 33.
 184. Esteban D Babot, José C del Río, Lisbeth Kalum, Angel T Martínez, Ana Gutiérrez, 2013, Oxyfunctionalization of aliphatic compounds by a recombinant peroxygenase from *Coprinopsis cinerea*, *Biotechnology and Bioengineering*, 110(9), pp. 2323-2332.
 185. Jan Kiebitz, Kai-Uwe Schmidtke, Jörg Zimmermann, Harald Kellner, Nico Jehmlich, René Ullrich, Daniel Zänder, Martin Hofrichter, Katrin Scheibner, 2017, A peroxygenase from *Chaetomium globosum* catalyzes the selective oxygenation of testosterone, *ChemBioChem*, 18(6), pp. 563-569.
 186. Heidi Østby, Line Degn Hansen, Svein J Horn, Vincent GH Eijsink, Anikó Várnai, 2020, Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the*

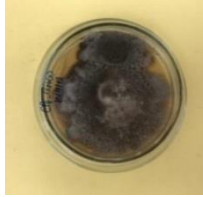
- Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9-10), pp. 623-657.
187. Eugene Marfo Obeng ,Clarence M Ongkudon, 2021, Development of Lignocellulase Enzyme Cocktail—A Logical Use of Statistical Experimental Design Techniques.
 188. Maria Papagianni, 2004, Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes, *Biotechnology advances*, 22(3), pp. 189-259.
 189. Jin Zhou, Yong-Hong Wang, Ju Chu, Ling-Zhi Luo, Ying-Ping Zhuang, Si-Liang Zhang, 2009, Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments, *Bioresource Technology*, 100(2), pp. 819-825.
 190. Maria de Lourdes TM Polizeli, Alexandre Favarin Somera, Rosymar Coutinho de Lucas, Monica Stropa Ferreira Nozawa, Michele Michelin, 2017, Enzymes involved in the biodegradation of sugarcane biomass: challenges and perspectives, *Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane*, pp. 55-79.
 191. Gustavo Pagotto Borin, Camila Cristina Sanchez, Amanda Pereira de Souza, Eliane Silva de Santana, Aline Tieppo de Souza, Adriana Franco Paes Leme, Fabio Marcio Squina, Marcos Buckeridge, Gustavo Henrique Goldman, Juliana Velasco de Castro Oliveira, 2015, Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass, *PLoS One*, 10(6), pp. e0129275.
 192. Leif J Jönsson ,Carlos Martín, 2016, Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *Bioresource technology*, 199, pp. 103-112.

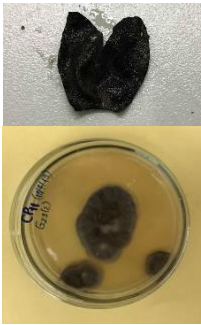
PHỤ LỤC

PL 1. Đặc điểm hình thái của các chủng nấm phân lập được.

TT	Tên chủng	Đặc điểm hình thái	Hình ảnh	Địa điểm lấy mẫu
1	CP1	Bộ: Agaricales Họ: Strophariaceae Chi: <i>Deconica</i> Loài: <i>D. coprophila</i> Quả thể dài từ 2-5cm, màu nâu đỏ. Mũ nấm lồi ở giữa có đường kính từ 0,5-2cm, màu nâu đỏ hoặc nâu vàng, trơn nhẵn. Cuống dài từ 0,5-2cm. Thường bắt gặp trên các loại gỗ mục.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35"00"B, 105°66'75"28"E
2	CP2	Bộ: Agaricales Họ: Mycenaceae Chi: <i>Mycena</i> Loài: <i>M. anipularis</i> Quả thể có màu xám hoặc nâu. Có khả năng phát quang sinh học và ánh sáng tạo ra gọi là cáo lửa.	 	Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35"00"B, 105°66'75"28"E
3	CP3	Bộ: Agaricales Họ: Mycenaceae Chi: <i>Umbelopsis</i> Loài: <i>U. isabellina</i> Thể quả nhỏ. Tán nấm		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35"00"B, 105°66'75"28"E

		0.5-3cm, dày 3-5mm, hình bán nguyệt hoặc vỏ hén, màu trắng nâu, bề mặt có vân bức xạ, nhẵn, mép có giải rộng màu trắng vỏ trũng. Mô nấm màu trắng. Mọc thành đám trên gỗ mục cây lá kim hoặc lá rộng.		
4	CP4	Bộ: Agaricales Họ: Psathyrellaceae Chi: Psathyrella Loài: <i>P. pygmaea</i> Thể quả nhỏ khoảng 0.5-2 cm, đỉnh tròn, màu đen, bề mặt nhẵn; cuống thường tương đối ngắn hoặc gần như không có. Mọc trên thân và nhánh cây gỗ mục, gây mục mềm.	 	Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
5	CP5	Bộ: Agaricales Họ: Xylariaceae Chi: Xylaria Loài: <i>X. allantoides</i> Thể quả hình dạng giống gây bóng chày cao khoảng 2-8 cm, đỉnh tròn. màu đen, bề mặt có vết nứt và vảy; cuống thường tương đối dài, nhưng cũng	 	Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

		có thể ngắn hoặc gần như không có. Mọc trên thân và nhánh cây gỗ mục, gây mục mềm.		
6	CP7	Bộ: Helotiales Họ: Helotiaceae Chi: <i>Bisporella</i> Loài: <i>Bisporella</i> sp. Quả thể hình cầu hoặc hình giọt, có màu vàng nhạt và nhẵn. Quả thể nhỏ, thường đường kính <3mm và cao $\leq$1mm và có hình đĩa. Mặt trong nhẵn, vàng nhạt, trong khi phía mặt ngoài màu vàng xanh. Cuống rộng, màu vàng xanh và rất ngắn. Quả thể có màu nâu vàng.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
7	CP8	Bộ: Sordariomycetes Họ: Trichosphaeriaceae Chi: <i>Nigrospora</i> Loài: <i>N. oryzae</i> Thể quả mọc thành cụm. Chất lông màu nâu. Đường kính 12-16cm. Mọc trên thân và nhánh cây gỗ mục.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

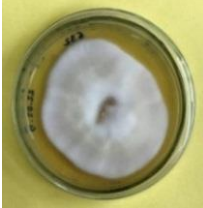
8	CP9	Bộ: Agaricales Họ: Physalacriaceae Chi: <i>Flammulina</i> Loài: <i>Flammulina</i> sp. Thể quả nhỏ, tán nấm rộng 2-3 x 2-5cm, dày 1-2,5cm; màu vàng nhạt; bề mặt không có vân vòng, mép sắc uốn cong. Không có cuống hoặc cuống ngắn. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng và lá kim.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
9	CP11	Bộ: Auriculariales Họ: Auriculariaceae Chi: <i>Auricularia</i> Loài: <i>Auricularia</i> sp. Thể quả mọc thành cụm, dạng tai hoặc lá. Chất lông màu nâu hoặc nâu xám hơi tím. Đường kính 8-10cm.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
10	CP12	Bộ: Polyporales Họ: Ganodermataceae Chi: <i>Ganoderma</i> Loài: <i>Ganoderma</i> sp. Thể quả mọc thành cụm, màu nâu xám, bờ viền hình bán nguyệt màu nâu nhạt. Đường kính 6-12 cm.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

11	CP13	Bộ: Xylariales Họ: Xylariaceae Chi: <i>Nemania</i> Loài: <i>N. bipapillata</i> Quả thể màu nâu sẫm, dạng gỗ. Phần mũ nấm tròn dẹt, có đường kính 0,5-2,0cm. Bề mặt có màu nâu sẫm.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
12	CP14	Bộ: Xylariales Họ: Xylariaceae Chi: <i>Nemania</i> Loài: <i>N. bipapillata</i> Quả thể màu đỏ hoặc nâu đỏ, dạng gỗ. Mũ nấm có các vân sọc dài, đường kính từ 4-6cm, màu nâu đỏ đậm ở giữa và nhạt dần về ngoài tán. Cuống ngắn 0,5-2cm.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
13	CP15	Bộ: Xylariales Họ: Xylariaceae Chi: <i>Xylaria</i> Loài: <i>X. xanthinovelutina</i> Quả thể có phần cuống dài 5-10cm. Phần mũ nấm tròn dẹt, lõm có đường kính 0,5-2,0cm. Bề mặt có màu nâu sẫm.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

14	CP16	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Trametes</i> Loài: <i>Trametes</i> sp. Thể quả to vừa, không cuống, chất bần. Đường kính tán 5-14cm x 7-25cm, dày 0,5-2,5cm, hình bán nguyệt, phẳng; bề mặt có lông xám nhạt. Mô nấm màu trắng. Ống nấm một tầng, màu gần trắng, dài 1mm.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ
15	CP18	Bộ: Hypocreomycetidae Họ: Cordycipitaceae Chi: <i>Lecanicillium</i> Loài: <i>L. fungicola</i> Thể quả vừa kích thước 3-7 cm; hình trứng đến hình chuông, màu trắng đến màu trắng đục. Mô nấm màu trắng. Phiến nấm màu trắng xám. Cuống nấm ngắn hoặc không có cuống.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ
16	CP19	Bộ: Agaricales Họ: Entolomataceae Chi: <i>Clitopilus</i> Loài: <i>C. prunulus</i> Phần mũ nấm ban đầu sẽ lồi khi còn nhỏ và phẳng		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ

		ra khi trưởng thành, có lỗm ở giữa. Mũ nấm thường có màu trắng, ngoài ra còn có màu xám hoặc vàng. Kích thước từ 2-10cm. Phần cuống có chiều dài 2-18cm và dày 4-15mm, có màu trắng, xám hoặc vàng.		
17	CP21	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Trametes</i> Loài: <i>Trametes</i> sp. Thể quả to vừa, không cuống, chất bần. Đường kính tán 5-14cm x 7-25cm, dày 0,5-2,5cm, hình bán nguyệt, phẳng; bề mặt có lông xám nhạt. Mô nấm màu trắng. Ống nấm một tầng, màu gần trắng, dài 1mm. Lỗ nấm màu trắng, dạng ngoằn ngoèo bức xạ.	 	Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
18	CP22	Bộ: Agaricales Họ: Psathyrellaceae Chi: <i>Candolleomyces</i> Loài: <i>Candolleomyces eurysporus</i> Mũ nấm lúc non có dạng hình chuông hoặc hình		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

		bán cầu, sau đó mở rộng gần như phẳng hoặc hơi lõm ở trung tâm, với đường kính từ 2–5 cm. Bề mặt mũ màu trắng ngà đến nâu nhạt, thường xuất hiện các vân hoặc vết nứt theo hướng tâm, mép mũ dễ rách và có tua nhỏ khi trưởng thành. Cuống nấm thanh mảnh, rỗng, dài khoảng 5–10 cm, màu trắng, không có vòng cuống. Bào tử đảm có dạng elip hoặc hình trứng phình rộng $[5.5-7,0 \times 4-5(-6) \mu\text{m}]$, không thấy vùng lỗ nảy mầm (germ pore). Liệt bào đỉnh (cheilocystidia) dạng túi hoặc trùy, liệt bào cuống dị hình, không có liệt bào cạnh (pleurocystidia) và liệt bào mũ (pileocystidia).		
19	CP23	Bộ: Hymenochaetales Họ: Hymernochaetaceae Chi: Inonotus Loài: <i>I. substygius</i> Thể quả nhỏ, tán nấm rộng 2 x 2-10cm, dày 2-4 mm, màu nâu hổ phách	 	Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

		đến thuốc lá, dạng mái ngói, có lông mịn vân vòng dày. Mô nấm dày 1-2mm, màu nâu gỉ. Ống nấm dài 1-2mm. Lỗ ống nấm hình tròn, có 6-7 lỗ/mm. Nhiều lông cứng, hình gai nhọn dài 20-30µm, gốc rộng 2-7µm.		
20	CP24	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Coriolus</i> Loài: <i>C. unicolor</i> Thể quả nhỏ, đường kính tán 4-8cm, dày 0,5cm, hình quạt, vỏ hén hoặc trái, uốn ngược; chất da, tán nối liền nhau. Bề mặt màu trắng và nâu nhạt, mép mỏng, dạng sóng. Mô nấm màu trắng, dày 0,1cm. Nấm không có cuống, ống nấm màu trắng xám, lỗ ống nấm dạng ngoằn ngoèo. Mọc trên gốc chặt cây khô, cây đổ.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ
21	CP25	Bộ: Polyporales Họ: Fomitopsidaceae Chi: <i>Fomitopsis</i> Loài: <i>F. feei</i>		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ

		Quả thể nấm khá dày 0,5-2cm. Mặt trên có màu nâu hoặc nâu đỏ, mặt dưới có màu trắng. Bề mặt phía trên nhẵn với đường kính 2-5cm. Cuống ngắn 1-2cm.		
22	CP26	Bộ: Polyporates Họ: Ganodermataceae Chi: Ganoderma Loài: <i>G. oroflavum</i> Thể quả to, không cuống, chất bần đến chất gỗ. Tán nấm dày 1,5-3cm, hình bán nguyệt, màu nâu gỉ đến nâu. Bề mặt lõi lõm không đều, có vân vòng đồng tâm. Ống nấm màu trắng vàng, có khi màu nâu. Miệng ống nấm hình tròn, có 3-5 lỗ/mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng. Gây mục trắng.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
23	CP27	Bộ: Polyporates Họ: Polyporaceae Chi: Tyromyces Loài: <i>Tyromyces</i> sp. Thể quả nhỏ, tán nấm rộng 2-3 x 2-5cm, dày 1-2,5cm; hình vó ngựa; màu trắng hoặc vàng nhạt; bề		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

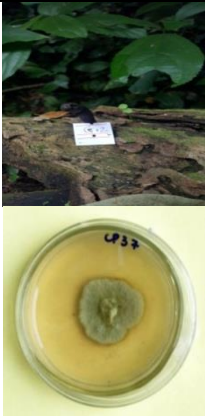
		mặt không có vân vòng, mép sắc uốn cong. Không có cuống. Ống nấm màu trắng, dài 3-10mm, lỗ ống nấm hình nhiều cạnh màu trắng và vàng nhạt, có 3-5 lỗ/mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng và lá kim. ạnh màu trắng và vàng nhạt, có 3-5 lỗ/mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng và lá kim.		
24	CP28	Bộ: Agaricales Họ: Mycenaceae Chi: <i>Mycena</i> Loài: <i>M. galericulata</i> Quả thể nhỏ, đường kính 2-4cm, hình chuông màu nâu nhạt. Cuống nấm dài 8-12cm, rộng 0,2-0,5cm, hình ống màu trắng đục, rỗng và gốc có lông tơ màu trắng.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
25	CP29	Bộ: Agaricales Họ: Schizophyllaceae Chi: <i>Schizophyllum</i> Loài: <i>S. commune</i> Quả thể kích thước 2-8cm, hình lồi hay dạng ống nông, thường uốn cong ở mép; màu sắc đa		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

		dạng, từ vàng cam tới vàng nâu hay nâu đen. Cuống 20-100 x 5-20 mm, thường rộng hơn về phía gốc và tròn trịa và có màu vàng. Nấm mọc rời, hoặc đám trên mặt đất hay cây gỗ.		
26	CP30	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Hexagonia</i> Loài: <i>Hexagonia</i> sp. Thể quả không cuống, tán rộng 2-13 x 4-12cm, dày 0,4-1cm; hình bán nguyệt, dẹt, cứng, chất bần; gốc màu xám đen, phía mép màu nâu gỉ. Có vân nổi dạng bức xạ và vân vòng không rõ. Trên tán có lông thô, mép mỏng. Mô nấm màu nâu sẫm dày khoảng 0,2cm. Lỗ ống nấm to dạng tổ ong, có 3-4 lỗ/cm. Mọc trên cành cây lá rộng.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ
27	CP31	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Tyromyces</i> Loài: <i>T. Lacteus</i> Thể quả nhỏ, tán rộng 2-		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ

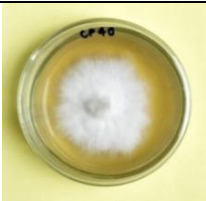
		5cm, dày 1-2,5 cm, hình vó ngựa hay tam giác. Màu trắng hoặc vàng nhạt. Ống nấm màu trắng, dài 0,3-1 cm, lỗ ống nấm hình nhiều cạnh màu trắng hoặc vàng nhạt, có 3-5 lỗ/mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng và lá kim.		
28	CP32	Bộ: Polyporales Họ: Ganodermataceae Chi: Ganoderma Loài: <i>G. applanatum</i> Thể quả rất lớn, không cuống hoặc gần như không cuống. Đường kính tán nấm 5-35 x 10-50cm, dày 1-12cm; hình bán nguyệt, hình bán cầu dẹt; bề mặt màu xám; có vân vòng đồng tâm, mép mỏng. Mô nấm màu hạt dẻ nhạt hoặc màu nâu sẫm. Lỗ nấm hình tròn, có 4-5 lỗ/mm. Mọc trên cây khô, cây đổ cây lá rộng.	 	Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
29	CP33	Bộ: Agaricales Họ: Marasmiaceae Chi: <i>Campanella</i> Loài: <i>C. junghuhnii</i>		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

		Quả thể mọc đám nhỏ, đường kính tán nấm 0,5-2,5cm, màu trắng. Phiến nấm màu trắng có vân dạng bức xạ. Cuống nấm ngắn, mọc bên, bào tử hình bầu dục. Nấm mọc trên gỗ và tre trúc.		
30	CP34	Bộ: Agaricales Họ: Marasmiaceae Chi: <i>Lentinula</i> Loài: <i>L. edodes</i> Hình dạng như cái ô, đường kính 4–10cm, màu nâu nhạt, khi chín chuyển thành nâu sậm. Nấm hương có một chân dính vào giữa tai nấm. Mặt trên tai nấm màu nâu, mặt dưới có nhiều bản mỏng xếp lại. Trên mặt nấm có những vảy nhỏ màu trắng. Thịt nấm màu trắng, cuống hình trụ. Nấm mọc ký sinh trên những cây có lá to và thay lá mỗi mùa như dẻ, sồi, phong.	 	Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
31	CP35	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Tyromyces</i> Loài: <i>T. lacteus</i>		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

		Thể quả nhỏ, tán nấm rộng 2-3 x 2-5cm, dày 1-2,5cm; hình vó ngựa; màu trắng hoặc vàng nhạt; bề mặt không có vân vòng, móc uốn cong. Không có cuống. Ống nấm màu trắng, dài 3-10mm, lỗ ống nấm hình nhiều cạnh màu trắng và vàng nhạt, có 3-5 lỗ/mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng và lá kim.		
32	CP36	Bộ: Agaricomycetes Họ: Polyporaceae Chi: Ganoderma Loài: Ganoderma sp. Quả thể một năm tới nhiều năm, có cuống, lie-gỗ, mũ dạng quạt, kích thước 3-11 x 5-14 x 2-4 cm. Cuống ngắn và dày 1-3cm, hình chữ Y, dày lên ở gốc, đồng màu với mũ. Mặt mũ được tạo thành từ sợi nguyên thủy vách mỏng trong suốt và sợi cứng màu nâu vách dày kết lại với nhau, sợi nguyên thủy hơi nhạt, phân nhánh, đôi khi căng phòng và có hình bán cầu ở phần tận cùng, đường		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'52.28''Đ

		kính 4,5-6cm, phân nhánh, dài 80-100 μm; đường kính 4-7,5 μm. Hệ sợi nấm: sợi nguyên thủy trong suốt hay nâu vàng nhạt, vách mỏng, có vách ngăn, đường kính 2-4 μm; sợi cứng có màu nâu đỏ, vách dày, đặc, dạng cây, kim, trục chính của sợi cứng đường kính 2-3 μm.		
33	CP37	Bộ: Xylariales Họ: Xylariaceae Chi: Xylaria Loài: X. Polymorpha Quả thể cao 3-10cm, ngang tới 2,5cm; dai chắc và có hình dạng chày hay dạng ngón tay và thường dạng dẹt có đầu tròn. Màu đen, bề mặt nổi cục nhỏ. Cùi nấm trắng.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
34	CP38	Bộ: Russulales Họ: Hericiaceae Chi: Hericium Loài: H. erinaceus Quả thể thường hình cầu hoặc hình elip, mọc riêng rẽ hoặc thành chùm, có tua nấm dày đặc, rũ xuống như đầu khi, lúc		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

		già tua dài và chuyển sang màu vàng trông như bờm sư tử. Quả thể khi non có màu trắng đến trắng ngà, thịt màu trắng, khi già nấm ngả sang màu vàng đến vàng sậm, các tua nấm chính là lớp bào tử, dài từ 0,5–3 cm, trên bề mặt tua có các túi đảm màu trắng mang bào tử đảm hình cầu, giữa bào tử có một giọt nội chất tròn.		
35	CP39	Bộ: Agaricales Họ: Physalacriaceae Chi: <i>Flammulina</i> Loài: <i>Flammulina</i> sp. Thể quả vừa, tán nấm rộng 2-3 x 2-5cm, dày 1-2,5cm; hình tròn; màu cam; bề mặt không có vân vòng, nhẵn, móc uốn cong. Ống nấm màu cam, dài 10-30mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng và lá kim.		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ
36	CP40	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Hexagonia</i> Loài: <i>Hexagonia</i> sp. Thể quả hình bán nguyệt,		Cúc Phương, Ninh Bình: 20°29'35.00''B, 105°66'75.28''Đ

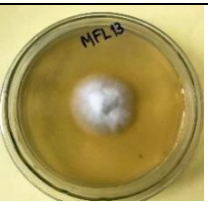
		đường kính 4–6 cm, màu nâu nhạt, khi chín chuyển thành nâu sậm. Viên tai nấm màu nâu nhạt, mặt dưới có nhiều bản mỏng xếp lại. Thịt nấm màu trắng, nấm mọc ký sinh trên những cây có lá to và thay lá mỗi mùa như dẻ, sồi, phong.		
37	MPN9	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Tyromyces</i> Loài: <i>Tyromyces</i> sp. Thể quả nhỏ, tán nấm rộng 2-3 x 2-5cm, dày 1-2,5cm; hình vó ngựa; màu trắng hoặc vàng nhạt; bề mặt không có vân vòng, móc sắt uốn cong. Không có cuống. Ống nấm màu trắng, dài 3-10mm, lỗ ống nấm hình nhiều cạnh màu trắng và vàng nhạt, có 3-5 lỗ/mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng và lá kim.	 	Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ
38	MPN10	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Trametes</i> Loài: <i>Trametes</i> sp. Thể quả mọc thành đám,		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ

		dạng lợp ngói, không cuống, tán mỏng, nhỏ 3 x 5cm dày 0,6cm hình bán nguyệt; chất da, màu vàng hồng hoặc đỏ cam, sau nhạt dần thành trắng, không có lông, có vân vòng, mép mỏng sắc. Mô nấm màu trắng, ống nấm dài, miệng ống nấm 1-3 lỗ/mm. Mọc trên gỗ mục cây lá rộng.		
39	MPN11	Bộ: Agaricales Họ: Strophariaceae Chi: Agrocyb Loài: <i>A. chaxingu</i> Quả thể dài 5-10cm. Mũ lồi, màu nâu ở giữa và trắng dần về viền, đường kính 1-2cm. Cuống trắng, dài 4-6cm.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"E
40	MPN12	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: Lentinus Loài: <i>L. squarrosulus</i> Mũ nấm có hình tròn hoặc hơi méo, đường kính từ 3–10 cm, bề mặt khô, màu trắng đến trắng ngà hoặc hơi nâu nhạt, được bao phủ bởi các vảy nhỏ, xù xì. Mép mũ thường		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"E

		cong xuống ở giai đoạn non và trở nên phẳng hơn khi trưởng thành. Phiến nấm dày, màu trắng, gắn chặt vào cuống và không đổi màu khi chạm vào. Cuống nấm trung tâm hoặc hơi lệch, dài 3–8 cm, chắc và có bề mặt tương tự mũ, cũng phủ các vảy nhỏ. Bào tử của có hình trụ đến hình elip hẹp, kích thước dao động trong khoảng $6-9 \times 2,5-4 \mu\text{m}$. Bào tử mỏng thành, không màu (hyaline) và không có vách ngăn (non-septate). Bề mặt bào tử trơn nhẵn, không có gai hay vân.		
41	MPN15	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Lentinus</i> Loài: <i>L. squarrosulus</i> Mũ của loại nấm này lồi, phía sau phẳng và hình phễu, dai, màu trắng trở nên kem nhạt màu trắng đục theo tuổi với các vảy nhỏ, màu nhạt đến nâu sẫm, dày đặc hơn ở trung tâm ngày càng nhỏ và lan		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"E

		dần về phía rìa và rìa. mỏng, gợn sóng và phân chia theo độ tuổi. Các mang có màu kem đến kem sẫm, đông đúc và rụng trong khi phần mang có nhiều hoặc ít lệch tâm, màu trắng, xơ và được bao phủ bởi các vảy mịn hướng xuống phía gốc đột ngột. Loại nấm này có thịt màu trắng và dai. Nó thường được tìm thấy mọc thành từng chùm trên gỗ và gốc cây đã chết trong rừng và ngoài trời. chùm trên gỗ và gốc cây đã chết trong rừng và ngoài trời.		
42	MPN18	Bộ: Agaricales Họ: Pleurotaceae Chi: <i>Pleurotus</i> Loài: <i>pulmonarius</i> Thân quả thể dạng phiến điển hình với mũ lồi, màu trắng khi non và dần ngả vàng theo tuổi. Mũ nấm có kích thước trung bình từ 5–15 cm, bề mặt trơn, mép có thể hơi gợn sóng khi trưởng thành. Cuống nấm dài khoảng 5–20 cm,	 The image shows two dried mushrooms at the top, a petri dish with a yellowish culture in the middle, and a petri dish with a white culture at the bottom. The petri dishes are labeled 'MPN18' and 'MPN19'.	Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"E

		thường mọc lệch, màu trắng đến vàng nhạt, mềm khi non và dai hơn khi già. Phiến nấm gắn trực tiếp vào cuống hoặc kéo dài xuống cuống, màu trắng hoặc kem, dày và xếp sát nhau. Thịt nấm mềm, màu trắng ngà, không có mùi đặc trưng rõ rệt. Hệ sợi của loài này thuộc loại đơn giản (monomitic), gồm các sợi sinh dưỡng có vách ngăn, phân nhánh và đôi khi có kẹp nối. Bào tử hình bầu dục đến elip, không màu, kích thước khoảng 7–10 x 3–5 μm.		
43	MPN22	Bộ: Polyporales Họ: Ganodermataceae Chi: <i>Haddowia</i> Loài: <i>Haddowia</i> sp. Thể quả nhỏ, cuống ngắn. Đường kính tán nấm 2-5 x 1-5cm, dày 1-2cm, bề mặt màu nâu; có vân vòng đồng tâm, mép mỏng. Mô nấm màu trắng. Lỗ nấm hình tròn, có 4-5 lỗ/mm. Mọc trên cây khô, cây đổ cây lá rộng.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"E

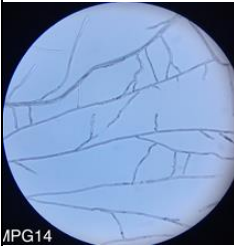
44	MPL8	Bộ: Agaricales Họ: Marasmiaceae Chi: <i>Marasmius</i> Loài: <i>M. maximus</i> Tán nấm to vừa, đường kính tán 3-10cm, lúc đầu hình chuông sau hình bán cầu; màu nâu hồng nhạt đến màu vàng đất nhạt, ở giữa sẫm hơn. Phiến nấm cùng màu với tán nấm, mọc rời, thưa. Cuống dài 5-10cm, rộng 0,2-0,4cm; bề mặt có vân sọc. Thể dạng túi hình thoi. Mọc trên cành lá khô rụng.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ
45	MPL13	Bộ: Xylariales Họ: Xylariaceae Chi: <i>Xylaria</i> Loài: <i>Xylaria</i> sp. Chất đệm mọc thành cụm, không phân nhánh, bên trong màu trắng; hình ống tròn, đỉnh nhọn; dài 5-25cm, rộng 1,5-2mm. Cuống dài ngắn không đều nhau, gốc có lông. Vỏ túi hình cầu vùi trong chất đệm, đường kính 0,4mm. Túi hình ống, cỡ 100-120 x 6µm. Mọc trên gỗ mục		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ

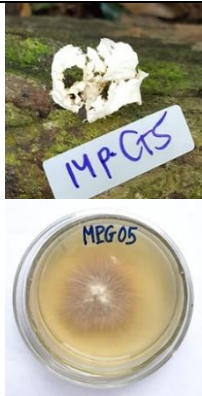
		và quả.		
46	MPL14	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Poria</i> Loài: <i>Poria</i> sp. Thể quả trái, dính chặt giá thể, luôn nổi thành đám, đường kính trên 10cm, dày 0,1-1,2cm; bề mặt màu trắng. Mô nấm màu trắng, thể dày. Ống nấm hoàn chỉnh hoặc dạng gai, ngắn, khoảng 1mm, có 4-5 lỗ/mm; phần lớn lỗ bị nứt ra thành dạng ngoằn ngoèo. Mọc trên gỗ mục, gốc chặt cây lá rộng.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ
47	MPL15	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Lentinus</i> Loài: <i>L. squarrosulus</i> Mũ của loại nấm này lồi, phía sau phẳng và hình phễu, dai, màu trắng trở nên kem nhạt màu trắng đục theo tuổi với các vảy nhỏ, màu nhạt đến nâu sẫm, dày đặc hơn ở trung tâm ngày càng nhỏ và lan dần về phía rìa và rìa mỏng, gợn sóng và phân		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ

		chia theo độ tuổi. Các mang có màu kem đến kem sẫm, đông đúc và rụng trong khi phần mang có nhiều hoặc ít lệch tâm, màu trắng, xơ và được bao phủ bởi các vảy mịn hướng xuống phía gốc đột ngột. Loại nấm này có thịt màu trắng và dai. Nó thường được tìm thấy mọc thành từng chùm trên gỗ và gốc cây đã chết trong rừng và ngoài trời. chùm trên gỗ và gốc cây đã chết trong rừng và ngoài trời.		
48	MPL17	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Trametes</i> Loài: <i>Trametes</i> sp. Mũ nấm kích thước 2-8 x 3-15cm, dày 13- 20mm, dạng quạt xẻ thùy vắn hợp vào nhau, phủ lông nhung thô, màu nâu vàng da bò. Thịt nấm màu vàng nhạt, dày 3-15mm. Ống nấm to 2-3 ống/mm. Nấm mọc hoại sinh hoặc ký sinh trên cây gỗ lá rộng.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ

49	MPL21	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Trametes</i> Loài: <i>Trametes</i> sp. Thể quả vừa đến to, tán nấm 3,5-10 x 4-17cm dày 0,5-1,2cm; hình bán nguyệt, màu trắng; có u nhỏ và vân vòng không rõ, mép mỏng. Mô nấm màu trắng, dày 0,15-0,8cm. Ống nấm cùng màu với tán nấm, dài 2-5mm. Lỗ ống nấm dạng ngoằn ngoèo, rộng 0,3-0,5mm. Mọc trên cây gỗ mục lá rộng.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ
50	MPL25	Bộ: Xylariales Họ: Xylariaceae Chi: <i>Xylaria</i> Loài: <i>X. Longipes</i> Thể quả hình dạng giống gậy bóng chày cao khoảng 2-8 cm, đỉnh tròn. màu đen, bề mặt có vết nứt và vảy ; cuống thường tương đối dài, nhưng cũng có thể ngắn hoặc gần như không có. Mọc trên thân và nhánh cây gỗ mục, gây mục mềm.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ

51	MPL29	Bộ: Polyporales Họ: Ganodermataceae Chi: <i>Ganoderma</i> Lài: <i>G. australe</i> Quả thể nấm kích thước 25 x 25cm, với mép xanh và có màu nâu sẫm ở mặt dưới. Lóp ống màu trắng và phủ dày lên diện tích quả thể.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ
52	MPG8	Bộ: Polyporales Họ: Polyporaceae Chi: <i>Lentinus</i> Loài: <i>L. Squarrosulus</i> Thể quả to, đường kính tán 5-8 cm, dày 0,5-1,2 cm, hình bán nguyệt, dẹt, bề mặt màu vàng nâu nhạt, không có cuống. Mô nấm chất bần, ống nấm cùng màu với mô nấm. Lỗ ống nấm màu xám khói hoặc xanh nâu có 3 lỗ/mm, mọc trên cây keo.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ
53	MPG12	Bộ: Polyporales Họ: Ganodermataceae Chi: <i>Haddowia</i> Loài: <i>Haddowia</i> sp. Quả thể có cuống ngắn, dày. Mặt trên lõm có đường kính 2-6cm, có các		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ

		vân màu nâu vàng và vàng xen kẽ thành hình tròn dần vào tâm. h hình tròn dần vào tâm.		
54	MPG14	Bộ: Agaricales Họ: Psathyrellaceae Chi: Coprinellus Loài: <i>C.aureogranulatus</i> Quả thể nhỏ, mảnh mai, với đặc điểm nổi bật là mũ phủ lớp hạt màu vàng ánh kim khi còn non. Mũ nấm hình chuông hoặc hình bầu dục thuôn dài lúc non, sau đó mở rộng dần, đường kính chỉ khoảng 1–2 cm. Bề mặt mũ có các hạt nhỏ màu vàng óng (aureogranules), tạo vẻ óng ánh đặc trưng – đây là dấu hiệu nhận biết quan trọng của loài. Cuống nấm thanh mảnh, màu trắng, có thể dài từ 4–8 cm, rỗng bên trong và không có vòng cuống. Bào tử hình elip đến hạt đậu, màu nâu sẫm, kích thước khoảng 10–12 x 6–7 μm, có thành dày và thường có lỗ mầm. Đây là	  	Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"E

		loài nấm có hình thái đẹp, mọc chủ yếu trên gỗ mục hoặc mùn hữu cơ trong môi trường ẩm.		
55	MPG04	Bộ: Agaricales Họ: Schizophyllaceae Chi: <i>Schizophyllum</i> Loài: <i>S. commune</i> Thể quả vừa đến to, tán nấm 3,3-8 x 4-17cm dày 0,3-1,0cm; hình bán nguyệt, màu trắng; có vân vòng không rõ, mép mỏng. Mô nấm màu trắng, dày 0,15-0,8cm. Ống nấm cùng màu với tán nấm, dài 2-5mm. Mọc trên cây gỗ mục lá rộng.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ
56	MPG05	Bộ: Agaricales Họ: Schizophyllaceae Chi: <i>Schizophyllum</i> Loài: <i>S. commune</i> Quả thể nấm kích thước 5 x 15cm, với mép trắng và có màu nâu sẫm ở mặt dưới. Lóp ống màu trắng và phủ dày lên diện tích quả thể.		Mường Phăng, Điện Biên: 21°26'25.0"B, 103°06'11.8"Đ

PL2. Trình tự vùng gen ITS của các chủng nấm chọn lọc.

>MPN12

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTTTGAAACG
GGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCAC
TCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGGAGCTTCGAAAGCGA
GAAAGGGGGCCTTCACGGGCTTTTTCTTGCCTAGTTGTTACTGGGCC
TACGTTTCACTACAAACACTTATAAAGTATCAGAATGTGTATTGCG
ATGTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTC
TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTC
CTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATTCTC
AACCTAACGGGTCTTAACGGGACTTGCTTAGGCTTGGACTTGGAG
GTTCTTGTGCGGCTTGCTTCAATGTCAGGTCGGCTCCTCTCAAATGC
ATTAGCTTGGTTCCTGTGCGGATCGGCTCACGGTGTGATAATTGTC
TACGCCGCGACCGTTGAAGCGTTTTATAGGCCAGCTTCTAGTCGTC
TCTTTACGAGACAATAATCATCGAACTCTGACCTCAAATCAGGTAG
GACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

>MPN18

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
GTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATGAATTCCTATGGAGTTGTTG
CTGGCCTCTAGGGGCGATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACC
TGTGAACCTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCAGA
CTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGTGTGACAACGCAGTCTA
TTTACTTAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATG
GGCCTTGTGCCTATAAACCATAATAACAACCTTCAACAACGGATCTC
TTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCT
TGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCGATGCCTGTTTGAGTGTCATTA
AATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTT
GCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTT
CTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGC
ACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTT

GACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG
CATATCAATAAGCGG

>MPG14

TTCCCTTTAGGGGTGACTGCGGAAGGATCATTAACGAATAACTATG
GTGGGCTGTCGCTGCCTCTTCGGAGGAATGTGCACGTCCACCATT
TTATCTATCCACCTGTGCACCGACTGTAGGTCTGGATAACTCTCGT
CTTCACCTCGCAAGGGGCTGTTGGCGGATGCGAGGATTGCTCTCTC
GGGCGCTCTCCTCGAATTTCCAGGTCTACGTCTTTTACACACCCCA
AAAGTATGATATAGAATGTAGTCAATGGGCTTCTCAGCCTATAAA
ACACTATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTC
CGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAAATTCTCAACCTCACCC
ATTTTCTGAATGGGACCGAGGCTTGGATGTGGGGGTTTGTGCAGGC
TGCCTTCTTGTGCGGTCTGCTCCCCTGAAATGCATTAGCGAGTTCA
TACTGAACTTCCGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGAC
GAGGTTTAGACTTGCTTCTAACCGTCCGCAAGGACAATACCTTGAC
AATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCATAAAGCCGGAAGGAAA

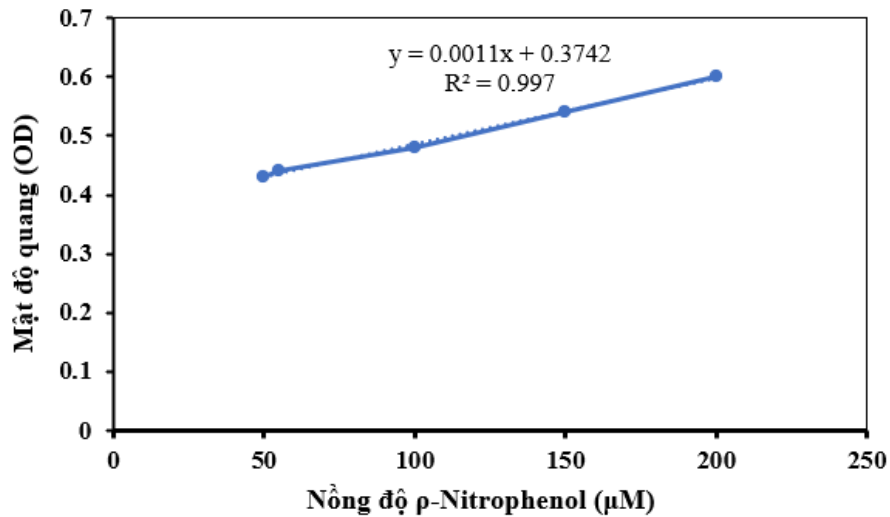
>CP22

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
GTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAATATCTATGGCGTTGGTT
GTAGCTGGCTTCTAGGAGCATTTGTGCACACCCGTCATTTATATCA
TCTTTCCACCTGTGAACTATGTGTAGATCTGGATACCTCTCGCTTTG
GTGACAAGGCGGATGCAAGGATTGCCTCCTCGGCTCTCTTTGAATT
TCCAGGTCTATGTTTTTTTACACACTCCATTTGAATGATGTAGAATG
TAGTCAATGGGCTTTCAAGCCTATAAAAAAACTATACAACTTTCAGC
AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTG
AGTGTCATTAAATTCTCAACCTCACCAAGTTTTGTAAATGAGACAGGT
GAAGGCTTGGACGTGGGGGTTTTGCAGGCTGCCTCAGTGCTGGTCT
GCTCCTCTGAAATGCATTAGCGAGCTTATACTGAGCTTCCGTCTAT

TGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGATTTGACTCGTGCTTGCTGC
 TAACCGTCTGCAAGGACAATTTACTTGACCAATTTGACCTCAAATC
 AGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG

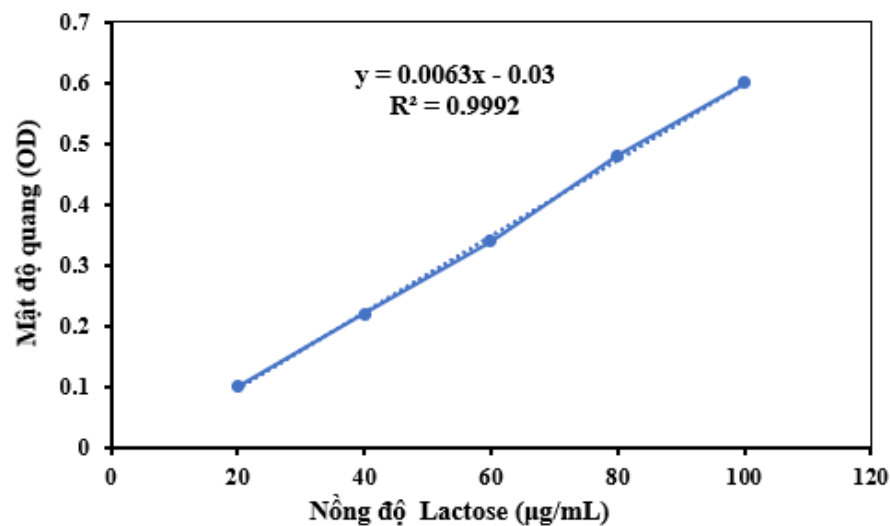
PL 3. Đường chuẩn của các enzyme protein.

(A) Acetyl esterase (EC 3.1.1.6)



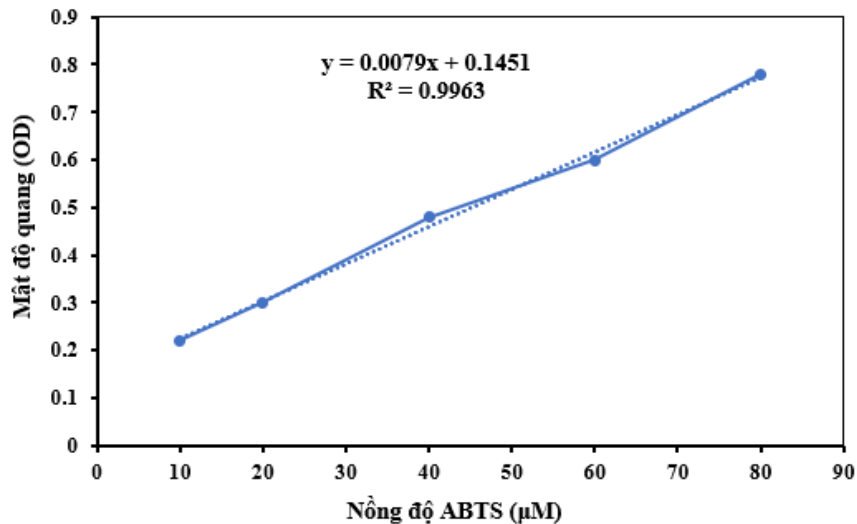
Đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ p-Nitrophenol

(B) Cellobiose dehydrogenase (EC 1.1.99.18)



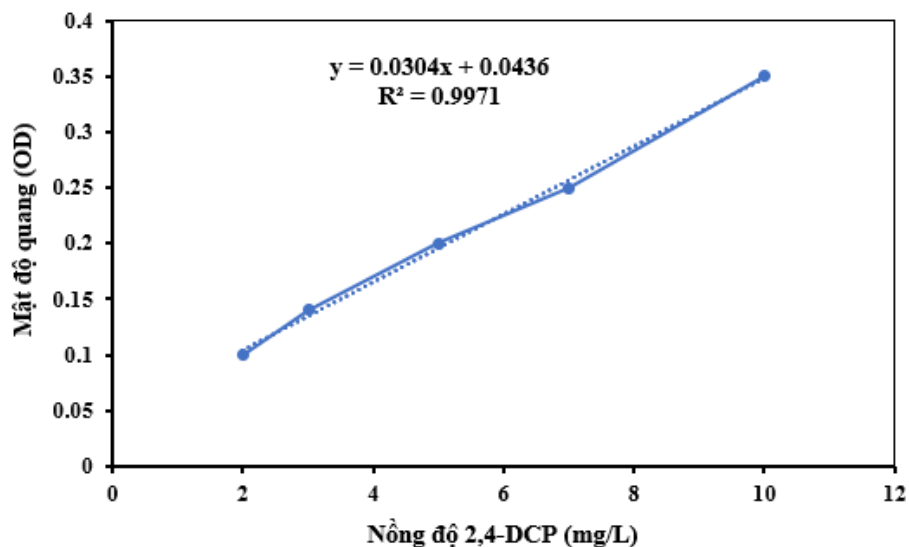
Đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ Lactose

(C) Laccase (EC 1.10.3.2)



Đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ ABTS

(D) Lignin peroxidase (EC 1.11.1.14)



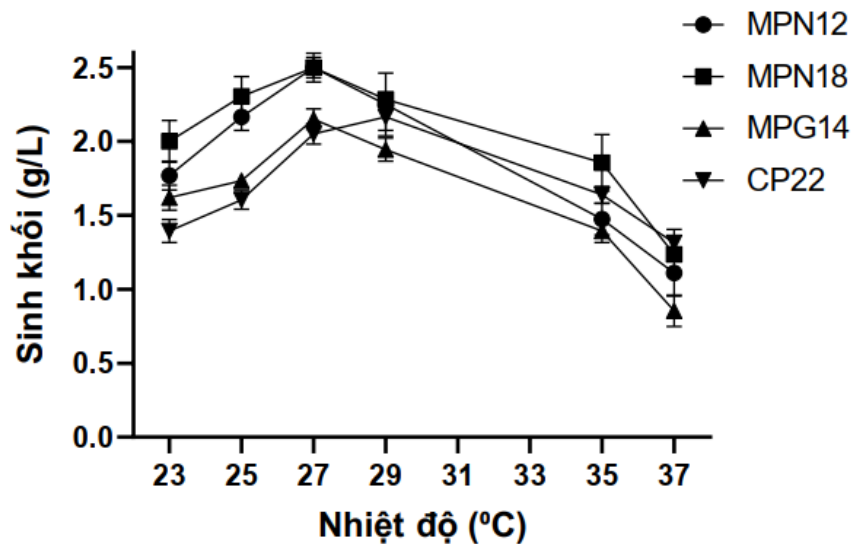
Đường chuẩn biểu thị liên hệ giữa mật độ quang và nồng độ 2,4-DCP

PL 4. Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy để thu nhận enzyme từ nấm

PL 4.1. Ảnh hưởng nhiệt độ, pH đến khả năng sinh trưởng của nấm

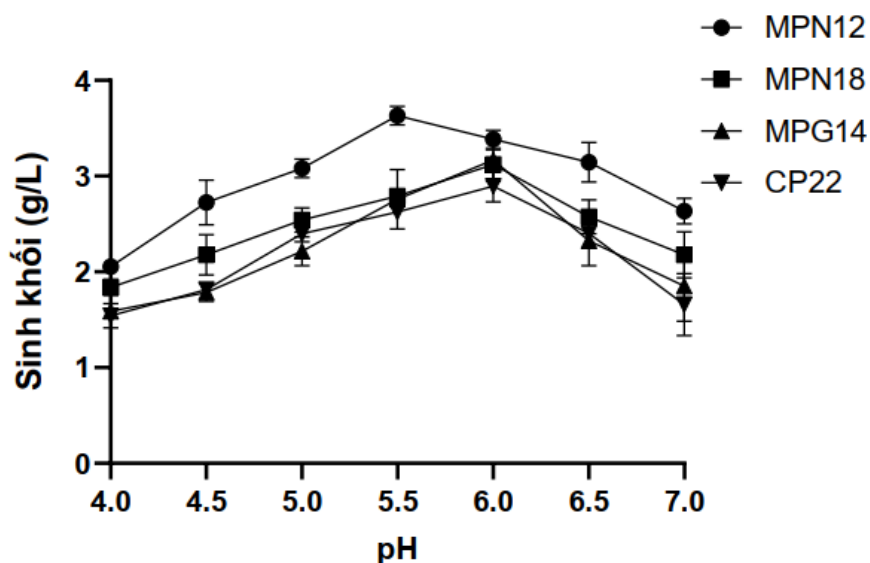
Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm, đặc biệt nhiệt độ còn ảnh hưởng đến sự phát sinh và phát triển của bào tử nấm, là giai đoạn sinh sản quan trọng của chúng. Nhiệt độ quá cao, quá trình sinh trưởng của nấm có thể bị chậm lại hoặc thậm chí ngừng hoàn toàn. Ngược lại, nếu nhiệt độ quá thấp, nấm cũng sẽ gặp khó khăn trong việc phát triển. Để xác định nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển sinh khối. Nấm được nuôi cấy trong dải nhiệt độ khác nhau từ 23 tới 37°C. Kết quả cho thấy

rằng tất các chủng nấm có khả năng sinh trưởng trong khoảng từ 23 tới 37°C. Tuy nhiên, nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của các chủng MPN12, MPN18 và MPG14 tương tự nhau ở 27°C. Trong khi đó, chủng CP22 lại phát triển tốt ở 29°C.



Ảnh hưởng nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của các chủng nấm.

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của pH tới khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm chọn. Cả 4 chủng nấm đều có khả năng sinh trưởng trong dải pH 4,0-8,0, tuy nhiên pH tối ưu cho sự sinh trưởng của các chủng nấm MPN18, MPG14 và CP22 là 6,0. Trong khi đó, chủng MPN12 sinh trưởng tốt nhất ở pH 5,5. Ở pH 4,0 và 7,0, các chủng nấm vẫn có khả năng sinh trưởng nhưng tốc độ sinh trưởng chậm hơn rõ rệt so với ở pH tối ưu.

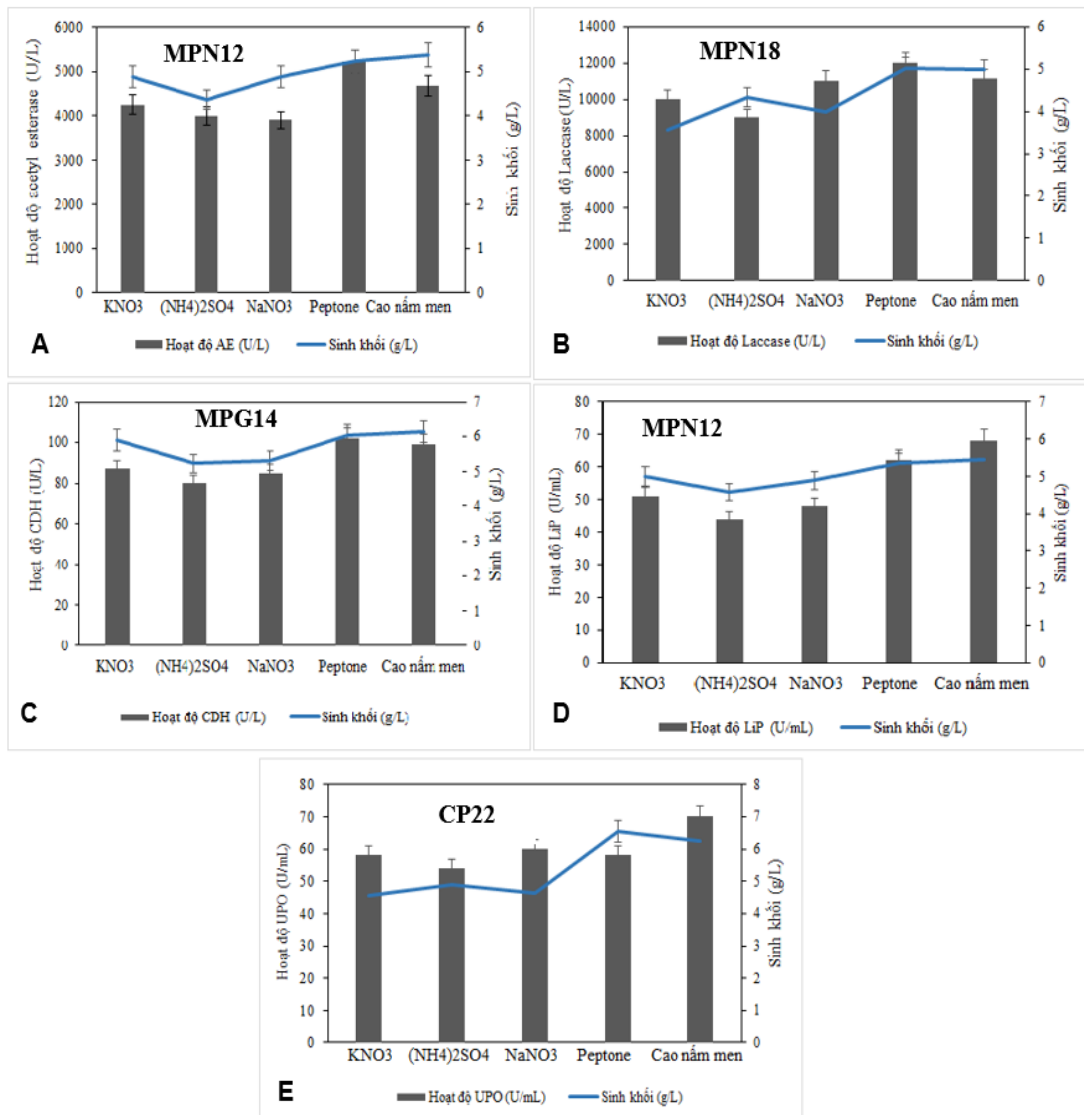


Ảnh hưởng pH đến khả năng sinh trưởng của các chủng nấm.

PL.4.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp enzyme của nấm

Để xác định nguồn nitơ thích hợp cho sự phát triển sinh khối và sinh tổng hợp enzyme của các chủng nấm, môi trường nuôi cấy đã được bổ sung các nguồn nitơ khác nhau (KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , peptone, và cao nấm men).

Kết quả thí nghiệm cho thấy, trong các môi trường có nguồn nitơ hữu cơ (peptone và cao nấm men), khả năng sinh trưởng của các chủng nấm cao hơn nhiều so với các môi trường chứa nguồn nitơ vô cơ (KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3).



Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và hoạt độ enzyme từ các chủng nấm chọn lọc.

Chủng MPN12: trong môi trường có nguồn nitơ từ peptone, hoạt độ enzyme AE cao nhất đạt 5.221,6 U/L (A). Mặc dù chủng này có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong môi trường có cao nấm men, nhưng hoạt độ enzyme AE lại không đạt mức cao nhất trong môi trường này. Ngược lại, đối với enzyme LiP, hoạt độ cao nhất của enzyme này đạt được trong môi trường có cao nấm men, với giá trị 68,5 U/mL (D). Điều này cho thấy rằng môi trường và nguồn nitơ khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh enzyme của chủng MPN12 và tùy thuộc vào loại enzyme được quan tâm.

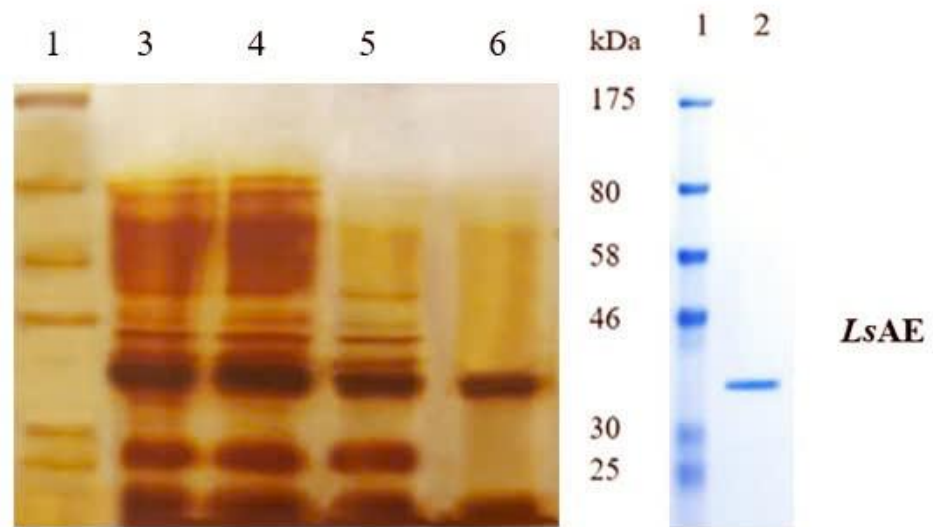
Chủng MPN18: hoạt độ enzyme laccase khi được nuôi cấy trên các loại môi trường khác nhau có khác nhau. Môi trường chứa các nguồn nitơ như peptone và cao nấm men cho sinh khối cao nhất (tương ứng 5,02 và 4,98 g/L), đồng thời hoạt độ enzyme laccase cũng đạt mức cao (12000,5 và 11112,9 U/L), cao hơn so với hoạt độ enzyme thu được từ môi trường có $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (8999,4 U/L) và KNO_3 (10009,4 U/L) (B). Do vậy, cao nấm men là nguồn nitơ thích hợp đối với chủng nấm MPN18.

Chủng MPG14: chủng này phát triển tốt trên môi trường có nguồn nitơ là cao nấm men (6,12 g/L), tuy nhiên hoạt độ enzyme CDH đạt cao nhất trên môi trường peptone (102,6 U/L). Ngược lại, khả năng sinh trưởng của chủng MPG14 trên môi trường $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,23 g/L) thấp nên hoạt độ enzyme CDH cũng thấp (80,3 U/L) (C). Do vậy, peptone là nguồn nitơ thích hợp đối với chủng nấm MPG14.

Chủng CP22: chủng này phát triển tốt trên môi trường có nguồn nitơ là peptone (6,55 g/L), tuy nhiên hoạt độ enzyme UPO đạt cao nhất trên môi trường cao nấm men (70,6 U/mL). Ở môi trường có nguồn nitơ vô cơ như KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, và NaNO_3 có hoạt độ enzyme UPO thấp hơn tương ứng đạt 58,9; 54,3; và 60,7 U/mL (E). Do vậy, cao nấm men là nguồn nitơ thích hợp đối với chủng nấm CP22.

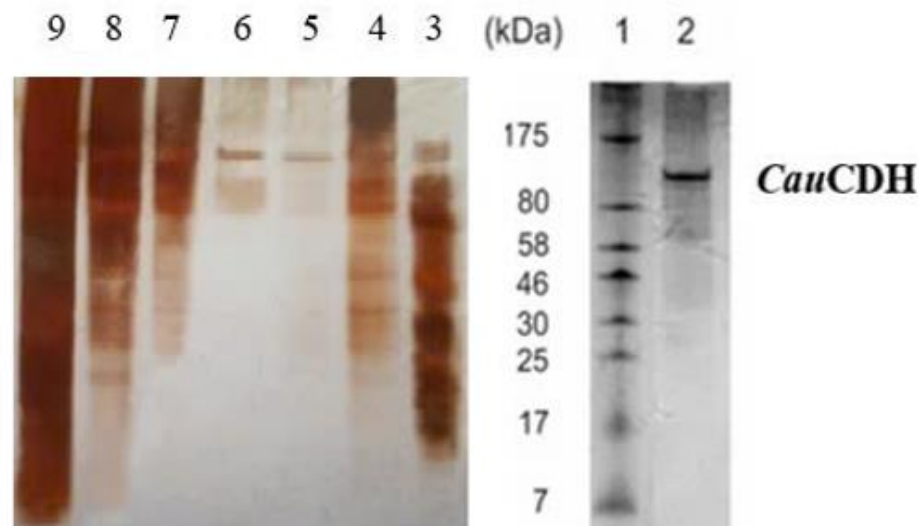
Tóm lại, ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và sinh enzyme của các chủng nấm là khác nhau, cho thấy mỗi chủng có nhu cầu dinh dưỡng đặc thù và nguồn nitơ tối ưu cũng phụ thuộc vào loại enzyme mục tiêu được quan tâm.

PL 5. Điện di đồ protein sau tinh sạch



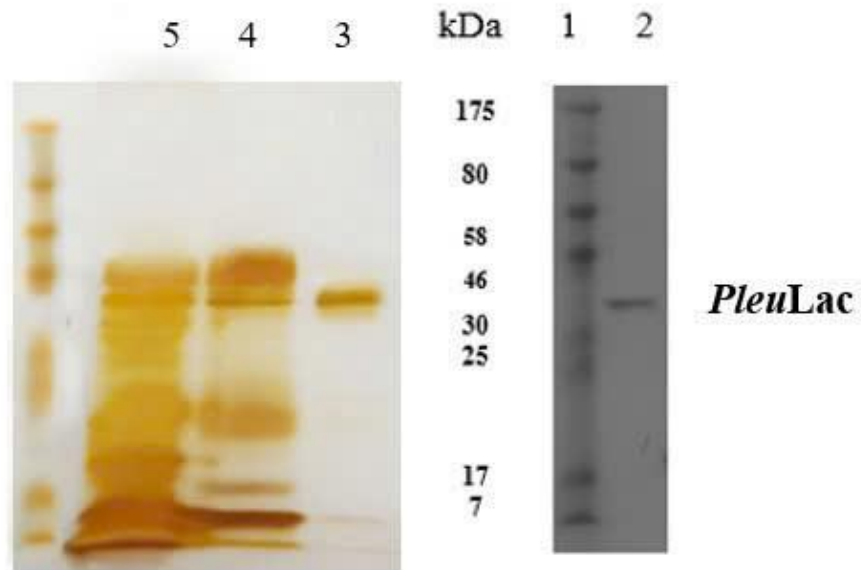
Điện di đồ protein sau tinh sạch *LsAE*

(Trong đó: (1) protein marker, (3,4,5) phân đoạn rửa giải sau cột DEAE Cellulose, (6) Phân đoạn rửa giải sau cột Sephadex G100, (2) *LsAE* tinh sạch thu được sau cột HiTrap™ Q XL.)



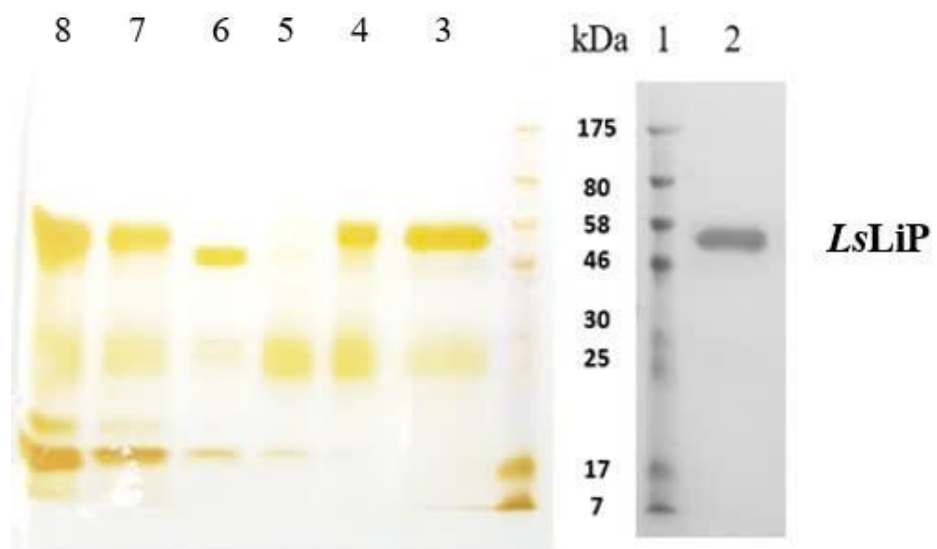
Điện di đồ protein sau tinh sạch *CauCDH*

(Trong đó, (1) protein marker, (7,8, 9) phân đoạn rửa giải sau cột DEAE Sepharose, (3-6) Phân đoạn rửa giải sau cột Superdex™ 75, (2) *CauCDH* tinh sạch thu được sau cột HiTrap™ Q FF.)



Điện di đồ protein sau tinh sạch *PleuLac*

(Trong đó, (1) protein marker, (5) phân đoạn rửa giải sau cột DEAE Cellulose, (4) phân đoạn rửa giải sau cột Sephadex G100, (3) phân đoạn rửa giải sau cột HiTrapTM Q XL, (2) *PleuLac* tinh sạch thu được sau cột HiTrapTM Q XL.)



Điện di đồ protein sau tinh sạch *LsLiP*

(Trong đó: (1) protein marker, (7,8) phân đoạn rửa giải sau cột DEAE Cellulose, (3,4,5) phân đoạn rửa giải sau cột Sephadex G100, (2) *LsLiP* tinh sạch thu được sau cột HiTrapTM Q XL.)