

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ THẢO

**NGHIÊN CỨU VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN SINH ENZYME LACCASE
NGOẠI BÀO PHÂN HỦY LIGNIN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC, VẬT LIỆU, LUYỆN KIM
VÀ MÔI TRƯỜNG**

Hà Nội – Năm 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ THẢO

**NGHIÊN CỨU VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN SINH ENZYME LACCASE
NGOẠI BÀO PHÂN HỦY LIGNIN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC, VẬT LIỆU,
LUYỆN KIM VÀ MÔI TRƯỜNG**

Ngành: KỸ THUẬT MÔI TRƯỜNG

Mã số: 8520320

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. PGS. TS. Hồ Tú Cường *HTC*
2. PGS. TS. Nguyễn Diệu Trinh *NT*

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.



Nguyễn Thị Thảo

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn thạc sĩ với đề tài: “**Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme laccase ngoại bào phân hủy lignin**”, bên cạnh những nỗ lực của bản thân, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành nhất đến quý thầy cô giáo khoa Kỹ thuật Môi trường và Năng lượng cùng Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho em trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Đặc biệt, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tới PGS.TS. Hồ Tú Cường và PGS. TS. Nguyễn Diệu Trinh. Đây là những người thầy, người cô đã tận tình truyền đạt kiến thức, định hướng khoa học và luôn sát cánh chỉ bảo, động viên em vượt qua những khó khăn trong suốt quá trình triển khai thực nghiệm và hoàn thiện luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo cùng tập thể các phòng ban thuộc Viện Công nghệ Năng lượng và Môi trường đã hỗ trợ, tạo điều kiện tốt nhất về cơ sở vật chất, trang thiết bị phòng thí nghiệm để em có thể triển khai các nội dung nghiên cứu một cách thuận lợi.

Đồng thời, tôi xin gửi lời cảm ơn đến các anh, chị và bạn bè đồng nghiệp tại Phòng Công nghệ sinh học đã nhiệt tình hỗ trợ, chia sẻ kinh nghiệm và giúp đỡ em trong việc phân tích các số liệu thực nghiệm cần thiết để bài luận văn được hoàn thiện tốt nhất.

Quá trình thực hiện luận văn thạc sĩ không chỉ giúp tôi tích lũy thêm những kiến thức chuyên môn quý báu về vi sinh vật học mà còn mang lại cho tôi những trải nghiệm thực tiễn vô cùng hữu ích. Những bài học về sự kiên trì và tư duy khoa học sẽ là hành trang quan trọng cho công việc và sự nghiệp của tôi sau này.

Dù đã dành nhiều tâm huyết và cố gắng, song bản luận văn khó tránh khỏi những thiếu sót nhất định. Tôi rất mong nhận được những ý kiến đóng góp, chỉ bảo quý báu từ quý thầy cô trong Hội đồng khoa học và các bạn đồng nghiệp để công trình nghiên cứu được hoàn thiện hơn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 26 tháng 6 năm 2026

Học viên thực hiện


Nguyễn Thị Thảo

Mục lục

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
Mục lục	iii
Danh mục các ký hiệu, các chữ cái viết tắt	v
Danh mục các hình vẽ, đồ thị	vii
MỞ ĐẦU	1
1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI	1
2. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU	2
3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	2
4. CƠ SỞ KHOA HỌC VÀ TÍNH THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI	3
4.1. Cơ sở khoa học	3
4.2. Tính thực tiễn	4
5. NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA LUẬN VĂN	4
NỘI DUNG	5
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	5
1.1. GIỚI THIỆU VỀ LIGNIN	5
1.2. LACCASE	8
1.2.1. Giới thiệu chung về Laccase	8
1.2.2. Nguồn gốc laccase trong tự nhiên	8
1.2.3. Phân loại	9
1.2.4. Tính chất của enzyme laccase	9
1.2.5. Cấu trúc phân tử và trung tâm hoạt động của laccase	9
1.2.6. Hệ thống laccase-mediator (LMS) và vai trò trong phân hủy lignin	11
1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp và hoạt tính laccase	12
1.3.1. Ảnh hưởng của nguồn carbon	12
1.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ	13
1.3.3. Ảnh hưởng của ion kim loại	14
1.3.4. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ	14
1.4. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam	16
1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	16
1.4.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	18
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	21
2.1.1. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu	21
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất	21
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.2.1. Thu thập mẫu đất	22
2.2.2. Làm giàu vi khuẩn	22
2.2.3. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn sinh enzyme phân giải lignin (laccase)	22
2.2.4. Xác định hoạt tính enzyme laccase	23

2.2.5. Xác định đặc điểm hình thái và hóa sinh của chủng vi khuẩn chọn lọc.....	24
2.2.6. Định danh chủng vi khuẩn bằng phương pháp phân tích trình tự 16S rRNA.....	25
2.2.7. Tối ưu hóa các điều kiện ảnh hưởng đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (guaiacol).....	25
2.2.8. Khả năng phân hủy lignin trong một số phụ phẩm nông nghiệp	26
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. Sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh laccase ngoại bào	29
3.2. Đánh giá hoạt độ enzyme laccase ngoại bào của các chủng tuyển chọn	30
3.3. Đặc điểm chủng SPS3.4	32
3.3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào	32
3.3.2. Đặc tính sinh hóa	32
3.3.3 Định danh chủng SPS3.4	33
3.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4	35
3.4.1. Ảnh hưởng của pH đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4.....	35
3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4.....	36
3.4.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4.....	37
3.5. Khả năng phân hủy lignin trong một số phụ phẩm nông nghiệp của chủng SPS3.4	40
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	44
KẾT LUẬN	44
KIẾN NGHỊ	44
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	45
PHỤ LỤC	51

Danh mục các ký hiệu, các chữ cái viết tắt

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
2,6-DMP	2,6-Dimethylphenol	
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid	
CMC	Carboxymethyl Cellulose	
ĐC		Đối chứng
DES	Deep Eutectic Solvents	Dung môi eutectic sâu
EC 1.10.3.2	(Enzyme Commission number)	Mã số phân loại enzym
EPR	Electron Paramagnetic Resonance	Cộng hưởng thuận từ electron
kDa	Kilodalton	Đơn vị đo khối lượng phân tử
LMS	Laccase-Mediator System	Hệ thống laccase-mediator
MSB	Minimal Salt Buffer	Môi trường MSB
SEM	Scanning Electron Microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
TLs	Technical Lignin	Lignin kỹ thuật
TN		Thí nghiệm
TNC	Trinuclear Copper Center	Trung tâm ba nhân
UV-Vis	Ultraviolet-Visible spectroscopy	Phổ hấp thụ tử ngoại - khả kiến

Danh mục các bảng

Bảng 1.1. Tỷ lệ thành phần lignocellulose của các nguồn nguyên liệu thực vật.	5
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 05 chủng vi khuẩn tuyển chọn.	30
Bảng 3.2. Đặc điểm sinh hóa và hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng vi khuẩn SPS3.4.	33
Bảng 3.3. Hiệu suất phân hủy và khả năng làm giảm khối lượng các nguồn sinh khối lignocellulose của chủng vi khuẩn SPS3.4	41

Danh mục các hình vẽ, đồ thị

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của monolignol và các đơn vị cấu tạo tương ứng trong lignin.	6
Hình 3.1. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh enzyme laccase.	29
Hình 3.2. Hoạt độ enzyme laccase ngoại bào của 05 chủng vi khuẩn tuyển chọn.	31
Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc (trái) và ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét SEM (phải) của chủng SPS3.4.	32
Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loại của chủng SPS3.4 dựa trên trình tự gen 16S rRNA được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining.	34
Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hiệu suất phân hủy Guaiacol của chủng SPS3.4 sau 72 giờ nuôi cấy.	35
Hình 3.6. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hiệu suất phân hủy Guaiacol của chủng SPS3.4 sau 72 giờ nuôi cấy.	37
Hình 3.7. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến mật độ tế bào (OD_{600}) và hiệu suất phân hủy Guaiacol của chủng SPS3.4.	38
Hình 3.8. Tốc độ sinh trưởng của chủng SPS3.4 trên các nguồn phụ phẩm trấu (T), mía (M), rom rạ (R).	40

MỞ ĐẦU

1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Trong bối cảnh cuộc cách mạng công nghiệp 4.0 và xu hướng chuyển dịch sang nền kinh tế tuần hoàn, việc tận dụng nguồn sinh khối lignocellulose từ phế phụ phẩm nông nghiệp và công nghiệp đang trở thành tâm điểm của các nghiên cứu môi trường trên toàn thế giới. Lignocellulose là nguồn tài nguyên tái tạo dồi dào nhất trên Trái Đất, với thành phần chính gồm cellulose, hemicellulose và lignin. Trong đó, lignin – một polymer thơm phức hợp, chiếm khoảng 15% đến 35% khối lượng sinh khối – là trở ngại lớn nhất trong việc tận dụng hiệu quả nguồn tài nguyên này.

Lignin là một polymer thơm phức tạp, có cấu trúc vô định hình, bao bọc các sợi cellulose và hemicellulose, tạo nên cấu trúc bền vững và khả năng chống phân hủy trước các tác nhân vật lý, hóa học và sinh học. Chính vì đặc tính khó phân hủy, một lượng khổng lồ lignin từ ngành công nghiệp sản xuất giấy và bột giấy hiện nay vẫn bị coi là chất thải, thường được xử lý bằng cách đốt bỏ, gây phát thải khí nhà kính và lãng phí nguồn carbon thơm quý giá. Ngoài ra, việc phân hủy lignin bằng các phương pháp hóa học hay vật lý thường đòi hỏi năng lượng cao, sử dụng hóa chất độc hại và có thể tạo ra sản phẩm phụ không mong muốn có tính độc cao và khó phân hủy, gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Do đó, việc tìm kiếm một giải pháp phân hủy lignin hiệu quả, thân thiện với môi trường là một yêu cầu cấp bách không chỉ cho ngành kỹ thuật môi trường mà còn cho sự phát triển của công nghệ sinh học trắng.

Trong tự nhiên, quá trình phân hủy lignin được thực hiện bởi hệ thống enzyme oxy hóa khử (ligninolytic enzymes), trong đó Laccase (EC 1.10.3.2) đóng vai trò then chốt. Enzyme laccase (EC 1.10.3.2) là một loại enzyme oxy hóa-khử đa năng, thuộc nhóm polyphenol oxidase, có khả năng xúc tác quá trình oxy hóa nhiều hợp chất phenolic và phi-phenolic. Đặc tính "xanh" này giúp Laccase trở thành công cụ tiềm năng trong nhiều lĩnh vực: từ tẩy trắng bột giấy, xử lý màu nước thải dệt nhuộm, đến việc chuyển hóa lignin thành các monomer có giá trị cao.

Từ trước đến nay, các nghiên cứu về Laccase chủ yếu tập trung vào các loài nấm mục trắng (white-rot fungi). Tuy nhiên, thực tiễn triển khai ở quy mô công nghiệp cho thấy nấm mục trắng có nhiều hạn chế: tốc độ tăng trưởng chậm, điều kiện

nuôi cấy khắt khe, khó kiểm soát ở quy mô lớn và đặc biệt là sự kém ổn định trong môi trường pH kiềm hoặc nhiệt độ cao. Ngược lại, **vi khuẩn sinh Laccase** đang nổi lên như một nguồn enzyme laccase tiềm năng do tốc độ tăng trưởng nhanh, dễ dàng nuôi cấy và khả năng chịu đựng tốt các điều kiện môi trường khác nhau.

Tại Việt Nam, một quốc gia nông nghiệp với trữ lượng lớn phế phẩm chứa lignin (như rom rạ, bã mía, vỏ trấu), việc nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng sinh Laccase mạnh mẽ vẫn còn khá hạn chế. Đất rừng là một hệ sinh thái giàu chất hữu cơ, nơi diễn ra mạnh mẽ các quá trình phân hủy sinh học vật chất thực vật, đặc biệt là lignin. Đây được xem là kho tàng tiềm năng để phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng sản sinh các enzyme phân hủy lignin hiệu quả.

Xuất phát từ những lý do trên, đề tài: **"Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme Laccase ngoại bào phân hủy lignin"** đã được lựa chọn thực hiện. Nghiên cứu tập trung vào việc phân lập, tuyển chọn và đánh giá tiềm năng ứng dụng của các chủng vi khuẩn từ đất rừng không chỉ góp phần mở rộng nguồn enzyme laccase phục vụ cho các ứng dụng công nghiệp và môi trường, mà còn cung cấp cơ sở dữ liệu quan trọng về đa dạng sinh học vi khuẩn tại các khu vực rừng, từ đó đóng góp vào việc phát triển các giải pháp bền vững cho việc xử lý và tận dụng hiệu quả nguồn sinh khối lignocellulose...

2. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

Mục đích chính của luận văn là phân lập, tuyển chọn và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy của chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme Laccase ngoại bào với hoạt tính cao. Trên cơ sở đó, nghiên cứu hướng tới việc đánh giá tiềm năng sử dụng các chủng này như một giải pháp sinh học để phân hủy cấu trúc lignin, ứng dụng trong việc xử lý ô nhiễm môi trường.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Nội dung 1: Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh laccase ngoại bào

Tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn từ mẫu đất và mùn tại các hệ sinh thái rừng khác nhau. Thông qua phương pháp sàng lọc sơ bộ bằng chỉ thị màu và đánh giá hoạt tính enzyme, nghiên cứu tập trung tuyển chọn chủng vi

khuẩn ưu tú nhất có khả năng sinh tổng hợp laccase ngoại bào vượt trội để làm đối tượng nghiên cứu chính.

Nội dung 2: Định danh và khảo sát đặc điểm sinh học của chủng tuyển chọn

Xác định đặc điểm hình thái, các tính trạng hóa sinh và vị trí phân loại của chủng chọn lọc bằng phương pháp định danh phân tử (giải trình tự gene 16S rRNA). Bên cạnh đó, khảo sát khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào phối hợp khác như protease và cellulase để đánh giá tính đa năng của chủng trong phân hủy sinh khối.

Nội dung 3: Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (guaiacol)

Khảo sát ảnh hưởng của các thông số vật lý (pH, nhiệt độ) và hóa học (các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ) đến khả năng phân hủy guaiacol của chủng vi khuẩn chọn lọc.

Nội dung 4: Đánh giá khả năng phân hủy phụ phẩm và khử màu thuốc nhuộm

Thử nghiệm khả năng phân hủy lignin thực tế trên các phụ phẩm nông nghiệp (trấu, rơm rạ, bã mía) thông qua sự sụt giảm khối lượng chất khô.

4. CƠ SỞ KHOA HỌC VÀ TÍNH THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

4.1. Cơ sở khoa học

Cơ sở khoa học của đề tài dựa trên khả năng sinh enzyme laccase từ vi khuẩn. Lignin là một polymer thơm có cấu trúc vô định hình, phức tạp và bền vững nhất trong sinh khối thực vật, đóng vai trò như một lớp bảo vệ ngăn cản sự tiếp cận của enzyme đối với cellulose và hemicellulose.

Việc nghiên cứu dựa trên các nền tảng khoa học sau:

Cơ chế oxy hóa của Laccase: Enzyme laccase có khả năng oxy hóa nhiều hợp chất phenolic và phi phenolic thông qua cơ chế vận chuyển điện tử. Đây là chìa khóa để phá vỡ các liên kết bền vững trong cấu trúc lignin.

Ưu thế của vi khuẩn: So với nấm trắng, vi khuẩn sở hữu khả năng thích nghi cao với các điều kiện môi trường khắc nghiệt, dải pH hoạt động rộng và độ bền nhiệt tốt, giúp quá trình phân hủy lignin diễn ra ổn định trong các hệ thống xử lý sinh học.

Sự đa năng của enzyme ngoại bào: Việc các vi khuẩn sinh tổng hợp đồng thời laccase, cellulase và protease tạo nên một hệ thống enzyme phối

hợp, cho phép phân giải triệt để các thành phần cấu tạo nên vách tế bào thực vật.

4.2. Tính thực tiễn

Đề tài mang lại những giá trị thực tiễn quan trọng trong bối cảnh phát triển bền vững và kinh tế tuần hoàn tại Việt Nam:

Tái giá trị hóa phụ phẩm nông nghiệp: Việt Nam phát sinh lượng lớn trấu, rơm rạ và bã mía sau thu hoạch. Việc sử dụng chủng vi khuẩn giúp đẩy nhanh quá trình phân hủy lignin, rút ngắn thời gian ủ compost và biến chất thải thành nguồn phân bón hữu cơ giàu dinh dưỡng, hạn chế việc đốt bỏ gây ô nhiễm không khí.

Tối ưu hóa kinh tế trong vận hành: Kết quả nghiên cứu xác định được các điều kiện tối ưu giúp giảm thiểu chi phí năng lượng và nguyên liệu, tạo tiền đề để sản xuất các chế phẩm vi sinh ở quy mô công nghiệp với giá thành thấp.

Bảo vệ hệ sinh thái: Việc tìm kiếm và tuyển chọn các chủng vi sinh vật từ hệ sinh thái rừng Việt Nam không chỉ khẳng định giá trị nguồn gene bản địa mà còn cung cấp những giải pháp sinh học an toàn, không gây ô nhiễm thứ cấp cho môi trường đất và nước.

5. NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA LUẬN VĂN

❖ Về mặt lý luận: Cung cấp thêm dữ liệu khoa học về tính đa dạng của các chủng vi khuẩn sinh Laccase tại Việt Nam. Làm sáng tỏ mối quan hệ giữa điều kiện môi trường và khả năng tiết enzyme của vi khuẩn bản địa.

❖ Về mặt thực tiễn:

- Phân lập và lưu giữ được các chủng vi khuẩn có giá trị ứng dụng cao cho ngân hàng vi sinh vật.
- Đề xuất được các thông số kỹ thuật tối ưu cho việc sản xuất enzyme Laccase ở quy mô phòng thí nghiệm.
- Mở ra hướng ứng dụng mới trong việc sản xuất phân bón hữu cơ từ sinh khối giàu lignin.

NỘI DUNG

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ LIGNIN

Lignocellulose được ghi nhận là nguồn sinh khối thực vật dồi dào nhất trên toàn cầu, đóng vai trò như một nguồn tài nguyên tái tạo chiến lược cho các ngành công nghiệp sinh học. Về mặt cấu trúc, đây là một phức hệ polymer sinh học có độ phức tạp cao, được cấu thành chủ yếu từ ba thành phần chính: cellulose, hemicellulose và lignin. Trong đó, cellulose chiếm tỷ trọng lớn nhất với khoảng 35–55%, tiếp theo là hemicellulose từ 20–40% khối lượng khô. Hai thành phần này bản chất là các polysaccharide được bao bọc và bảo vệ bởi lignin (chiếm 10–25%) — một đại phân tử phenolic có cấu trúc mạng lưới vô định hình bền vững[1].

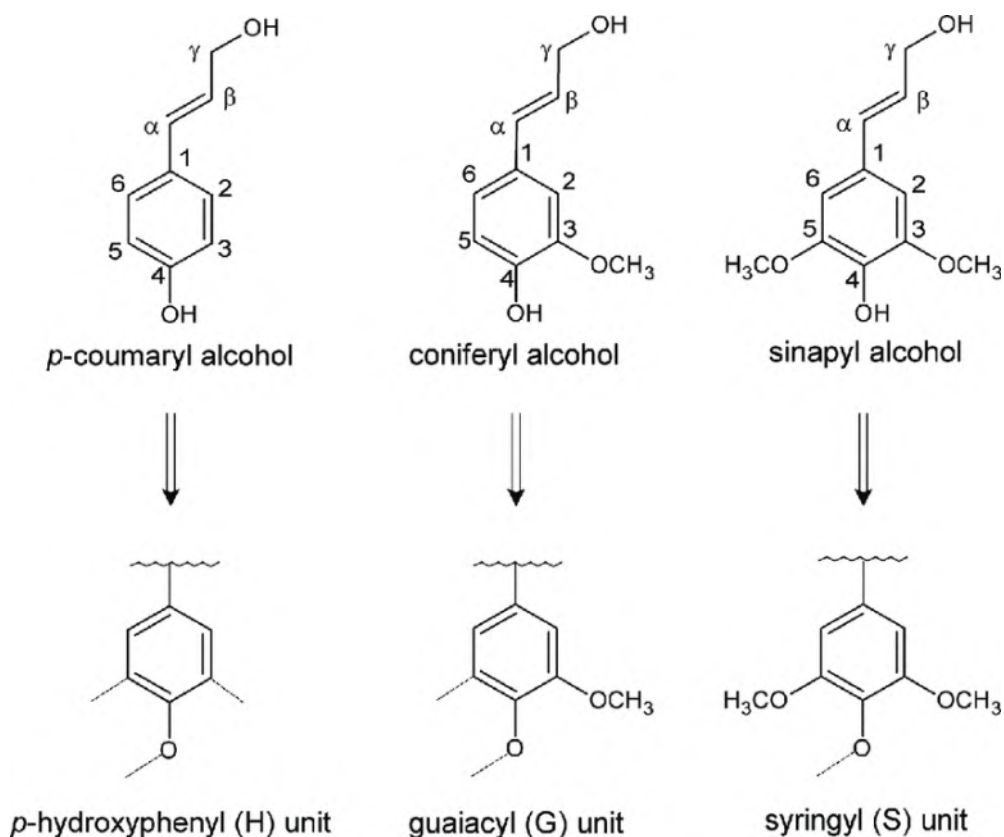
Bảng 1.1. Tỷ lệ thành phần lignocellulose của các nguồn nguyên liệu thực vật.

Vật liệu	Lignin (%)	Hemicellulose (%)	Cellulose (%)
Bã mía	20	25	42
Cao lương	21	27	45
Gỗ cứng	18–25	24–40	40–55
Lõi ngô	15	35	45
Thân lá ngô	19	26	38
Rơm rạ	18	24	32,1
Rơm lúa mì	16–21	26–32	29–35
Bã chuối	14	14,8	13,2
Sợi xơ mướp	15,46	17,44	66,59
Thân cây ngô	6,9	19,3	61,2
Ngũ cốc	16–21	26–32	45–55

(Trích dẫn từ Janusz và cộng sự (2023)[2]; Anwar và cộng sự (2014)[3])

Lignin là loại polymer sinh học có cấu trúc phenolic phức tạp, đóng vai trò là thành phần cấu tạo trọng yếu trong vách tế bào của các loài thực vật bậc cao, đặc biệt tập trung mật độ lớn tại các mô dẫn và mô gỗ. Trong tự nhiên, lignin được ghi nhận là hợp chất hữu cơ có trữ lượng dồi dào thứ hai trên

hành tinh, chỉ xếp sau cellulose. Với đặc tính liên kết bền vững, lignin không chỉ tạo nên độ bền cơ học cho thân cây mà còn hình thành một lớp rào cản bảo vệ thực vật trước các tác động sinh học và lý hóa từ môi trường bên cạnh hai thành phần chính là cellulose và hemicellulose.



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của monolignol và các đơn vị cấu tạo tương ứng trong lignin.

(Nguồn: Schoenherr và cộng sự, 2018 [4])

Lignin có các vòng thơm nằm trong một chuỗi phân tử dài. Cấu trúc của lignin là một cấu trúc ba chiều, trong đó các đơn vị phenylpropanoid được liên kết với nhau bằng liên kết carbon-carbon và aryl-ether một cách không đều. Điều này tạo nên đặc tính khó phân hủy và không hòa tan của lignocellulose. Ngoài ra, lignin còn có chức năng hỗ trợ cấu trúc, tạo ra tính không thấm nước và hoạt động như một rào cản vật lý, bảo vệ chống lại tác động của các enzyme vi sinh vật. Đặc tính này khiến lignin trở thành một polyme sinh học tiềm năng để sản xuất nhựa sinh học không thấm nước. Các nghiên cứu thực nghiệm gần đây đã khẳng định tiềm năng to lớn của lignin trong việc chế tạo nhựa sinh học có khả năng kháng nước vượt trội. Điển hình là quy trình chuyển hóa bột gỗ thải thông qua phương pháp nghiền bi kết hợp

với xử lý bằng DES, cho phép đạt hiệu suất thu hồi ấn tượng từ 74,4% đến 100%. Vật liệu nhựa sinh học tổng hợp từ lignocellulose toàn phần sở hữu cấu trúc mạng lưới dày đặc và tính kỵ nước đặc trưng, thể hiện qua góc tiếp xúc nước đạt trên 60° và chỉ số hấp thụ nước duy trì ở mức dưới 20%. Đặc biệt, độ cứng Brinell của loại nhựa này đạt giá trị trên 11,3, cao gấp 10 lần so với gỗ tự nhiên ban đầu, mở ra hướng đi mới cho việc thay thế các loại nhựa hóa thạch bằng vật liệu sinh học bền vững và có đặc tính cơ lý ưu việt[5].

Hàng năm, một lượng lớn phế phẩm nông công nghiệp được tạo ra trên toàn cầu, với hàm lượng lignin chiếm khoảng 15–25%. Sáu loại cây trồng chính, bao gồm rơm lúa mì, rơm lúa gạo, thân ngô, rơm lúa mạch, bã mía cùng rơm và vỏ đậu nành, đã cung cấp tổng cộng khoảng 3,9 tỉ tấn sinh khối vào năm 2017. Sự sẵn có dồi dào của sinh khối phế phẩm nông công nghiệp trên toàn thế giới là cơ hội lớn để phát triển các công nghệ sản xuất nhiên liệu sinh học, hóa chất và vật liệu sinh học từ các nguồn tài nguyên này [6].

Tỷ lệ lignin trong các sinh khối lignocellulose khác nhau dao động từ 6 đến 32%, tùy thuộc vào loại cây trồng và điều kiện môi trường. Để chiết xuất lignin, nhiều phương pháp quan trọng đã được phát triển[7], như là:

- Oxy hóa ướt bằng axit hoặc kiềm: Sử dụng hóa chất để phá vỡ cấu trúc lignin.
- Xử lý thủy nhiệt: Sử dụng nhiệt độ và áp suất cao để tách lignin.
- Nổ sợi amoniac organosolv: Kết hợp dung môi hữu cơ và amoniac để chiết xuất lignin hiệu quả.
- Xử lý trước bằng chất lỏng ion: Sử dụng chất lỏng ion để hòa tan và tách lignin.

Mỗi phương pháp đều có ưu điểm về hiệu suất và tính bền vững, tuy nhiên, các phương pháp này thường tốn năng lượng và có tác động môi trường. Vì vậy, ngày càng có nhiều sự quan tâm đến việc sử dụng các chất phân hủy lignin tự nhiên như nấm và vi khuẩn. Trong quá trình tiến hóa, các vi sinh vật thích nghi để sử dụng lignin làm nguồn carbon chính cho sự phát triển của chúng đã dần trở thành những tác nhân phân hủy lignin hiệu quả. Sự phân hủy sinh học của lignin được thực hiện nhờ các enzyme chuyên biệt, nhắm vào các liên kết cụ thể trong cấu trúc phức tạp của lignin, bao gồm lignin peroxidase, mangan peroxidase, peroxidase đa năng, laccase và

peroxidase khử màu thuốc nhuộm [8].

1.2. LACCASE

1.2.1. Giới thiệu chung về Laccase

Laccase, EC 1.10.3.2, p-diphenol:dioxygen oxidoreductase, là một phần của nhóm enzyme lớn hơn được gọi là enzyme đa đồng, bao gồm các enzyme oxidase axit ascorbic và ceruloplasmin. Laccase oxy hóa nhiều loại chất nền phenolic, thực hiện quá trình oxy hóa một electron để tạo ra liên kết ngang. Đây là những enzyme đặc hiệu phản ứng cộng hóa trị với nhiều chất nền thơm khác nhau, chẳng hạn như polyphenol, amin thơm và amin béo, và xúc tác quá trình oxy hóa một electron của các hợp chất này [9].

Laccase được phát hiện lần đầu tiên trong nhựa cây sơn mài Nhật Bản (*Rhus vernicifera*) vào năm 1883 bởi Yoshida [10]. Năm 1893, Gabriel Bertrand đã phân lập thành công enzyme laccase từ loài *R. succedanea* cùng một số thực vật khác thuộc họ *Anacardiaceae* như: *Mangifera indica*, *Schinus molle*, *Pistacia palaestina* và *Pleiogynium timoriense*. Về mặt phân loại, laccase thuộc nhóm protein chứa nhân đồng (multicopper proteins), tương tự như enzyme cytochrome oxidase ở thực vật và ceruloplasmin trong huyết tương động vật có vú. Tùy thuộc vào nguồn gốc tách chiết, các phân tử laccase sẽ có sự khác biệt đặc trưng về khối lượng phân tử, mức độ glycosyl hóa và các thông số động học enzyme.

1.2.2. Nguồn gốc laccase trong tự nhiên

Laccase phân bố rộng rãi trong thực vật bậc cao, vi khuẩn, nấm và côn trùng. Ở thực vật, laccase được tìm thấy trong bắp cải, củ cải, khoai tây, lê, táo và các loại rau khác. Laccase gần đây đã được phát hiện ở một số loài vi khuẩn, bao gồm *S. lavendulae*, *S. cyaneus* và *Marinomonas mediterranea*.

Trong giới nấm, laccase đặc biệt phong phú, với nhiều loài thuộc ngành Basidiomycetes như *Phanerochaete chrysosporium*, *Theiophora terrestris*, và *Lenzites betulina* được biết đến là nhà sản xuất laccase [11]. Nấm mục trắng, chẳng hạn như *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus* và *Trametes versicolour*, cũng là những nguồn cung cấp laccase quan trọng. Ngoài ra, nhiều loài thuộc chi *Trichoderma*, bao gồm *T. atroviride*, *T. harzianum* và *T. longibrachiatum*, cũng sản xuất enzyme này [12]. Về mặt chức năng sinh học, laccase đóng vai trò trong quá trình tạo lignin ở thực vật. Ngược lại, ở nấm, enzyme này tham

gia vào nhiều quá trình quan trọng khác nhau, bao gồm phân giải lignin, hình thành bào tử, sản xuất sắc tố, tạo thể quả và gây bệnh cho thực vật.

1.2.3. Phân loại

Căn cứ vào đặc tính quang phổ hấp thụ và cơ chế xúc tác, enzyme laccase có thể được phân loại thành các dạng khác nhau, trong đó phổ biến nhất là laccase xanh (blue laccase) và laccase vàng (yellow laccase). Laccase xanh là dạng điển hình, đặc trưng bởi sự hiện diện của ion đồng loại I, tạo nên đỉnh hấp thụ mạnh tại khoảng 600 nm trong phổ UV-Vis, đồng thời quyết định màu xanh đặc trưng của enzyme. Ngược lại, laccase vàng không biểu hiện đỉnh hấp thụ này do sự biến đổi trạng thái oxy hóa của trung tâm đồng, và chủ yếu thể hiện các đỉnh hấp thụ ở vùng bước sóng thấp hơn, liên quan đến các trung tâm đồng loại II và III (khoảng 300–330 nm)[13].

Một điểm khác biệt quan trọng về mặt chức năng là laccase vàng có khả năng oxy hóa các cơ chất phi-phenolic mà không cần sử dụng chất trung gian (mediator), trong khi laccase xanh thường phụ thuộc vào hệ mediator để mở rộng phổ cơ chất. Đặc tính này giúp laccase vàng trở thành enzyme có tiềm năng ứng dụng cao hơn trong xử lý các hợp chất khó phân hủy. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng ghi nhận rằng laccase vàng có xu hướng ổn định hơn trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt như pH và nhiệt độ cao, góp phần nâng cao hiệu quả ứng dụng trong công nghệ xử lý sinh học[14].

1.2.4. Tính chất của enzyme laccase

Laccase chủ yếu tồn tại dưới dạng glycoprotein, có thể là cấu trúc monome, dime hoặc tetrame. Quá trình glycosyl hóa (gắn đường) đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì cấu trúc và chức năng của enzyme, bao gồm:

- Giữ ổn định các ion đồng.
- Tăng tính bền nhiệt.
- Bảo vệ enzyme khỏi bị phân hủy bởi protease.
- Hỗ trợ quá trình bài tiết enzyme ra khỏi tế bào.

Sau khi được tinh chế, enzyme laccase thể hiện tính không đồng nhất đáng kể, với hàm lượng glycosyl hóa và thành phần glycoprotein thay đổi tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy. Điều này cho thấy môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến đặc tính của enzyme laccase được tạo ra.

1.2.5. Cấu trúc phân tử và trung tâm hoạt động của laccase

1.2.5.1. Cấu trúc tổng thể

Enzyme laccase là các protein đa nhân đồng (multicopper oxidases) có sự đa dạng lớn về hình thái tồn tại, từ dạng đơn phân (monomer) đến các dạng đa phân phức tạp như dimer hoặc tetramer. Khối lượng phân tử của enzyme này có sự khác biệt rõ rệt giữa các nguồn gốc sinh học: ở vi khuẩn, giá trị này thường dao động trong khoảng 60–80 kDa, trong khi ở nấm, dải khối lượng trải rộng hơn, từ 50 đến 130 kDa. Về cấu trúc không gian, laccase vi khuẩn chủ yếu được phân loại thành hai dạng đặc trưng dựa trên số lượng miền protein (domain): cấu trúc 2-miền và cấu trúc 3-miền. Đáng chú ý, mỗi miền cấu trúc này đều được hình thành từ các mô-típ β -sheet gấp nếp theo kiểu cupredoxin — một đặc điểm cấu tạo điển hình và bảo tồn của các enzyme chứa đồng, đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra môi trường phối tử ổn định cho các trung tâm kim loại thực hiện quá trình vận chuyển electron [15].

Đặc trưng cốt lõi của phân tử laccase là sự sắp xếp tinh vi của các ion đồng thành các trung tâm hoạt động chuyên biệt, bao gồm ion đồng loại 1 (T1), loại 2 (T2) và cặp ion đồng loại 3 (T3). Sự phối hợp chặt chẽ giữa các trung tâm hình thành nên một hệ thống xúc tác oxy hóa–khử đồng bộ, cho phép enzyme thực hiện quá trình oxy hóa đa dạng các cơ chất, từ các hợp chất phenolic đơn giản đến cấu trúc polymer phức tạp như lignin. Trong cơ chế này, trung tâm T1 đóng vai trò là vị trí tiếp nhận electron sơ cấp từ cơ chất, khởi đầu cho chuỗi vận chuyển electron nội phân tử. Electron sau đó được chuyển dịch đến cụm ba nhân (trinuclear cluster) — tạo bởi sự kết hợp giữa ion T2 và cặp T3 — nơi diễn ra quá trình khử phân tử oxy thành nước [16]. Chính cấu trúc đa nhân đặc thù này đã tạo nên thế oxy hóa khử cần thiết, giúp laccase trở thành một trong những công cụ sinh học mạnh mẽ nhất trong việc phá vỡ các liên kết hóa học bền vững của sinh khối lignocellulose.

1.2.5.2. Các trung tâm đồng và cơ chế xúc tác

Các trung tâm đồng trong phân tử laccase đóng vai trò then chốt trong quá trình xúc tác. Trung tâm T1 (copper xanh) là vị trí tiếp nhận electron từ cơ chất và được đặc trưng bởi đỉnh hấp thụ mạnh trong vùng khả kiến, khoảng 600–610 nm, đồng thời có thể được phát hiện bằng phổ cộng hưởng thuận từ electron (EPR). Trung tâm T2 là trung tâm đồng đơn nhân không màu, cũng có thể phát hiện bằng EPR, trong khi trung tâm T3 gồm hai ion đồng ghép cặp

mạnh, thể hiện tín hiệu hấp thụ yếu trong vùng UV (khoảng 330 nm) và không phát hiện được bằng EPR do tính chất ghép spin[17].

Ba trung tâm này phối hợp tạo thành một trung tâm đa nhân gọi là trung tâm ba nhân (Trinuclear Copper Center – TNC), bao gồm một ion T2 và hai ion T3, có chức năng liên kết và khử phân tử oxy thành nước. Cơ chế xúc tác của laccase diễn ra theo chu trình oxy hóa–khử nhiều bước: đầu tiên, cơ chất bị oxy hóa tại trung tâm T1Cu, tạo ra gốc tự do thông qua phản ứng trao đổi một electron; sau đó, electron được chuyển từ T1Cu đến TNC thông qua cầu nối bảo tồn cao Cys–His–Cu; cuối cùng, tại TNC, phân tử oxy (O_2) được khử hoàn toàn thành hai phân tử nước thông qua quá trình nhận bốn electron và bốn proton [18].

Sản phẩm của quá trình xúc tác là các gốc tự do từ cơ chất, có khả năng tham gia vào các phản ứng thứ cấp như tái tổ hợp hoặc trùng hợp, tạo thành các dimer, oligomer hoặc polymer. Cơ chế này đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy lignin, khi các liên kết phức tạp trong cấu trúc polymer bị phá vỡ từng bước thông qua phản ứng oxy hóa gốc tự do [16].

1.2.6. Hệ thống laccase-mediator (LMS) và vai trò trong phân hủy lignin

Mặc dù laccase có khả năng oxy hóa trực tiếp các cấu trúc phenolic (chiếm 10–30% trong lignin), tuy nhiên, hiệu suất tấn công vào các liên kết phi-phenolic (chiếm 70–90%) thường bị giới hạn bởi thế oxy hóa khử (*redox potential*) của enzyme thấp hơn so với cơ chất. Để khắc phục rào cản này, việc ứng dụng các chất trung gian (*mediators*) — các phân tử khối lượng thấp đóng vai trò 'cầu nối' vận chuyển electron — là vô cùng cần thiết. Trong hệ thống LMS, laccase thực hiện oxy hóa mediator thành các gốc tự do có hoạt tính cao, sau đó các gốc này tiếp tục tấn công và phá vỡ cấu trúc phi-phenolic thông qua cơ chế chuyển electron hoặc tách nguyên tử hydro [15].

Hoạt động xúc tác của laccase dựa trên cơ chế oxy hóa–khử phức tạp. Enzyme này xúc tác quá trình khử một phân tử oxy thành nước, đồng thời oxy hóa một electron từ các hợp chất thơm đa dạng như polyphenol, monophenol có nhóm thế methoxy và các amin thơm. Cấu trúc của laccase bao gồm bốn nguyên tử đồng, được phân loại thành ba loại riêng biệt: Đồng loại T1 (nơi diễn ra liên kết với cơ chất khử) và cụm đồng ba nhân T2/T3. Trong đó, cụm T2/T3 đóng vai trò quan trọng trong việc tiếp nhận electron từ đồng T1 và

thực hiện quá trình khử oxy thành nước. Việc phân biệt các loại đồng này có thể được thực hiện thông qua các kỹ thuật quang phổ tiên tiến như UV/Visible và cộng hưởng thuận từ điện tử (EPR)[19].

Quá trình phân giải lignin bằng enzyme laccase (hoặc hệ thống laccase-chất trung gian - LMS) được khởi đầu bằng việc trích xuất một electron duy nhất từ đơn vị phenylpropanoid của lignin. Quá trình này tạo ra một gốc tự do, làm tăng tính phản ứng của bề mặt lignin. Vì lignin có nhiều hệ liên kết liên hợp, electron chưa ghép đôi trong gốc tự do có thể chuyển vị đến các vùng có cấu trúc ổn định nhất. Laccase xúc tác chuyển các cấu trúc phenolic của lignin thành gốc phenoxyl, trong khi LMS oxy hóa các cấu trúc không phenolic thành gốc β -aryl và gốc benzylic[20]. Các gốc tự do này là những chất trung gian phản ứng, kích hoạt hai kết quả chính:

- Phá vỡ liên kết: Kết quả thứ nhất là sự phân cắt liên tiếp các liên kết trong polyme lignin (như alkyl-aryl, $C\alpha-C\beta$, và $C\alpha-C1$). Quá trình này dẫn đến việc giải phóng các cấu trúc phụ của lignin, hình thành các hợp chất thơm và giảm khối lượng phân tử trung bình. Một số sản phẩm phân giải lignin như axit p-hydroxybenzoic và vanillin có thể hoạt động như chất trung gian, kết hợp với laccase để thúc đẩy quá trình oxy hóa tiếp theo của các liên kết C1 của β -O-4 và $C\alpha-C\beta$ trong lignin.

- Tái trùng hợp: Kết quả thứ hai là sự ghép cặp của các gốc tự do lignin và/hoặc gốc tự do của chất trung gian. Các gốc tự do của phenylpropanoid và/hoặc chất trung gian liên kết với nhau thông qua phản ứng ghép cặp gốc tự do. Điều này sẽ làm tăng khối lượng phân tử trung bình của lignin, cuối cùng dẫn đến sự tái trùng hợp của lignin.

Đáng chú ý, các dẫn xuất phenolic tự nhiên từ quá trình phân hủy lignin như acetosyringone, syringaldehyde và vanillin được xác định là những mediator tiềm năng. Việc tận dụng chính các sản phẩm phân hủy này không chỉ hình thành một lộ trình phân giải lignin khép kín, bền vững mà còn tối ưu hóa về mặt kinh tế. Hiện nay, hệ thống LMS được xem là một trong những công nghệ sinh học tiềm năng cho các giải pháp xử lý môi trường theo hướng bền vững và thân thiện với môi trường.[21]

1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp và hoạt tính laccase

1.3.1. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Nguồn carbon đóng vai trò quyết định trong việc cung cấp năng lượng cho quá trình chuyển hóa tế bào và điều tiết quá trình sinh tổng hợp enzyme laccase. Theo các nghiên cứu gần đây, việc lựa chọn nguồn carbon không chỉ ảnh hưởng đến mật độ tế bào mà còn tác động trực tiếp đến mức độ biểu hiện gene mã hóa laccase thông qua các cơ chế điều hòa ngược. Cụ thể, các nguồn carbon mạch đơn giản (như glucose, sucrose và xylose) mặc dù thúc đẩy sự gia tăng sinh khối nhanh chóng, nhưng thường gây ra hiện tượng ức chế dị hóa carbon (*carbon catabolite repression – CCR*). Cơ chế này ngăn cản sự bài tiết laccase cho đến khi nguồn carbon dễ tiêu thụ bị cạn kiệt. Ngược lại, các polymer phức tạp như cellulose, lignin và các dẫn xuất cấu trúc của chúng lại đóng vai trò là những tác nhân cảm ứng (*inducers*) hiệu quả, giúp duy trì hoạt tính enzyme ổn định và kéo dài[22].

Đáng chú ý, các hợp chất phenolic có nguồn gốc từ lignin như guaiacol, veratryl alcohol và vanillin đã được khẳng định là những chất cảm ứng đặc hiệu. Trong đó, guaiacol thường được ưu tiên sử dụng để kích thích chọn lọc hoạt tính laccase và manganese peroxidase (MnP) mà không gây ảnh hưởng đáng kể đến nồng độ lignin peroxidase (LiP). Sự hiện diện của các hợp chất này mô phỏng môi trường phân hủy sinh khối tự nhiên, từ đó kích hoạt cơ chế phòng vệ và trao đổi chất của vi sinh vật, dẫn đến sự gia tăng vượt trội về hoạt tính enzyme ngoại bào[23].

1.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nguồn nitơ và nồng độ của chúng đóng vai trò điều tiết phức tạp đối với quá trình sinh tổng hợp laccase, tùy thuộc vào đặc tính sinh lý riêng biệt của từng chủng vi sinh vật. Quá trình sản xuất enzyme này có thể diễn ra trong cả điều kiện giới hạn nitơ lẫn môi trường giàu nitơ, phản ánh sự đa dạng trong cơ chế điều hòa biểu hiện gene mã hóa laccase giữa các loài khác nhau.

Trong các hệ thống nuôi cấy, nguồn nitơ hữu cơ phức tạp như peptone, meat extract và yeast extract thường được ghi nhận là hỗ trợ tối ưu cho quá trình gia tăng sinh khối nhờ cung cấp đầy đủ các acid amin và yếu tố tăng trưởng cần thiết. Tuy nhiên, các nguồn này đôi khi không phải là tác nhân thúc đẩy bài tiết enzyme mạnh mẽ nhất do sự ưu tiên của tế bào cho quá trình trao đổi chất sơ cấp. Ngược lại, các muối ammonium vô cơ như $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4Cl thường đóng vai trò là tác nhân kích thích bài tiết enzyme laccase hiệu

quả hơn ở nhiều chủng vi khuẩn [22].

1.3.3. Ảnh hưởng của ion kim loại

Ion kim loại, đặc biệt là ion đồng hóa trị hai (Cu^{2+}), đóng vai trò then chốt trong cả quá trình cấu thành cấu trúc và điều tiết biểu hiện gen của enzyme laccase ở vi sinh vật. Về mặt cấu trúc, mỗi phân tử laccase chứa bốn nguyên tử đồng phân bố tại ba trung tâm T1, T2 và T3 — đây là thành phần không thể thiếu để enzyme thực hiện chức năng xúc tác oxy hóa. Do đó, sự thiếu hụt Cu^{2+} trong môi trường nuôi cấy sẽ trực tiếp làm giảm khả năng hoàn thiện cấu trúc enzyme, dẫn đến suy giảm hoạt tính xúc tác [24].

Về mặt điều tiết sinh tổng hợp, Cu^{2+} hoạt động như một chất cảm ứng biểu hiện gen laccase ở cấp độ phiên mã. Nghiên cứu của Sharghi và cộng sự (2024) trên nấm *Pleurotus eryngii* KS004 cho thấy việc bổ sung Cu^{2+} vào môi trường nuôi cấy dịch thể đã làm tăng đồng thời cả mức độ phiên mã gen laccase (*pel3*) lẫn hoạt độ laccase ngoại bào theo chiều phụ thuộc nồng độ, trong đó mức tăng hoạt tính enzyme đạt cực đại gấp 4,6 lần so với đối chứng tại nồng độ 1 mM Cu^{2+} . Tuy nhiên, khi nồng độ quá cao, Cu^{2+} có thể sẽ gây ức chế sinh trưởng tế bào và làm giảm sản lượng enzyme tổng thể [25].

Bên cạnh Cu^{2+} , các ion kim loại khác cũng có thể ảnh hưởng đến hoạt tính laccase theo cơ chế kích thích hoặc ức chế tùy thuộc vào chủng vi sinh vật và nồng độ áp dụng. Nghiên cứu của Wang và cộng sự (2023) cho thấy phức hợp đồng-tripeptide (GHK-Cu) có hiệu quả cảm ứng sản xuất laccase cao hơn CuSO_4 ở *Trametes versicolor*, do GHK-Cu tăng cường tính thấm màng tế bào, thúc đẩy quá trình hấp thu và tích lũy đồng nội bào hiệu quả hơn, từ đó dẫn đến mức độ biểu hiện gen laccase cao hơn đáng kể. Các ion Mn^{2+} và Fe^{3+} cũng thường được ghi nhận là có tác động ức chế hoạt tính laccase ở nồng độ cao thông qua cơ chế cạnh tranh liên kết tại trung tâm đồng hoặc gây biến tính cấu trúc enzyme, trong khi ở nồng độ thấp có thể đóng vai trò cofactor hỗ trợ một số phản ứng oxy hóa phụ liên quan [26].

1.3.4. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

pH và nhiệt độ là hai thông số lý hóa quan trọng nhất quyết định hoạt tính và độ bền của enzyme laccase trong các ứng dụng thực tế. Hai thông số này không chỉ ảnh hưởng đến tốc độ phản ứng xúc tác mà còn tác động trực tiếp đến cấu trúc bậc ba và bậc bốn của phân tử enzyme, qua đó xác định giới

hạn điều kiện vận hành của enzyme trong quy trình công nghệ.

Về ảnh hưởng của pH, laccase nấm và laccase vi khuẩn có sự khác biệt căn bản. Laccase nấm có pH hoạt động tối ưu trong vùng acid (pH 3,0–5,0), phản ánh được nguồn gốc sinh thái của chúng trong môi trường phân hủy gỗ có tính acid. Ngược lại, laccase vi khuẩn thể hiện những ưu thế nổi bật so với laccase nấm, bao gồm khả năng chịu nhiệt cao, hoạt động tốt ở dải pH rộng và đặc biệt là khả năng dung nạp điều kiện kiềm — những đặc tính này làm cho laccase vi khuẩn trở thành công cụ sinh học xanh đầy hứa hẹn cho các ứng dụng công nghiệp. Cụ thể trong các nghiên cứu gần đây, laccase từ *Bacillus halodurans* và *Streptomyces coelicolor* đạt hoạt tính cực đại đối với cơ chất syringaldazine và 2,6-dimethoxyphenol ở pH lần lượt là 7,5 và 9,4 [27, 28]. Đây là minh chứng cho đặc tính hoạt động ở môi trường kiềm đặc trưng của nhóm laccase vi khuẩn, vượt qua giới hạn của laccase nấm trong việc mở rộng phạm vi điều kiện phản ứng khả thi trong ứng dụng công nghiệp.

Nhiệt độ là yếu tố quyết định đến cả tốc độ phản ứng xúc tác và độ bền của phân tử enzyme. So với laccase có nguồn gốc từ nấm, các laccase vi khuẩn — đặc biệt là từ các chi *Bacillus* và *Streptomyces* — thể hiện ưu thế vượt trội về độ bền nhiệt và khả năng thích nghi trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt. Nhiều nghiên cứu thực nghiệm đã ghi nhận những giá trị ấn tượng về khả năng chịu nhiệt của nhóm enzyme này. Điển hình như nghiên cứu của Li và cộng sự (2021), laccase tái tổ hợp từ *Bacillus licheniformis* TCCC 111219 có thể duy trì tới 60% hoạt tính sau 2 giờ xử lý ở 70°C; thậm chí hoạt tính còn được tăng cường đáng kể (đạt 170%) khi được ủ trong môi trường kiềm (pH 10,0) suốt 10 ngày [29]. Tương tự, laccase từ *Streptomyces* sp. LAO trong nghiên cứu của Gogotya và cộng sự (2021) cho thấy hoạt tính tối ưu tại nhiệt độ lên tới 90°C và pH 8,0, đồng thời sở hữu khả năng kháng các dung môi hữu cơ mạnh mẽ [30]. Sự ổn định cấu trúc xuất sắc ở dải nhiệt độ và pH rộng không chỉ khẳng định giá trị sinh học của laccase vi khuẩn mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng to lớn trong lĩnh vực hóa học xanh và các quy trình công nghiệp quy mô lớn.

Khả năng hoạt tại ngưỡng nhiệt độ và pH cao của laccase vi khuẩn có giá trị đặc biệt quan trọng trong các ứng dụng xử lý nước thải công nghiệp và các quy trình biorefinery, nơi thường yêu cầu enzyme hoạt động bền vững

trong điều kiện nhiệt độ cao và môi trường kiềm. Các nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện sản xuất laccase từ các chủng vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus erythropolis* và *Pseudomonas aeruginosa* cho thấy nhiệt độ và pH tối ưu có thể điều chỉnh thông qua lựa chọn cơ chất và điều kiện nuôi cấy phù hợp, từ đó nâng cao đáng kể hiệu quả sản xuất enzyme và khả năng ứng dụng trong thực tế [22].

1.4. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam

1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Trong nhiều thập kỷ, nấm (đặc biệt là nấm mục trắng) được coi là nguồn sản sinh laccase chính. Tuy nhiên, nghiên cứu hiện đại đã chuyển dịch mạnh mẽ sang laccase vi khuẩn do tính ổn định cao trong các điều kiện khắc nghiệt và tốc độ sinh trưởng nhanh. Tổng quan của Grgas và cộng sự (2023) chỉ ra rằng các chi vi khuẩn như *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* và đặc biệt là *Rhodococcus* sở hữu hệ enzyme ligninolytic đa dạng. Trong đó, enzyme laccase đóng vai trò xung kích trong giai đoạn oxy hóa sơ cấp các cấu trúc phenolic của lignin, tạo tiền đề cho các phản ứng bẻ gãy vòng thơm tiếp theo [12]. Sự phát hiện các đặc tính ưu việt này ở vi khuẩn không chỉ mở rộng hiểu biết về chu trình carbon trong tự nhiên mà còn cung cấp các công cụ sinh học tiềm năng cho công nghệ xử lý sinh khối bền vững.

Nghiên cứu đột phá của Gu và cộng sự (2024) đã chứng minh khả năng chuyển hóa sinh học lignin của một số chủng vi khuẩn không chỉ dừng lại ở mức độ phân hủy mà còn có thể định hướng tạo thành các hợp chất thơm có giá trị kinh tế cao. Trong các điều kiện vận hành tối ưu, hiệu suất khoáng hóa lignin có thể đạt tới ngưỡng 80–90%, một con số đầy ấn tượng đối với các cơ chất có cấu trúc bền vững [31]. Điều này mở ra tiềm năng ứng dụng trong công nghệ biorefinery và sản xuất nhiên liệu sinh học.

Đáng chú ý, xu hướng nghiên cứu hiện nay đang tập trung mạnh mẽ vào hệ enzyme laccase từ vi khuẩn nhờ các ưu điểm vượt trội về độ bền sinh hóa. Khác với laccase từ nấm, laccase vi khuẩn thể hiện khả năng thích nghi cao trong dải pH rộng, có độ bền nhiệt ưu việt và duy trì trạng thái ổn định dưới các tác động khắc nghiệt từ môi trường. Nghiên cứu của Wang và cộng sự (2023) ghi nhận laccase vi khuẩn vẫn duy trì hoạt tính ổn định này không chỉ

khẳng định tiềm năng xúc tác mạnh mẽ của enzyme mà còn mở ra cơ hội ứng dụng rộng rãi trong các quy trình xử lý nước thải công nghiệp vốn có điều kiện hóa lý phức tạp và biến thiên liên tục.

Bên cạnh đó, nghiên cứu của Ayala-Rodríguez và cộng sự (2024) đã chỉ ra rằng các chủng *Paenibacillus polymyxa* sở hữu khả năng bài tiết hệ enzyme ligninolytic ngoại bào mạnh mẽ, tham gia hiệu quả vào lộ trình phân giải cấu trúc lignin phức tạp trong các phụ phẩm nông nghiệp [32]. Kết quả này không chỉ củng cố thêm những bằng chứng khoa học về vai trò của vi khuẩn trong chu trình chuyển hóa các polymer bền vững mà còn khẳng định tiềm năng ứng dụng thực tiễn to lớn của các dòng vi sinh vật ưu tú trong quy trình xử lý sinh học và tái giá trị hóa nguồn phế phụ phẩm lignocellulose.

Một trong những xu hướng nghiên cứu hiện nay là việc tích hợp công nghệ sinh học phân tử và phân tích metagenomics nhằm khai phá các nguồn gene laccase tiềm năng từ quần thể vi sinh vật chưa thể nuôi cấy. Điển hình là nghiên cứu của Yu và cộng sự (2025), thông qua phân tích dữ liệu metagenome từ các mẫu đất bổ sung rom rạ, đã định danh thành công các trình tự gene mã hóa laccase mới với hoạt tính vượt trội [33]. Kết quả này không chỉ khẳng định vai trò then chốt của enzyme laccase trong chu trình carbon toàn cầu mà còn làm sáng tỏ cơ chế phân hủy chất hữu cơ phức tạp trong tự nhiên, tạo cơ sở dữ liệu quan trọng cho các chiến lược thiết kế enzyme tái tổ hợp phục vụ mục tiêu công nghiệp và môi trường.

Song song với việc khai thác nguồn gene tự nhiên, các nghiên cứu về biểu hiện dị thể và cải biến đặc tính enzyme laccase đang đạt được những bước tiến quan trọng. Điển hình, Zhang và cộng sự (2024) đã phân lập và biểu hiện thành công laccase từ hệ vi sinh vật dạ cỏ động vật nhai lại – một môi trường đặc thù có khả năng phân giải lignocellulose cực kỳ hiệu quả – mở ra triển vọng mới trong việc thiết kế các chế phẩm enzyme có hoạt lực cao [34]. Bên cạnh các kỹ thuật di truyền, việc tối ưu hóa các thông số vận hành như pH, nhiệt độ và thành phần dinh dưỡng vẫn đóng vai trò cốt lõi trong việc khai thác tối đa tiềm năng sinh học của chúng. Nghiên cứu của Minhas và cộng sự (2025) trên chủng *Pseudomonas stutzeri* đã chứng minh rằng, thông qua việc tinh chỉnh các điều kiện nuôi cấy, hoạt tính laccase và hiệu suất phân hủy lignin có thể được gia tăng đáng kể [35].

Bên cạnh các nghiên cứu đơn chủng, xu hướng hiện nay đang chuyển dịch mạnh mẽ sang việc ứng dụng tổ hợp vi sinh vật nhằm tối ưu hóa hiệu quả phân hủy lignin. Các bằng chứng khoa học cho thấy sự tương tác đa loài có khả năng tạo ra hiệu ứng hiệp đồng, giúp đẩy nhanh tốc độ khoáng hóa và nâng cao mức độ phân giải các cấu trúc polymer phức tạp vượt trội so với các hệ thống nuôi cấy đơn lẻ [36]. Đồng thời, sự tích hợp của các công nghệ đột phá như kỹ thuật protein (*protein engineering*), trí tuệ nhân tạo (AI) và thiết kế enzyme *de novo* đang mở ra một kỷ nguyên mới trong việc cải thiện hoạt tính và độ bền nhiệt của laccase[37].

Nhìn chung, nghiên cứu trên thế giới đã đạt được nhiều tiến bộ quan trọng, từ việc phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn đến tối ưu hóa enzyme và ứng dụng trong xử lý môi trường và công nghệ sinh học.

1.4.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Nghiên cứu về vi sinh vật sinh laccase tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào nấm đảm, đặc biệt là các loài gây thối trắng như *Trametes maxima*, *Rigidoporus sp.*, và *Fusarium oxysporum*.

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Liên và cộng sự (2024) đã phân lập một chủng nấm *Trametes polyzona* TĐ16 từ đất ở Vườn quốc gia Tam Đảo, chủng TĐ16 có tốc độ sinh trưởng khá nhanh, đạt 282,16 μm /giờ. Chủng nấm này có khả năng sinh ra nhiều loại enzyme ngoại bào, bao gồm laccase, lignin peroxidase, amylase và protease[38]. Bên cạnh đó, Phùng Khắc Huy Chú và cộng sự (2017) đã phân lập chủng *Fusarium oxysporum* HUIB02 có khả năng sinh tổng hợp laccase ngoại bào mạnh, được xem là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam về laccase từ *F. Oxysporum* [39]. Chủng này được ứng dụng trong việc khử màu thuốc nhuộm hoạt tính dùng để nhuộm vải may quân trang.

Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Lan Anh và cộng sự (2022), ba loại nấm khác nhau đã được thử nghiệm về khả năng phân hủy hai loại thuốc diệt cỏ là 2,4-D và 2,4,5-T, đồng thời nghiên cứu vai trò của các enzyme laccase và cytochrome P450 trong quá trình này. Một loại nấm mục trắng, *Rigidoporus sp.* FMD21, có hoạt tính laccase cao, đã cho thấy hiệu quả trong việc phân hủy các loại thuốc diệt cỏ này. Một mối tương quan thuận được tìm thấy giữa hoạt tính laccase của nấm và tốc độ phân hủy thuốc diệt cỏ. Hoạt tính laccase tăng gấp đôi thì tốc độ phân hủy thuốc cũng tăng gấp đôi. Điều

này cho thấy laccase có thể là enzyme chủ đạo trong quá trình phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T trong các điều kiện này. Ngoài ra, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng *Rigidoporus* sp. FMD21 cũng sử dụng một phần cytochrome P450 để phân giải các chất này. Hai loại nấm sợi khác, thuộc chi *Fusarium* và *Verticillium* (ngành Ascomycota), được phân lập từ đất nhiễm thuốc diệt cỏ và dioxin ở sân bay Biên Hòa. Cả hai đều có khả năng phân hủy thuốc diệt cỏ nhưng với tốc độ khác nhau. Tuy nhiên, hoạt tính laccase của chúng rất thấp và không tương quan với tốc độ phân hủy. Kết quả nghiên cứu cho thấy nấm mục trắng *Rigidoporus* sp. FMD21 có thể sử dụng cả laccase và cytochrome P450 để phân giải thuốc diệt cỏ, trong khi cơ chế enzyme phân giải của hai loại nấm thuộc ngành Ascomycota vẫn chưa rõ ràng. [40]

Các nghiên cứu trong nước đã bước đầu ghi nhận sự tồn tại của nhiều chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase, đặc biệt thuộc các chi như *Streptomyces*, *Bacillus* và *Pseudomonas*.

Mặc dù nghiên cứu về vi khuẩn sinh laccase tại Việt Nam còn hạn chế so với nấm, một số công trình đã bước đầu ghi nhận tiềm năng của vi khuẩn và xạ khuẩn trong việc sản xuất laccase. Phùng Khắc Huy Chú và cộng sự (2015) đã phân lập và khảo sát khả năng sinh tổng hợp laccase-like từ các chủng xạ khuẩn từ đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa, tỉnh Đồng Nai. Hai chủng xạ khuẩn XKBHN1 và XKBiR929 được ghi nhận có khả năng sinh tổng hợp laccase-like trên môi trường chứa các chất hữu cơ clo khác nhau, cho thấy tiềm năng trong xử lý chất diệt cỏ/dioxin [41].

Kết quả từ nghiên cứu của Đào Thị Ngọc Ánh và cộng sự (2025) cho thấy, xạ khuẩn từ đất nhiễm dioxin tại sân bay A So, tỉnh Thừa Thiên Huế, có tiềm năng lớn trong việc xử lý các chất ô nhiễm. Đặc biệt, chủng *Streptomyces* sp. XAS3 đã thể hiện khả năng vượt trội trong việc sản sinh enzyme laccase với hoạt tính cao nhất, đạt 468,06 U/l. Chủng xạ khuẩn này không chỉ phân hủy hiệu quả 42,04% phenanthrene trong ba tuần, mà còn loại bỏ thành công 16 trên 18 loại thuốc nhuộm được khảo sát. Hiệu quả cao nhất được ghi nhận với thuốc nhuộm acid blue 62, khi chủng này loại bỏ 26,72% màu chỉ sau 20 phút [42]. Điều này cho thấy khả năng ứng dụng thực tế của xạ khuẩn trong việc phân hủy sinh học các chất ô nhiễm, mở ra một hướng đi mới cho việc xử lý môi trường.

Phần lớn các nghiên cứu này mới chỉ dừng lại ở mức phân lập, định danh và đánh giá hoạt tính enzyme trên quy mô phòng thí nghiệm. Các nội dung nghiên cứu chuyên sâu như cơ chế xúc tác của enzyme, tối ưu hóa điều kiện sinh tổng hợp laccase, cũng như ứng dụng ở quy mô lớn trong xử lý chất thải lignocellulose vẫn còn hạn chế. Điều này cho thấy lĩnh vực nghiên cứu vi khuẩn sinh laccase tại Việt Nam vẫn đang ở giai đoạn khởi đầu và cần được tiếp tục phát triển theo hướng chuyên sâu và ứng dụng thực tiễn.

Việt Nam có lợi thế lớn về nguồn phụ phẩm nông nghiệp dồi dào (rơm rạ, trấu, bã mía), tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật phân hủy lignin. Do đó, việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng sinh laccase và phân hủy lignin hiệu quả là hướng đi cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn cao.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Các chủng vi khuẩn sinh enzyme laccase

Phạm vi nghiên cứu : Các mẫu đất được thu thập từ các khu vực giàu lignocellulose tại Việt Nam: rừng quốc gia Xuân Thủy, Tam Đảo, Hoàng Liên Sơn.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

2.1.2.1. Thiết bị, dụng cụ

- Ống eppendorf, micropipette.
- Bình tam giác, que cấy, đèn cồn
- Máy quang phổ UV-Vis, Nhật Bản.
- Máy ly tâm. (Eppendorf 5405000441 5425 Centrifuge)
- Cân phân tích.
- Nồi hấp vô trùng.
- Máy lắc ổn nhiệt.
- Tủ ẩm
- Máy đo pH.

2.1.2.2. Hóa chất

Khảo sát được thực hiện trên môi trường môi trường khoáng Stanier's Basal (MSB: Minimal Salt Buffer). Các hóa chất đều được cung cấp bởi Sigma-Aldrich và các nhà cung cấp khác.

Dung dịch A	X25	Dung dịch B	X50	Dung dịch C	X200
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	131.13g	KOH	7.3g	(NH ₄) ₂ SO ₄	20g
KH ₂ PO ₄	69.5g	Nitrilotriacetic acid N(CH ₂ COOH) ₂	10g	Nước cất	100mL
Nước cất	1L	MgSO ₄ .7H ₂ O)	29.59g		
		CaCl ₂ .2H ₂ O	2.52g		
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	9.25mg		
		FeSO ₄ .7H ₂ O	99mg		
		Kim Loại (dưới đây)	50mL		
		EDTA-disodium salt	0.16g		
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.55g		
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0.25g		
		MnSO ₄ .H ₂ O	0.077g		
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02g		
		Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0125g		
		Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0.009g		

Nước cất	50mL
Tổng nước cất	1L

Môi trường MSB cuối cùng gồm 40mL dd A, 20mL dd B, 5mL dd C, và 935mL nước cất.

Môi trường NB: 5g peptone, 5g NaCl, 3g Meat extract.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thu thập mẫu đất

Các mẫu đất được thu thập ở độ sâu 0-20 cm. Mẫu được đựng trong túi polythene và được chuyển về phòng thí nghiệm bảo quản lạnh ở 4°C cho đến khi tiến hành phân tích [43].

2.2.2. Làm giàu vi khuẩn

Vi khuẩn sinh enzym laccase đã được sàng lọc và phân lập từ các mẫu đất thu thập từ khu vực rừng nguyên sinh. Tất cả các mẫu thu thập được (10g của mỗi mẫu đất) đã được rây và thêm vào 100 ml môi trường MSB bổ sung 5 mM guaiacol làm chất cảm ứng và nuôi ở 37 ° C trong 7 ngày với tốc độ 120 vòng/phút. Sau đó, lấy 1 ml dịch cấy chuyển vào bình tam giác mới chứa 99ml môi trường dinh dưỡng và nuôi ở điều kiện tương tự. Quá trình này được lặp lại 5 lần để làm giàu vi khuẩn sinh enzyme laccase.

2.2.3. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn sinh enzyme phân giải lignin (laccase)

Đối với phương pháp làm giàu, tất cả các mẫu được pha loãng liên tiếp theo tỷ lệ 10^{-1} đến 10^{-6} và 100 μ l của mỗi độ pha loãng 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} đã được cấy trang trên các đĩa thạch MSB chứa 5 mM guaiacol ở 37°C. Các đĩa thạch sau đó được theo dõi liên tục hàng ngày để phát hiện sự xuất hiện của vùng màu nâu xung quanh khuẩn lạc

Đối với phương pháp phân lập bằng ichip, các thiết bị iChip chứa môi trường MSB có bổ sung Guaiacol nồng độ 5 mM được đặt trong đất tại độ sâu 20 cm nhằm tận dụng điều kiện tự nhiên cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Sau một tháng lưu giữ, các giếng thạch xuất hiện sự biến đổi màu sắc (biểu hiện của hoạt tính phân giải Guaiacol) được lựa chọn để chuyển tiếp sang môi trường MSB thạch có bổ sung Guaiacol tương ứng. Quá trình cấy chuyển được thực hiện liên tục cho đến khi thu được các chủng vi khuẩn thuần nhất[44].

Khả năng phân hủy lignin (hoạt tính enzyme laccase) của các chủng vi

khuẩn phân lập được xác định thông qua phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo phương pháp của Valizadeh và cộng sự [45]. Các chủng vi khuẩn phân lập được, được cấy trên môi trường thạch MSB có bổ sung cơ chất lần lượt là 5mM 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP), 5 mM guaiacol, và 100 ppm lignin akali. Đồng thời, 0,5 mM đồng sunfat (CuSO_4) được bổ sung vào tất cả các loại môi trường để kích hoạt và hỗ trợ hoạt tính của enzyme laccase. Đĩa thạch sau khi cấy được ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3-5 ngày. Hoạt tính enzyme được đánh giá thông qua việc quan sát sự thay đổi màu sắc sang màu cam kèm theo sự kết tủa của các hạt màu đen xung quanh khuẩn lạc (đối với cơ chất 2,6DMP) hoặc được xác định thông qua sự xuất hiện của vòng phân giải (vòng trong suốt) xung quanh khuẩn lạc (guaiacol hoặc ligin akali). Để quan sát rõ hơn các vòng phân giải này, bề mặt thạch được nhuộm với dung dịch Lugol).

2.2.4. Xác định hoạt tính enzyme laccase

Để xác định hoạt tính laccase ngoại bào của các chủng phân lập, vi khuẩn được nuôi cấy trong 25 mL môi trường MSB với giá trị OD_{600} ban đầu là 0,02; các bình nuôi cấy được ủ ở 30°C và lắc với tốc độ 150 vòng/phút (rpm). 1 mL dịch nuôi cấy được thu nhận và đem ly tâm 13.500 rpm ở 4°C trong 2 phút. Phần dịch nổi được sử dụng làm nguồn enzyme thô để xác định hoạt tính laccase.

Hoạt độ laccase được xác định thông qua khả năng oxy hóa cơ chất 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) với sự hiện diện của 0,5 mM đồng sunfat (CuSO_4). Hỗn hợp phản ứng (1ml) bao gồm 0,2 μl dịch enzyme thô, 0,2 μl cơ chất 2,6-DMP 5mM trong 0,6 μl dung dịch đệm axetat 100 mM (pH 5,0) được giữ ở 30°C trong 2 phút, sau đó đo giá trị độ hấp thụ quang học tại bước sóng 468 nm ($\epsilon_{468} = 27.500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) [46] bằng máy quang phổ UV-Vis. Một đơn vị hoạt độ enzyme(U) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để oxy hóa 1 μmol 2,6-DMP trong vòng một phút ở điều kiện thí nghiệm. Các phép đo được thực hiện lặp lại ba lần để đảm bảo tính thống kê.

Hoạt tính enzyme laccase được tính toán dựa trên công thức theo nghiên cứu của J. Siva và cs [47]:

$$E.A = (A \cdot V) / (t \cdot \epsilon \cdot v) \quad (1)$$

Trong đó:

- E.A (Enzyme Activity): Hoạt độ enzyme (U/L)
- A (Absorbance): Giá trị độ hấp thụ quang học đo được tại bước sóng cực đại ($\lambda_{\max}$).
- V: Tổng thể tích của hỗn hợp phản ứng (1 mL).
- t: Thời gian ủ phản ứng (tính bằng phút).
- ϵ (Extinction coefficient): Hệ số tắt (hệ số hấp thụ phân tử) của cơ chất ($\epsilon_{468} = 27.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).
- v: Thể tích của dịch chiết enzyme thô cho vào hỗn hợp (0.2 mL).

2.2.5. Xác định đặc điểm hình thái và hóa sinh của chủng vi khuẩn chọn lọc

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được định danh sơ bộ dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa theo hệ thống phân loại của Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology).

Về đặc điểm hình thái, chủng vi khuẩn được cấy rìa trên môi trường thạch và ủ ở 30°C trong 24–48h, quan sát các đặc điểm về màu sắc, kích thước, hình dạng.

Đặc biệt, để phân tích sâu hơn về cấu trúc siêu hiển vi và kích thước chuẩn xác, phương pháp kính hiển vi điện tử quét (SEM) được ứng dụng, cung cấp hình ảnh ba chiều chi tiết về bề mặt và sự sắp xếp của tế bào.

Song song với quan sát hình thái, các thử nghiệm sinh lý và sinh hóa được thực hiện nhằm làm sáng tỏ các đặc tính chuyển hóa đặc trưng của chủng vi khuẩn [48]. Khả năng sản sinh enzyme ngoại bào và nội bào được đánh giá qua các thử nghiệm Urease, Lipase. Đồng thời, các đặc tính chuyển hóa nitơ và carbon được xác định qua thử nghiệm khử Nitrate và khả năng sử dụng Citrate làm nguồn carbon duy nhất. Ngoài ra, bộ thử nghiệm Methyl Red (MR) và Voges-Proskauer (VP) cũng được triển khai nhằm xác định các sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men glucose.

Để xác định hoạt tính enzyme ngoại bào, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường dịch thể tương ứng ở 30°C, lắc 150 vòng/phút. Sau 24 giờ, dịch nuôi cấy được thu nhận và tiến hành ly tâm tại 10.000rpm trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ tế bào, thu dịch nổi chứa enzyme thô. Tiếp theo, 100 μL dịch nổi được cho vào các giếng thạch (đường kính 6 mm) đã được tạo sẵn trên đĩa petri chứa cơ chất đặc trưng (casein, tinh bột, CMC hoặc

chitosan). Các đĩa thạch được giữ ở 4°C trong 2 giờ để enzyme khuếch tán ổn định vào môi trường, sau đó chuyển sang ủ ở 30°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, các đĩa được nhuộm bằng dung dịch Congo Red 0,1% trong 15–20 phút. Hoạt tính protease, amylase, cellulase và chitinase được xác định dựa trên sự xuất hiện và đường kính của vòng phân giải (clear zone) bao quanh giếng thạch.

2.2.6. Định danh chủng vi khuẩn bằng phương pháp phân tích trình tự 16S rRNA

Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy để thu nhận sinh khối thuần khiết, sau đó tiến hành tách chiết DNA tổng số. Để nhận bản đoạn gene có kích thước khoảng 1,5 kb từ DNA mạch kép của các chủng này, cặp mồi 16S rDNA [27F: 5'-AGA GTT RGA TCM TGG CTC AG-3' và 1492R: 5'-CGG YTA CCT TGT TAC GAC TT-3'] đã được sử dụng. Công cụ NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) được dùng để đánh giá mức độ tương đồng DNA và so sánh trình tự. Các trình tự có độ tương đồng (identity) cao nhất sau đó được trích xuất và tiến hành căn chỉnh đa trình tự bằng công cụ ClustalW trên phần mềm MEGA (Phiên bản 12.0.10). Cuối cùng, các trình tự đã căn chỉnh được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree) bằng phần mềm MEGA theo phương pháp cực đại xác thực (Maximum Likelihood).

Bảo quản: Bảo quản chủng vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường lỏng glycerol (30%) ở -80°C.

2.2.7. Tối ưu hóa các điều kiện ảnh hưởng đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (guaiacol)

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khả năng khử lignin (guaiacol) được thực hiện theo phương pháp của Sumranwanich, T., và cộng sự [49]. Môi trường MSB bổ sung 5mM guaiacol được cấy dịch huyền phù vi khuẩn sau đó tiến hành nuôi cấy lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở các mức nhiệt độ khảo sát khác nhau (25, 35 và 45°C). Sau 72 giờ, dịch trong bình được ly tâm với tốc độ 10.000rpm trong 10 phút ở 4°C để thu dịch nổi. Hiệu suất phân hủy guaiacol được xác định gián tiếp thông qua hàm lượng phenol tổng số còn lại trong môi trường bằng cách đo độ hấp

thụ quang (OD) tại bước sóng 280 nm trên máy quang phổ UV-Vis. Hiệu suất phân hủy (H%) được tính toán cụ thể theo công thức:

$$\text{Hiệu suất(\%)} = (C_0 - C_t) / C_0 * 100 \quad (2)$$

Trong đó:

- C_0 : nồng độ ban đầu hấp thụ bước sóng 280nm lúc $t = 0h$
- C_t : nồng độ còn lại trong dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn hấp thụ bước sóng 280nm tại thời điểm t nhất định.

Ảnh hưởng của pH

Để khảo sát ảnh hưởng của pH đến khả năng phân hủy guaiacol, môi trường dinh dưỡng bổ sung 5 mM guaiacol được điều chỉnh về các giá trị pH khác nhau bao gồm 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 và 9,0 bằng dung dịch HCl hoặc NaOH 1M. Sau khi cấy dịch huyền phù vi khuẩn, các bình tam giác được tiến hành nuôi cấy lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Sau 72 giờ phản ứng, hỗn hợp dịch nuôi cấy được đem ly tâm với tốc độ 10.000 rpm trong 10 phút ở 4°C để thu dịch nổi. Hiệu suất phân hủy guaiacol được xác định theo công thức đã được mô tả ở trên.

Ảnh hưởng của nguồn Nitơ

Để khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cơ chất, môi trường MSB được bổ sung 06 nguồn nitơ khác nhau bao gồm cả hữu cơ (Meat extract, Peptone, Ure) và vô cơ (NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) với nồng độ cuối 2%. pH của môi trường được điều chỉnh về 6,0; các bình tam giác sau khi cấy vi khuẩn được tiến hành nuôi cấy lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Sau các khoảng thời gian nuôi cấy 24, 48 và 72 giờ, 1 ml dịch mẫu được thu nhận để đo mật độ quang tại bước sóng 600 nm nhằm xác định khả năng sinh trưởng của vi khuẩn. Phần dịch nuôi cấy còn lại được đem ly tâm với tốc độ 10.000 rpm trong 10 phút ở 4°C để thu dịch nổi. Hiệu suất phân hủy guaiacol được xác định theo công thức đã được mô tả ở trên.

2.2.8. Khả năng phân hủy lignin trong một số phụ phẩm nông nghiệp

2.2.8.1. Chuẩn bị phụ phẩm và tiền xử lý

Các nguồn phụ phẩm lignocellulose bao gồm rơm rạ (R), bã mía (M) và trấu (T) được thu thập, rửa sạch và sấy khô ở 55°C đến trọng lượng không

đôi. Các nguyên liệu sau đó được nghiền nhỏ đến kích thước khoảng 1–2 mm [50].

Riêng đối với trấu (T), nhằm phá vỡ cấu trúc silica và lignin bền vững, nguyên liệu được tiền xử lý bằng cách ngâm trong dung dịch KOH 2% trong 2 giờ, sau đó rửa lại bằng nước cất đến khi đạt pH trung tính và sấy khô trước khi sử dụng.

2.2.8.2. Thiết kế môi trường và điều kiện nuôi cấy

Chủng vi khuẩn được cấy chuyển vào bình tam giác chứa môi trường dinh dưỡng lỏng (NB). Bình nuôi cấy được đặt trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút, duy trì ở 30°C trong 24 giờ để vi khuẩn có hoạt tính sinh học mạnh và đồng đều nhất.

Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác chứa 200 mL môi trường dinh dưỡng cơ bản có bổ sung 2% (w/v) từng loại phụ phẩm tương ứng (R, M, hoặc T) và 0,5 mM CuSO_4 đóng vai trò là chất cảm ứng. Môi trường được khử trùng bằng nồi hấp áp lực tại 121°C trong 20 phút [50]. Sau khi để nguội, dịch huyền phù vi khuẩn được tiếp chủng vào các bình tam giác để đạt mật độ quang học ban đầu $\text{OD}_{600} = 0,02$. Các bình nuôi cấy được đặt trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút, duy trì ở nhiệt độ 30 °C trong thời gian 7 ngày (168 giờ).

2.2.8.3. Theo dõi sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn

Định kỳ mỗi 24 giờ, 2 mL dịch nuôi cấy được thu nhận để xác định mật độ tế bào (OD_{600}) bằng phương pháp đo quang phổ tại bước sóng 600 nm. Để loại bỏ nhiễu do màu sắc và các hạt lơ lửng từ phụ phẩm, giá trị (OD_{600}) thực tế được xác định bằng cách trừ đi giá trị của mẫu đối chứng âm tương ứng tại cùng thời điểm.

2.2.8.4. Xác định sự thay đổi khối lượng cơ chất và sinh khối

Tại thời điểm kết thúc thí nghiệm (168 giờ), toàn bộ lượng dịch và bã phụ phẩm trong bình nuôi cấy được lọc qua vải lọc chuyên dụng và giấy lọc đã biết trước trọng lượng để thu hồi phần bã rắn. Phần bã này bao gồm cơ chất chưa phân hủy và sinh khối vi khuẩn bám dính. Mẫu được rửa nhẹ bằng nước cất để loại bỏ muối khoáng thừa và sấy khô ở 55°C đến trọng lượng không đổi. Khả năng phân hủy của chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua sự chênh lệch khối lượng khô giữa mẫu thí nghiệm và mẫu đối chứng (ĐC)

không tiếp giống. Mọi phép đo được thực hiện lặp lại ba lần để lấy giá trị trung bình, đảm bảo tính khách quan và độ tin cậy của dữ liệu thực nghiệm. và hiệu suất phân hủy cơ chất được tính theo công thức:

$$H(\%) = (m_{ĐC} - m_{TN}) / m_{ĐC} * 100 \quad (3)$$

Trong đó:

- $H(\%)$: Hiệu suất phân hủy cơ chất (tính theo % khối lượng).
- $M_{ĐC}$: Khối lượng khô của bã rắn thu được từ bình đối chứng (không tiếp giống vi khuẩn) sau 168 giờ (g).
- M_{TN} : Khối lượng khô của bã rắn thu được từ bình thí nghiệm (có tiếp giống vi khuẩn) sau 168 giờ (g).

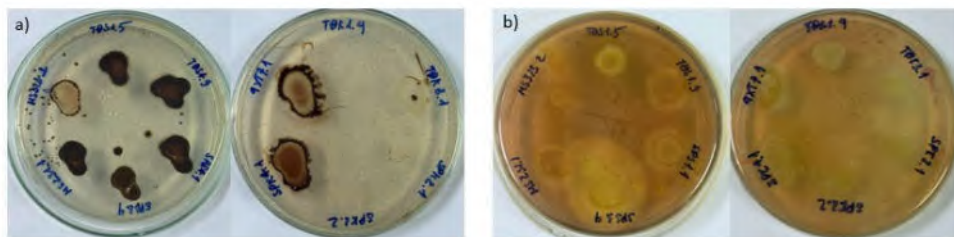
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh laccase ngoại bào

Quá trình phân lập từ 21 mẫu đất thu thập được trên môi trường khoáng tối thiểu bổ sung cơ chất chỉ thị (guaiacol) đã thu được tổng cộng 84 chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng và sinh enzyme laccase. Để đánh giá chính xác tiềm năng phân hủy sinh học lignin của các chủng vi khuẩn phân lập, quá trình sàng lọc kép đã được thực hiện nhằm xác nhận đồng thời hoạt tính enzyme đặc hiệu và khả năng phân giải polymer thực tế.

Quá trình sàng lọc sơ bộ được thực hiện trên môi trường MSB có bổ sung 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP). Kết quả ghi nhận tại Hình 3.1a cho thấy sự xuất hiện của các vòng phản ứng màu nâu/cam đậm bao quanh khuẩn lạc. Đây là kết quả của quá trình oxy hóa các nhóm methoxy-phenol bởi enzyme laccase ngoại bào, tạo ra sản phẩm quinone có màu đặc trưng. Độ đậm và đường kính của vòng màu là chỉ số định tính quan trọng phản ánh cường độ bài tiết enzyme của từng chủng vi khuẩn.

Để kiểm chứng khả năng cắt đứt các liên kết bền vững trong cấu trúc polymer của lignin kiềm, phương pháp nhuộm Lugol đã được áp dụng. Tại Hình 3.1b, sau khi nhuộm thuốc thử Lugol, các vòng phân hủy sáng màu hiện rõ trên nền thạch sậm màu. Hiện tượng này chứng minh hệ enzyme ngoại bào của vi khuẩn không chỉ oxy hóa các hợp chất đơn giản mà còn thực sự tấn công và phân giải các mạch polymer lignin phức tạp, làm mất khả năng tạo phức màu với i-ốt của hệ thống cơ chất ban đầu.



Hình 3.1. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh enzyme laccase.

(a) Trên môi trường MSB chứa cơ chất chỉ thị 2,6-DMP; (b) Trên môi trường MSB chứa cơ chất lignin alkaline nhuộm bằng thuốc thử Lugol.

Dựa trên sự kết hợp giữa tốc độ sinh trưởng và kích thước vòng phân hủy trên cả hai loại cơ chất, từ nguồn mẫu đa dạng tại các hệ sinh thái đặc thù (Xuân Thủy, Tam Đảo, Hoàng Liên và phương pháp Ichip), nghiên cứu đã

tuyển chọn được 05 chủng thể hiện hoạt tính xúc tác cao nhất. Các chủng có hoạt tính này bao gồm: **TĐS 4.9, SPS4.1, SPS3.4, MS231.1 và 4XT7.1**. Các chủng này thể hiện sự biến thiên về mặt hình thái, từ màu sắc (trắng đục, trắng ngà đến vàng đặc trưng) cho đến cấu trúc bề mặt. Kích thước khuẩn lạc dao động từ rất nhỏ (chủng 4XT7.1 chỉ từ 0,1 mm) đến mức trung bình (chủng TĐS 4.9 và MS231.1 lên đến 4,0 mm). Sự đa dạng này không chỉ thể hiện tính phong phú về loài mà còn gợi mở về các chi vi khuẩn khác nhau có khả năng thích nghi với môi trường chứa lignin. Kết quả được tổng hợp chi tiết trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 05 chủng vi khuẩn tuyển chọn.

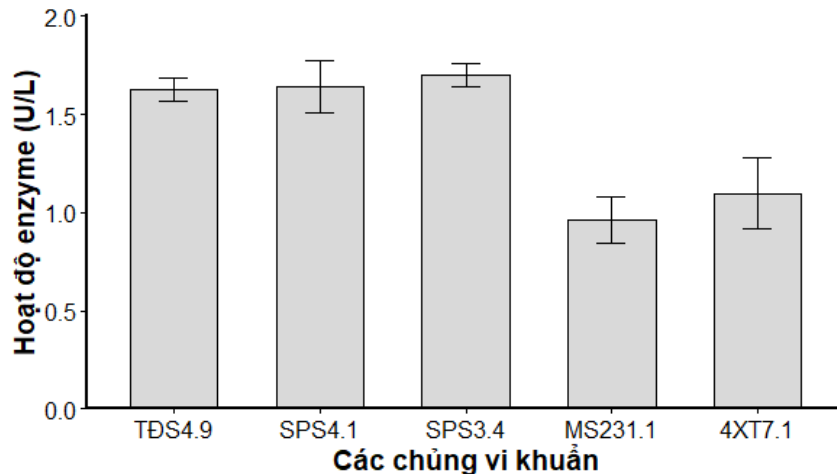
Tên chủng	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc	Kích thước (mm)
TĐS 4.9	Khuẩn lạc tròn, mép không đều, màu trắng đục, bề mặt bóng.	2,0 – 4,0
SPS4.1	Khuẩn lạc tròn, mép đều, dạng lồi, màu vàng đặc trưng.	2,0 – 3,0
SPS3.4	Khuẩn lạc tròn, bề mặt bóng, màu trắng ngà.	0,5 – 1,0
MS231.1	Khuẩn lạc tròn, lồi tâm, vùng ngoại vi trong suốt, màu vàng nhạt.	2,0 – 4,0
4XT7.1	Khuẩn lạc tròn, mép đều, bề mặt bóng, dạng lồi, màu vàng.	0,1 – 1,0

Các chủng vi khuẩn này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Đánh giá hoạt độ enzyme laccase ngoại bào của các chủng tuyển chọn

Hoạt độ enzyme laccase ngoại bào của 05 chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định sau 48 giờ nuôi cấy trong môi trường dịch thể có bổ sung guaiacol. Kết quả được trình bày trong Hình 3.2.

Kết quả cho thấy cả 05 chủng vi khuẩn đều có khả năng tiết enzyme laccase ngoại bào ra môi trường, tuy nhiên, hoạt độ có sự khác biệt đáng kể giữa các chủng. Trong đó, SPS3.4 đạt hoạt độ enzyme cao nhất với giá trị 1,699 U/L, tiếp theo là SPS 4.1 với 1,642 U/L và TĐS 4.9 với 1,625 U/L. Ngược lại, các chủng MS 231.1 và 4XT7.1 cho hoạt độ thấp hơn đáng kể, lần lượt là 0,963 U/L và 1,096 U/L.



Hình 3.2. Hoạt độ enzyme laccase ngoại bào của 05 chủng vi khuẩn tuyển chọn.

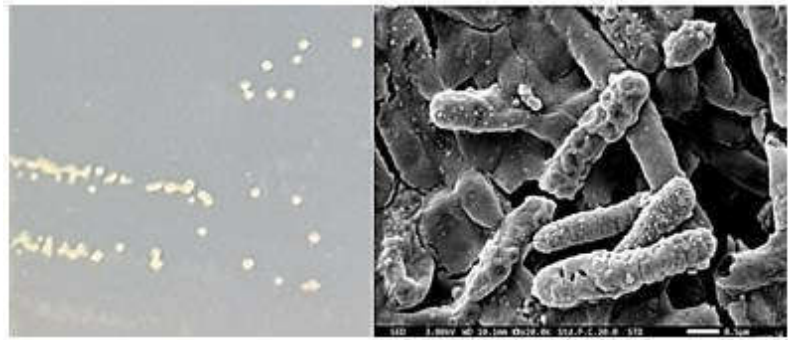
Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt độ laccase ngoại bào của 05 chủng vi khuẩn tuyển chọn dao động trong khoảng 0,963 – 1,699 U/L sau 48 giờ nuôi cấy. Trong đó, chủng SPS3.4 thể hiện tiềm năng cao nhất trong sản xuất laccase ngoại bào. Giá trị này hoàn toàn phù hợp với các công bố trước đây về hoạt tính laccase tự nhiên ở các chủng vi khuẩn hoang dại khi chưa qua tối ưu hóa điều kiện lên men. Nghiên cứu của Desai và cộng sự (2017) đã tuyển chọn được chủng *Enterobacter* spp. SB1 có hoạt tính cao nhất đạt 0,694 U/L khi sử dụng cơ chất ABTS[51]. ABTS là cơ chất không thuộc nhóm phenolic có độ nhạy cao nhưng tính đặc hiệu thấp hơn, trong khi nghiên cứu này sử dụng 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) – một hợp chất phenolic mô hình có tính chọn lọc khắt khe và đặc hiệu cao đối với enzyme laccase. Việc enzyme laccase được tiết ra ngoại bào là một đặc điểm có ý nghĩa quan trọng trong ứng dụng phân hủy lignin, vì laccase ngoại bào có thể tiếp cận trực tiếp với cấu trúc lignin phức tạp trong môi trường mà không cần tế bào vi khuẩn phải tiếp xúc trực tiếp với cơ chất. Laccase có thể tồn tại ở ngoại bào, chu chất hoặc nội bào, và đều có tiềm năng xúc tác cho quá trình phân hủy lignin cũng như các ứng dụng công nghệ sinh học quan trọng [22].

Tổng hợp các kết quả về hoạt độ laccase ngoại bào, kết hợp kết quả sàng lọc sơ bộ, chủng SPS3.4 được xác định là chủng vi khuẩn tiềm năng nhất trong số 05 chủng tuyển chọn và được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo về tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, đặc tính enzyme ngoại bào và khả năng phân hủy lignin trong các ứng dụng môi trường.

3.3. Đặc điểm chủng SPS3.4

3.3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào

Sau khi tiến hành nuôi cấy vi khuẩn SPS3.4 trên môi trường thạch dinh dưỡng (NA) ở 30°C trong 48 giờ, kết quả quan sát hình thái có thể hiện qua Hình 3.3.



Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc (trái) và ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét SEM (phải) của chủng SPS3.4.

Quan sát cho thấy khuẩn lạc của loài SPS3.4 có màu trắng ngà, lồi, bề mặt ướt, mép khuẩn lạc không đều và có xu hướng lan rộng trên bề mặt thạch. Hình ảnh được chụp bằng kính hiển thị vi điện tử quét (SEM) cho thấy tế bào vi khuẩn có dạng trực khuẩn (hình que ngắn), kích thước tương đối đồng đều, bề mặt tế bào hơi nhám, phân bố riêng lẻ hoặc tập hợp thành cụm nhỏ.

3.3.2. Đặc tính sinh hóa

Đặc tính sinh hóa của chủng SPS3.4 được xác định thông qua các thử nghiệm tiêu chuẩn sinh hóa. Kết quả được hiển thị trong Bảng 3.2.

Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn SPS3.4 âm tính với các thử nghiệm Methyl Red (MR), Voges–Proskauer (VP), khả năng khử nitrat và sử dụng citrate. Ngược lại, chủng này thể hiện hoạt tính enzyme ngoại bào mạnh thông qua phản ứng dương tính với urease, lipase, protease và cellulase. Tuy nhiên, SPS3.4 không có khả năng phân giải tinh bột (amylase) và chitin (kitinase).

Kết quả phản ứng âm tính với các thử nghiệm MR và VP cho thấy chủng SPS3.4 không thực hiện lên men glucose theo con đường sinh acid hỗn hợp hay tạo acetoin. Tương tự, việc không thể hiện khả năng khử nitrat và sử dụng citrate chứng tỏ chủng này không sử dụng nitrat như chất nhận điện tử cuối cùng trong điều kiện thiếu khí và không có khả năng đồng hóa citrate làm nguồn carbon duy nhất.

Bảng 3.2. Đặc điểm sinh hóa và hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng vi khuẩn SPS3.4.

Thí nghiệm	Chủng SPS3.4
Hình dạng	Trực khuẩn
MR test	-
VP test	-
Khử nitrat	-
Citrate test	-
Urease test	+
Lipase test	+
Enzyme protease	+
Enzyme amylase	-
Enzyme cellulase	+
Enzyme kitinase	-

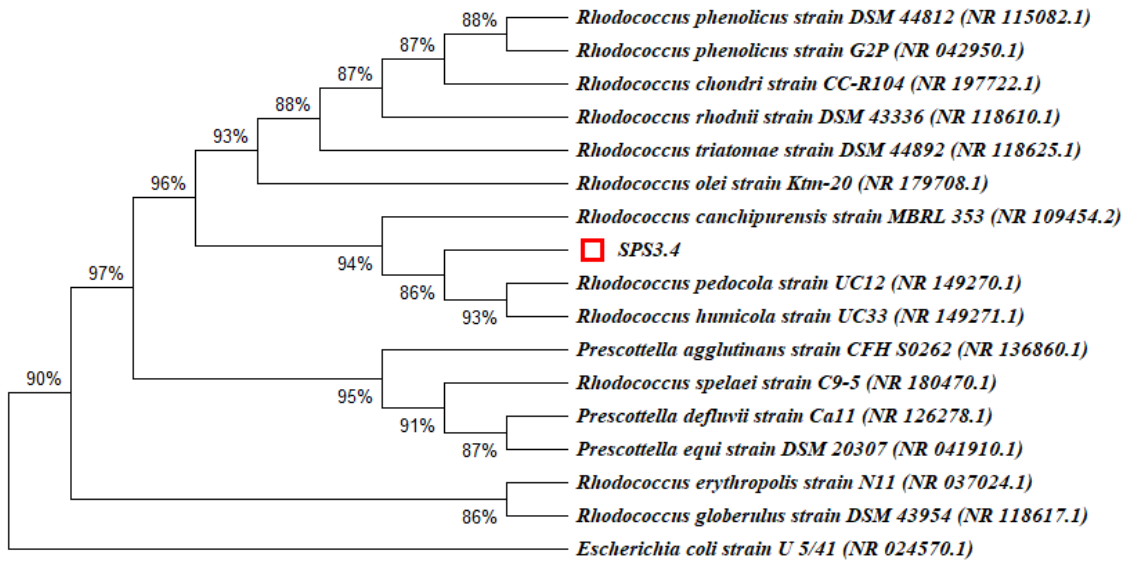
(Ghi chú: (+): kết quả dương tính; (-): kết quả âm tính)

Đặc biệt, chủng SPS3.4 thể hiện hoạt tính dương tính mạnh với các enzyme urease, lipase, protease và đặc biệt là cellulase. Hoạt tính cellulase dương tính có ý nghĩa quan trọng trong bối cảnh nghiên cứu, bởi cellulose và lignin là hai thành phần chính cấu tạo nên phức hợp lignocellulose bền vững. Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các vi khuẩn có khả năng sinh enzyme oxy hóa lignin thường đồng thời sở hữu hoạt tính cellulase để hỗ trợ quá trình xâm nhập và phân giải sinh khối thực vật [12]. Ngoài ra, sự hiện diện của protease và lipase ngoại bào tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng enzyme laccase ra môi trường bên ngoài để tham gia vào quá trình oxy hóa các cấu trúc vòng phenolic phức tạp trong phân tử lignin. Kết quả âm tính với amylase và kitinase cho thấy chủng SPS3.4 có phổ cơ chất enzyme ngoại bào mang tính chọn lọc cao.

3.3.3 Định danh chủng SPS3.4

Để xác định chính xác vị trí phân loại, chủng SPS3.4 đã được tiến hành

giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả thu được sau đó được so sánh với các trình tự tương đồng trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining và được kiểm định độ tin cậy bằng phương pháp bootstrap với 1000 lần lặp lại. Mối quan hệ phát sinh giữa chủng SPS3.4 và các loài vi khuẩn liên quan được trình bày tại **Hình 3.4**.



Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loại của chủng SPS3.4 dựa trên trình tự gen 16S rRNA được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining.

Kết quả phân tích cây di truyền cho thấy chủng SPS3.4 thiết lập một nhánh tiến hóa chung rất rõ ràng với các đại diện thuộc chi *Rhodococcus* với độ tin cậy bootstrap tại nút gốc lên đến 96%. Trong đó, chủng SPS3.4 phân cụm trực tiếp và có mối quan hệ phát sinh chủng loại gần gũi nhất với hai loài *Rhodococcus pedocola* strain UC12 (mã số NR 149270.1) và *Rhodococcus humicola* strain UC33 (mã số NR 149271.1) với giá trị hỗ trợ nút (bootstrap value) đạt 86%. Nhánh kết hợp mở rộng của các chủng này với loài *Rhodococcus canchipurensis* strain MBRL 353 cũng ghi nhận chỉ số bootstrap rất cao, lên tới 94%, khẳng định độ tin cậy mạnh mẽ của cấu trúc phân nhánh di truyền.

Kết quả quan sát đại thể, vi thể và ảnh chụp SEM của chủng nghiên cứu hoàn toàn phù hợp với các mô tả về chi *Rhodococcus* theo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Chi vi khuẩn này đặc trưng bởi chu kỳ đa hình thái 'cầu - que' (rod-coccus cycle) phụ thuộc vào pha sinh trưởng. Cụ thể, tế

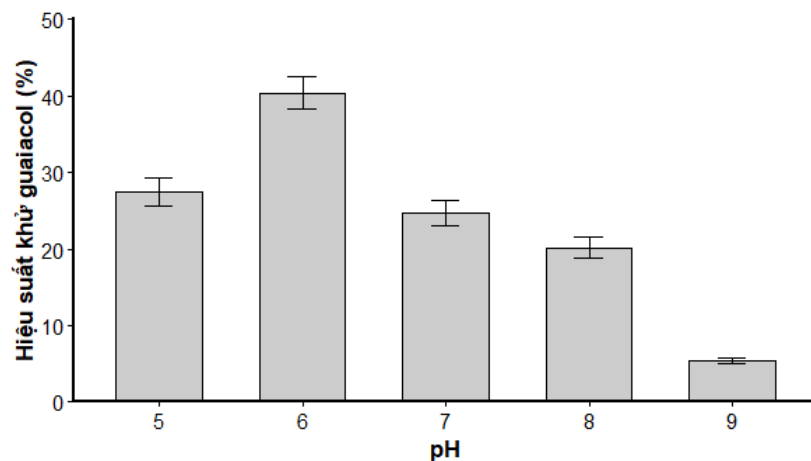
bào tồn tại ở dạng trực khuẩn trong pha lũy tiến để tối ưu hấp thụ dinh dưỡng, và chuyển sang dạng hình cầu ở pha tĩnh nhằm tăng khả năng chống chịu môi trường. Đặc tính biến đổi hình thái này cũng chính là nguồn gốc tên gọi *Rhodococcus*, dù phần lớn chu kỳ phát triển mạnh của chúng có dạng trực khuẩn [52]. Do đó, chủng vi khuẩn SPS3.4 được đặt tên là *Rhodococcus* sp. SPS3.4 và trình tự gen 16Sr DNA đã được lưu trữ trên Genbank với mã số truy cập là PZ468419.

3.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4

Sau khi đã tuyển chọn được chủng SPS3.4 có hoạt lực laccase ngoại bào cao nhất, chúng tôi tiến hành khảo sát các điều kiện nuôi cấy tối ưu nhằm khai thác tối đa tiềm năng phân hủy lignin của chủng này.

3.4.1. Ảnh hưởng của pH đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4

Để đánh giá ảnh hưởng của pH đến chủng SPS3.4, thí nghiệm được tiến hành trong dải pH từ 5,0 đến 9,0 với cơ chất guaiacol sau 72 giờ nuôi cấy. Kết quả được trình bày tại Hình 3.5.



Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hiệu suất phân hủy Guaiacol của chủng SPS3.4 sau 72 giờ nuôi cấy.

Kết quả thực nghiệm cho thấy chủng SPS3.4 có khả năng thích nghi và hoạt động trong dải pH khá rộng (từ 5,0 đến 9,0). Tuy nhiên, hiệu suất phân hủy có sự biến thiên rõ rệt theo giá trị pH của môi trường.

Hiệu suất phân hủy đạt giá trị cực đại tại pH 6,0 với 40,37%. Tại các giá trị pH lân cận là 5,0 và 7,0, hiệu suất phân hủy ghi nhận lần lượt là

27,48% và 24,68%, chứng minh chủng vẫn duy trì hoạt tính tốt trong môi trường từ acid nhẹ đến trung tính. Khi môi trường chuyển sang điều kiện kiềm (pH 8,0 và 9,0), hiệu suất phân hủy giảm, chỉ còn lần lượt 20,19% và 5,39%. Đặc biệt tại pH 9,0, hoạt tính phân hủy bị ức chế gần như hoàn toàn.

Kết quả nghiên cứu khẳng định pH môi trường là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và hoạt tính phân giải lignin của chủng *Rhodococcus* sp. SPS3.4. Việc chủng thể hiện hoạt tính tối ưu tại pH 6,0 sau đó giảm dần ở pH kiềm, phù hợp với đặc tính sinh hóa của hệ enzyme laccase ngoại bào – một enzyme oxy hóa khử trong quá trình phân hủy lignin.

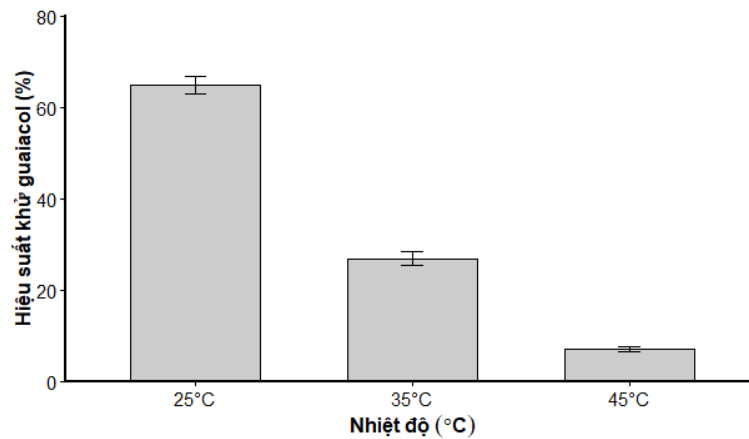
Theo Mate & Alcalde (2017), hoạt tính laccase phụ thuộc chặt chẽ vào pH do yếu tố này trực tiếp ảnh hưởng đến trạng thái ion hóa của các acid amin tại trung tâm hoạt động và sự chênh lệch thế điện cực giữa enzyme và cơ chất. Trong môi trường acid nhẹ, cấu hình không gian của enzyme được duy trì ổn định, giúp tối ưu hóa quá trình truyền electron và oxy hóa các hợp chất phenolic như guaiacol[53].

Bên cạnh đó, Patel và cộng sự nghiên cứu trên enzyme laccase từ *Pleurotus ostreatus* cho thấy pH tối ưu đối với guaiacol là khoảng 5,5–6,7, sau đó hoạt tính giảm mạnh khi pH tăng lên[54]. Kết quả này tương đồng với chủng SPS3.4, hiệu suất tối ưu tại pH 6,0 và giảm đáng kể từ pH 7 (24,68%) xuống pH 9 (5,39%).

Sự suy giảm hoạt tính ở pH kiềm (pH 8–9) có thể được lý giải bởi nhiều cơ chế. Thứ nhất, pH cao làm thay đổi điện tích bề mặt enzyme, ảnh hưởng đến khả năng liên kết enzyme – cơ chất. Thứ hai, trung tâm hoạt động chứa ion Cu^{2+} của laccase dễ bị biến đổi trong môi trường kiềm, dẫn đến giảm hiệu quả xúc tác. Ngoài ra, các hợp chất phenolic như guaiacol có xu hướng ít bị oxy hóa hơn trong môi trường kiềm, làm giảm hiệu suất phân hủy[55].

3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4

Bên cạnh pH, nhiệt độ là yếu tố vật lý then chốt quyết định đến tốc độ của các phản ứng sinh hóa và độ bền của cấu trúc enzyme ngoại bào. Để xác định dải nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng và hoạt tính xúc tác của chủng SPS3.4, thí nghiệm đã được triển khai tại ba mức nhiệt độ đại diện: 25°C, 35°C và 45°C. Kết quả thực nghiệm được trình bày tại Hình 3.6.



Hình 3.6. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hiệu suất phân hủy Guaiacol của chủng SPS3.4 sau 72 giờ nuôi cấy.

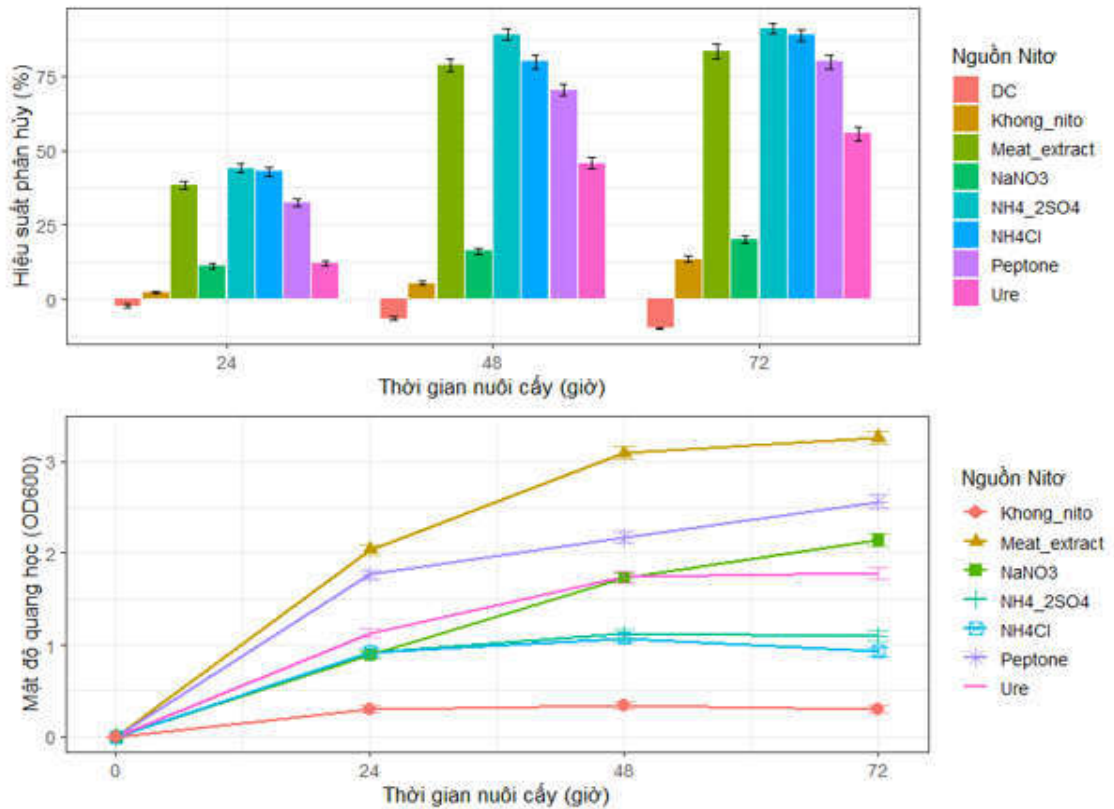
Kết quả cho thấy chủng SPS3.4 có khả năng phân hủy guaiacol trong khoảng nhiệt độ từ 25–45°C, tuy nhiên hiệu suất có sự khác biệt rõ rệt. Ở 25°C, hiệu suất phân hủy đạt giá trị cao nhất là 64,79%, cho thấy đây là điều kiện thuận lợi nhất cho hoạt động phân hủy. Khi nhiệt độ tăng lên 35°C, hiệu suất giảm mạnh xuống còn 26,95%, tương ứng giảm hơn 2 lần so với điều kiện tối ưu. Ở 45°C, hiệu suất tiếp tục giảm sâu, chỉ còn 7,13% , cho thấy hoạt tính phân hủy gần như bị ức chế ở nhiệt độ cao. Như vậy, nhiệt độ tối ưu cho quá trình phân hủy guaiacol của chủng SPS3.4 được xác định là khoảng 25°C.

Sự biến thiên của hiệu suất phân hủy theo nhiệt độ phản ánh đặc tính sinh học nhạy cảm của enzyme laccase ngoại bào đối với các tác động nhiệt. Về mặt cơ chế, nhiệt độ ảnh hưởng trực tiếp đến cấu trúc không gian và độ ổn định của protein enzyme. Ở dải nhiệt độ tối ưu (25–30°C), enzyme duy trì được cấu hình bậc ba bền vững, đảm bảo sự tương thích tối đa giữa trung tâm hoạt động và cơ chất nhằm xúc tác phản ứng oxy hóa hiệu quả. Ngược lại, khi nhiệt độ vượt quá ngưỡng giới hạn, các liên kết yếu như liên kết hydro và tương tác kỵ nước bị phá vỡ, dẫn đến hiện tượng biến tính enzyme và làm mất khả năng xúc tác. Kết quả này có sự nhất quán với các công bố khoa học gần đây, cụ thể nghiên cứu của Wang và cộng sự (2023) chỉ ra rằng hoạt tính laccase vi khuẩn thường đạt tối ưu trong khoảng 25–35°C và sụt giảm đáng kể khi nhiệt độ tăng cao[26].

3.4.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và phân hủy hợp chất mô hình lignin (Guaiacol) của chủng SPS3.4

Nguồn nitơ đóng vai trò thiết yếu trong việc tổng hợp protein, axit

nucleic và đặc biệt là các enzyme ngoại bào. Để tìm kiếm nguồn dinh dưỡng tối ưu cho chủng SPS3.4, nghiên cứu đã khảo sát 06 nguồn nitơ khác nhau bao gồm cả hữu cơ (Meat extract, Peptone, Ure) và vô cơ (NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Kết quả được thể hiện tại Hình 3.7.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến mật độ tế bào (OD_{600}) và hiệu suất phân hủy Guaiacol của chủng SPS3.4.

Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng *SPS3.4* có khả năng chuyển hóa đa dạng các nguồn nitơ được khảo sát, với mật độ tế bào tăng trưởng tốt hơn so với đối chứng (không bổ sung nitơ).

Chiết xuất thịt là nguồn cơ chất tối ưu nhất cho sự phát triển của chủng, đạt giá trị mật độ quang cực đại $\text{OD}_{600} = 3,262$ sau 72 giờ nuôi cấy. Theo sau là peptone với OD_{600} đạt 2,563 tại cùng thời điểm. Hiệu suất sinh trưởng cao trên nhóm nitơ hữu cơ cho thấy chủng SPS3.4 ưu tiên sử dụng các nguồn acid amin và peptide có sẵn để đẩy nhanh quá trình tổng hợp sinh khối.

NaNO_3 và urea hỗ trợ sinh trưởng tốt hơn so với nhóm muối ammonium, với giá trị OD_{600} lần lượt đạt 2,146 và 1,779 sau 72 giờ. Ngược lại, NH_4Cl (0,929) và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,099) ghi nhận mức tăng trưởng thấp hơn, đồng thời có xu hướng bão hòa hoặc suy giảm nhẹ trong giai đoạn từ 48 đến

72 giờ, có thể do sự thay đổi pH môi trường trong quá trình hấp thụ ion NH_4^+ .

Thí nghiệm không chứa nitơ duy trì mật độ tế bào ở mức rất thấp OD_{600} dao động 0,298 - 0,337, khẳng định nitơ là yếu tố hạn chế và đóng vai trò tiên quyết đối với hoạt động sống của chủng nghiên cứu.

Khả năng phân hủy guaiacol của chủng SPS3.4 được đánh giá gián tiếp thông qua sự giảm độ hấp thụ quang học của dịch nuôi cấy tại bước sóng 280 nm (OD_{280}) — bước sóng đặc trưng cho các hợp chất thơm phenolic, trong đó có guaiacol và các sản phẩm phân hủy của nó. Kết quả thực nghiệm trình bày tại Hình 3.7 thể hiện sự khác biệt về vai trò của các nguồn nitơ đối với khả năng phân hủy guaiacol của SPS3.4.

Nhóm hiệu suất cao: Nguồn nitơ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đạt hiệu suất khử guaiacol cao nhất là 91,14% sau 72 giờ nuôi cấy. Theo sau là NH_4Cl và chiết xuất thịt (meat extract) với hiệu suất lần lượt đạt 88,97% và 83,36%.

Nhóm hiệu suất trung bình và thấp: Nghiệm thức peptone đạt hiệu suất 79,91%, trong khi urea chỉ đạt 55,67%. Đáng chú ý, mặc dù NaNO_3 hỗ trợ sinh trưởng khá tốt ở các thí nghiệm trước, nhưng lại cho hiệu suất khử guaiacol thấp nhất trong số các nghiệm thức có bổ sung nitơ, chỉ đạt 20,04%.

Tại thí nghiệm không bổ sung nitơ, hoạt động oxy hóa guaiacol diễn ra không đáng kể với hiệu suất tối thiểu là 13,45%, khẳng định vai trò tiên quyết của nitơ trong việc kích hoạt hệ enzyme ligninolytic ngoại bào.

Giá trị hấp thụ tại bước sóng 280nm của mẫu đối chứng có xu hướng tăng nhẹ theo thời gian (tương ứng với hiệu suất khử âm trên đồ thị). Hiện tượng này được lý giải bởi sự tự oxy hóa tự nhiên của cơ chất Guaiacol trong điều kiện nuôi cấy aerobic, tạo thành các dẫn xuất quinone có khả năng hấp thụ mạnh ở vùng tử ngoại. Ngoài ra, sự biến đổi của các thành phần hữu cơ trong môi trường nuôi cấy cũng góp phần làm tăng độ hấp thụ nền. Tuy nhiên, sự gia tăng này là không đáng kể so với sự sụt giảm OD mạnh mẽ ở các nghiệm thức có sự hiện diện của chủng SPS3.4, điều này càng làm nổi bật hoạt tính xúc tác mạnh mẽ của enzyme laccase ngoại bào trong việc bẻ gãy cấu trúc vòng thơm của cơ chất.

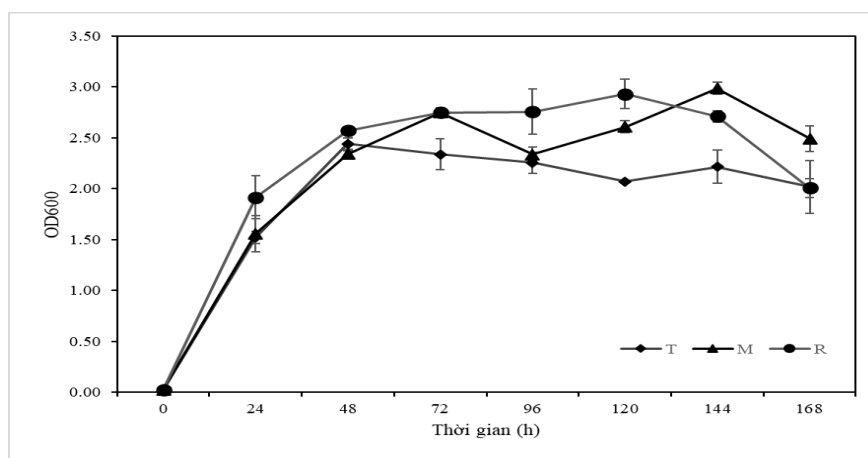
Kết quả nghiên cứu cho thấy các nguồn nitơ hữu cơ đặc biệt là dịch chiết thịt và peptone, kích thích sinh trưởng của chủng SPS3.4 tốt hơn đáng kể so với các nguồn nitơ vô cơ. Điều này phù hợp với đặc điểm dinh dưỡng

của nhiều vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus*, vốn có hệ enzyme trao đổi chất đa dạng giúp đồng hóa nhiều loại hợp chất nitơ hữu cơ phức tạp [56].

Dựa trên các kết quả khảo sát thực nghiệm đa yếu tố, các điều kiện môi trường tối ưu giúp chủng SPS3.4 phát huy tối đa tiềm năng sinh học đã được xác định một cách hệ thống. Về yếu tố vật lý, giá trị pH 6,0 được ghi nhận là điểm tối ưu cho cả quá trình gia tăng mật độ tế bào lẫn hoạt tính enzyme laccase ngoại bào, đồng thời nhiệt độ 25°C cho thấy sự tương thích hoàn hảo với đặc tính sinh lý của chủng, giúp đạt hiệu suất phân hủy hợp chất mô hình lignin vượt ngưỡng 60%. Đặc biệt, trong nghiên cứu về nguồn dinh dưỡng nitơ, mặc dù các nguồn hữu cơ như dịch chiết thịt giúp thúc đẩy sinh khối mạnh mẽ, nhưng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mới là tác nhân kích thích sinh laccase hiệu quả nhất, đẩy hiệu suất phân hủy cơ chất lên tới trên 90%. Sự kết hợp đồng nhất giữa các thông số tối ưu này không chỉ khẳng định năng lực chuyên hóa của chủng SPS3.4 trong việc xử lý các liên kết polymer phức tạp mà còn tạo tiền đề vững chắc cho việc triển khai các mô hình xử lý lignin ở quy mô thực tế, đảm bảo tính kinh tế nhờ khả năng vận hành ổn định tại điều kiện nhiệt độ thường và dải pH thích nghi rộng.

3.5. Khả năng phân hủy lignin trong một số phụ phẩm nông nghiệp của chủng SPS3.4

Việc đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy lignin trên các nguồn phụ phẩm nông nghiệp (rơm rạ, bã mía, trấu) là bước quan trọng để xác định tính khả thi của việc ứng dụng chủng SPS3.4 vào thực tiễn xử lý phế phẩm hữu cơ.



Hình 3.8. Tốc độ sinh trưởng của chủng SPS3.4 trên các nguồn phụ phẩm trấu (T), bã mía (M), rơm rạ (R).

Quá trình khảo sát khả năng thích nghi và sử dụng lignin từ các phụ

phẩm nông nghiệp (trấu, bã mía, rơm rạ) làm nguồn carbon và năng lượng duy nhất của chủng SPS3.4 cho thấy những diễn biến sinh trưởng đặc trưng. Trong 48 giờ đầu của pha lũy thừa, chủng vi khuẩn thể hiện tốc độ sinh trưởng mạnh mẽ nhất trên giá thể rơm rạ (R) với giá trị OD600 đạt 2,568, cao hơn so với trấu (2,440) và bã mía (2,338). Điều này có thể giải thích do cấu trúc lignocellulose của rơm rạ tương đối lỏng lẻo hơn, tạo điều kiện cho vi khuẩn dễ dàng tiếp cận các nguồn dinh dưỡng để phân hủy ban đầu.

Tuy nhiên, bã mía (M) lại thể hiện là môi trường nuôi cấy tiềm năng và bền vững nhất cho chủng SPS3.4 trong giai đoạn kéo dài. Mật độ tế bào trên môi trường bã mía duy trì sự gia tăng ổn định và đạt giá trị cực đại (OD600 = 2,985) tại thời điểm 144 giờ, trong khi các mẫu rơm rạ và trấu đã có dấu hiệu suy giảm mật độ tế bào sau 120 giờ. Khả năng duy trì sinh khối cao trên bã mía cho thấy hệ enzyme ngoại bào của chủng SPS3.4, đặc biệt là laccase, đã hoạt động hiệu quả trong việc cắt đứt các liên kết bền vững trong cấu trúc polymer của lignin bã mía để giải phóng các hợp chất hữu cơ đơn giản cung cấp cho quá trình trao đổi chất.

Khả năng sinh trưởng ổn định của chủng SPS3.4 trên cả ba loại phụ phẩm nông nghiệp (trấu, bã mía và rơm rạ) khẳng định tiềm năng của chủng này trong việc chuyển hóa lignin và phức hệ lignocellulose làm nguồn carbon và năng lượng. Hiệu quả phân hủy các loại phụ phẩm nông nghiệp của chủng SPS3.4 sau 7 ngày nuôi cấy được thể hiện qua sự thay đổi khối lượng chất khô còn lại.

Bảng 3.3. Hiệu suất phân hủy và khả năng làm giảm khối lượng các nguồn sinh khối lignocellulose của chủng vi khuẩn SPS3.4

Nguyên liệu	ĐC (g)	Khối lượng trung bình (g)	% Khối lượng giảm so với ĐC ban đầu	% Khối lượng giảm so với ĐC không chứa vi khuẩn
T	4.00	3.46 ± 0.012	13.5±0.30	10.13±0.85
ĐC T	4.00	3.85± 0.005	3.75±0.12	-
M	4.00	2.95±0.018	26.25±0.45	21.33±1.12
ĐC M	4.00	3.75±0.006	6.25±0.15	-
R	4.00	3.29±0.014	17.75±0.35	13.65±0.92
ĐC R	4.00	3.81±0.005	4.75±0.12	-

(Ghi chú: ĐC = Đối chứng bổ sung lúc ban đầu; T = trấu + vi khuẩn; M = bã mía + vi khuẩn; R = rơm rạ + vi khuẩn; ĐC T, ĐC M, ĐC R = đối chứng tương ứng của từng cơ chất không bổ sung vi khuẩn)

Kết quả thực nghiệm tại Bảng 3.3 cho thấy sự khác biệt về khả năng phân giải các nguồn sinh khối khác nhau bao gồm trấu, rơm rạ và bã mía của chủng SPS3.4. Mức giảm khối lượng ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn đều cao hơn so với cả đối chứng ban đầu (4,00 g) và đối chứng không bổ sung vi khuẩn tương ứng, cho thấy sự tham gia của chủng SPS3.4 trong quá trình phân hủy cơ chất.

Khi đánh giá theo chỉ tiêu phần trăm khối lượng giảm so với đối chứng không chứa vi khuẩn, hiệu suất phân hủy của chủng SPS3.4 có sự khác biệt giữa các loại cơ chất. Cụ thể, bã mía đạt giá trị cao nhất ($21,33 \pm 1,12\%$), tiếp theo là rơm rạ ($13,65 \pm 0,92\%$) và thấp nhất là trấu ($10,13 \pm 0,85\%$).

Xét theo chỉ tiêu phần trăm khối lượng giảm so với khối lượng ban đầu (4,00 g), tổng lượng cơ chất bị phân hủy trong các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn lần lượt là $26,25 \pm 0,45\%$ đối với bã mía, $17,75 \pm 0,35\%$ đối với rơm rạ và $13,50 \pm 0,30\%$ đối với trấu. Các giá trị này đều cao hơn đáng kể so với các nghiệm thức đối chứng không có vi khuẩn tương ứng (bã mía: $6,25 \pm 0,15\%$; rơm rạ: $4,75 \pm 0,12\%$; trấu: $3,75 \pm 0,12\%$).

Kết quả này cho thấy bã mía là nguồn carbon phù hợp nhất, trong khi cấu trúc giàu silica và lignin của trấu tạo ra rào cản đáng kể đối với hoạt tính phân hủy của chủng nghiên cứu.

Trong số ba loại cơ chất, bã mía cho hiệu suất phân hủy cao nhất với mức giảm khối lượng $21,33 \pm 1,12\%$ so với đối chứng không vi khuẩn. Hiệu suất phân hủy vượt trội trên bã mía có thể được lý giải thông qua các đặc điểm cấu trúc vật lý và hóa học đặc thù. Bã mía sau khi bị ép cơ học đã phá vỡ cấu trúc nguyên bản, tạo ra hệ thống vi mao quản xốp với diện tích bề mặt tiếp xúc lớn. Các nghiên cứu về đặc điểm hình thái và hóa học khẳng định rằng, việc phân tách lignin đã phá vỡ mạng lưới liên kết giữa các tế bào thực vật vốn được định hình bởi polymer này. Quá trình này không chỉ làm giãn nghẽn các bó sợi mà còn hình thành hệ thống mao quản và các khoảng trống cấu trúc bên trong vách tế bào. Chính sự chuyển đổi từ cấu trúc chặt chẽ sang dạng "mở" và xốp đã loại bỏ rào cản vật lý, tạo điều kiện thuận lợi cho các enzyme xúc tác dễ dàng thâm nhập và tiếp cận các vùng cellulose nội tại [57]. Về mặt thành phần hóa học, bã mía (tính theo khối lượng khô) chứa khoảng 35–45% cellulose, 26–35% hemicellulose và đặc biệt là hàm lượng lignin

tương đối thấp (11–25%), điều này tạo nên cấu trúc lỏng lẻo và dễ tiếp cận, giúp vi sinh vật thực hiện quá trình phân giải thuận lợi hơn so với các loại phụ phẩm khác[3].

Đối với cơ chất rơm rạ, chủng SPS3.4 thể hiện hiệu suất phân hủy ở mức trung bình với tỷ lệ giảm khối lượng đạt $13,65 \pm 0,92\%$ so với đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Kết quả này cho thấy chủng vi khuẩn có khả năng tham gia vào quá trình phân giải lignocellulose nhưng chưa đạt hiệu quả cao như trên bã mía. Ngoài ra, cấu trúc lignocellulosic của rơm rạ tương đối "mở" hơn trấu, nên hàm lượng silica bề mặt thấp hơn, tuy nhiên sự liên kết chặt chẽ giữa lignin, hemicellulose và cellulose trong thành tế bào phá vỡ vẫn tạo rào cản đáng kể cho quá trình phân tích[58].

Ngược lại, trấu thể hiện hiệu suất phân giải thấp nhất trong ba loại phụ phẩm khảo sát, với mức hiệu suất giảm khối lượng đạt $10,13 \pm 0,85\%$ so với đối chứng không tiếp giống. Kết quả này phản ánh đặc điểm cấu trúc đặc thù của trấu: lớp silica dày đặc bao phủ bề mặt ngoài cùng chiếm 50–70%, đóng vai trò như một rào cản vật lý, hạn chế đáng kể sự xâm nhập của vi khuẩn và khả năng tiếp cận của hệ enzyme ligninolytic ngoại bào vào các thành phần hữu cơ bên trong [59]. Tuy nhiên, việc giảm hơn 10% khối lượng là minh chứng chủng SPS3.4 trong việc vượt qua rào cản cấu trúc bền vững này để thực hiện quá trình phân giải sinh học.

Tổng hợp các kết quả thực nghiệm, chủng *Rhodococcus* sp. SPS3.4 được xác nhận có năng lực phân hủy sinh học đối với cả ba loại phụ phẩm lignocellulose phổ biến tại Việt Nam với hiệu suất giảm khối lượng thực tế sau 168 giờ dao động từ 10,13% đến 21,33%, trong đó bã mía là cơ chất phù hợp nhất, kế đến là rơm rạ và trấu. Trong nghiên cứu của Zhang và cộng sự(2025), tổ hợp vi khuẩn SXJG15 sau 18 ngày nuôi cấy ở 25°C đạt hiệu suất phân hủy tổng thể rơm rạ là 52,5%, bao gồm 60,2% cellulose, 76,3% hemicellulose và 40,7% lignin — kết quả này đạt được khi sử dụng tổ hợp vi khuẩn đa chủng trong thời gian dài hơn và điều kiện nuôi cấy được tối ưu hóa[60]. Điều này cho thấy hiệu suất của đơn chủng trong điều kiện chưa tối ưu sẽ thấp hơn đáng kể, từ đó để nâng cao hiệu quả phân hủy rơm rạ của chủng SPS3.4, cần kết hợp tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và xây dựng tổ hợp vi khuẩn hỗ trợ có hoạt tính cellulase và xylanase cao.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Chủng SPS3.4 phân lập từ đất rừng được định danh là *Rhodococcus sp.* (PZ468419), thể hiện hoạt tính enzyme laccase ngoại bào cao cùng với protease và cellulase.

Tại 25°C và pH 6,0 hiệu suất khử guaiacol đạt 64,79% và tăng mạnh lên trên 91% khi bổ sung amoni sunfat.

Chủng *Rhodococcus sp.* SPS3.4 có khả năng phân hủy phụ phẩm nông nghiệp, phần trăm khối lượng giảm của bã mía, rơm rạ và vỏ trấu lần lượt là 21,33%, 13,65% và 10,13% trong vòng 168 giờ.

KIẾN NGHỊ

Áp dụng Mô hình đáp ứng bề mặt (Surface Response Methodology - RSM), cụ thể là thiết kế Box-Behnken hoặc Central Composite Design (CCD) để định chính xác các giá trị tối ưu và sự tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng (như nhiệt độ, pH, nồng độ nguồn nitơ và nồng độ cơ chất) đến quá trình sinh tổng hợp enzyme, từ đó khai thác tối đa tiềm năng sinh học của chủng SPS3.4 trong điều kiện sản xuất quy mô lớn.

Tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện môi trường (pH, nhiệt độ, nồng độ cơ chất) và khảo sát ảnh hưởng của các chất cảm ứng để nâng cao hơn nữa hiệu suất bài tiết enzyme laccase và khả năng phân hủy sinh khối.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ojo, A.O., 2023, An Overview of Lignocellulose and Its Biotechnological Importance in High-Value Product Production, 9(11), 990.
2. Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., and Paszczyński, A., 2017, Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution, *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 941-962. 10.1093/femsre/fux049 %J FEMS Microbiology Reviews
3. Anwar, Z., Gulfraz, M., and Irshad, M., 2014, Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7, 163–173. 10.1016/j.jrras.2014.02.003
4. Schoenherr, S., Ebrahimi, M., and Czermak, P., 2018, Lignin Degradation Processes and the Purification of Valuable Products, In (Ed.)^(Eds.), *Lignin - Trends and Applications* (pp.
5. Zhou, H., Guan, Y., Yan, X., Pan, Z., Xu, J., Dai, L., Zhang, M., and Chuanling, S., 2023, All-lignocellulose-based hard bioplastic, *Industrial Crops and Products*, 193, 116164. 10.1016/j.indcrop.2022.116164
6. Silva, C.O.G., Vaz, R.P., and Filho, E.X.F., 2018, Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2), 277-289. <https://doi.org/10.1002/bbb.1832>
7. Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H.M.N., Hu, H., and Zhang, X., 2017, Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products—A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 447-458. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.133>
8. Paul, M., Pandey, N.K., Banerjee, A., Shrotri, G.K., Tomer, P., Gazara, R.K., Thatoi, H., Bhaskar, T., Hazra, S., and Ghosh, D., 2023, An insight into omics analysis and metabolic pathway engineering of lignin-degrading enzymes for enhanced lignin valorization, *Bioresource Technology*, 379, 129045. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129045>
9. Alizadeh Sani, M., Priyadarshi, R., Zhang, W., Khezerlou, A., and Rhim, J.-W., 2024, Innovative application of laccase enzyme in food packaging, *Trends in Food Science & Technology*, 151, 104623. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104623>
10. Strong, J. and Claus, H., 2011, Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology - CRIT REV ENVIRON SCI TECHNOL*, 41, 373-434. 10.1080/10643380902945706

11. Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W.J.I.j.o.b., and biology, m., 2010, Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin, *I(1)*, 36.
12. Grgas, D., Rukavina, M., Bešlo, D., Štefanac, T., Crnek, V., Šikić, T., Habuda-Stanić, M., and Landeka Dragičević, T., 2023, The Bacterial Degradation of Lignin—A Review, *I5(7)*, 1272.
13. Conigliaro, P., Portaccio, M., Lepore, M., and Delfino, I., 2023, Optical Properties of Laccases and Their Use for Phenolic Compound Detection and Quantification: A Brief Review, *I3(23)*, 12929.
14. Brugnari, T., Braga, D.M., dos Santos, C.S.A., Torres, B.H.C., Modkovski, T.A., Haminiuk, C.W.I., and Maciel, G.M., 2021, Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market—an overview, *Bioresources and Bioprocessing*, *8(1)*, 131. 10.1186/s40643-021-00484-1
15. Mate, D.M. and Alcalde, M., 2017, Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology, *Microbial Biotechnology*, *10(6)*, 1457-1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
16. Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., and Paszczyński, A., 2020, Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution, *21(3)*, 966.
17. Solomon, E.I., Heppner, D.E., Johnston, E.M., Ginsbach, J.W., Cirera, J., Qayyum, M., Kieber-Emmons, M.T., Kjaergaard, C.H., Hadt, R.G., and Tian, L., 2014, Copper active sites in biology, *Chem Rev*, *114(7)*, 3659-853. 10.1021/cr400327t
18. Jones, S.M. and Solomon, E.I., 2015, Electron transfer and reaction mechanism of laccases, *Cell Mol Life Sci*, *72(5)*, 869-83. 10.1007/s00018-014-1826-6
19. Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., and Kumar, A., 2011, Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications, *Enzyme Res*, *2011*, 217861. 10.4061/2011/217861
20. Zhou, M., Fakayode, O.A., Ren, M., Li, H., Liang, J., Yagoub, A.E.A., Fan, Z., and Zhou, C., 2023, Laccase-catalyzed lignin depolymerization in deep eutectic solvents: challenges and prospects, *Bioresources and Bioprocessing*, *10(1)*, 21. 10.1186/s40643-023-00640-9
21. Dong, C.-D., Tiwari, A., Anisha, G.S., Chen, C.-W., Singh, A., Haldar, D., Patel, A.K., and Singhanian, R.R., 2023, Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation, *Environmental Pollution*, *319*, 120999. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.120999>
22. Kumar, S., Saini, P., and Garla, M., 2025, Isolation, optimization, and characterization of laccase-producing bacteria for efficient lignin degradation, *Bioresource Technology Reports*, *32*, 102382. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102382>

23. Chen, M., Li, Q., Liu, C., Meng, E., and Zhang, B., 2025, Microbial Degradation of Lignocellulose for Sustainable Biomass Utilization and Future Research Perspectives, *Sustainability*, 17, 4223. 10.3390/su17094223
24. Guan, Z.B., Luo, Q., Wang, H.R., Chen, Y., and Liao, X.R., 2018, Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications, *Cell Mol Life Sci*, 75(19), 3569-3592. 10.1007/s00018-018-2883-z
25. Sharghi, S., Ahmadi, F.S., Kakhki, A.M., and Farsi, M., 2024, Copper increases laccase gene transcription and extracellular laccase activity in *Pleurotus eryngii* KS004, *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(1), 111-116. 10.1007/s42770-024-01257-6
26. Wang, F., Yu, X., Yu, Z., Cui, Y., Xu, L., Huo, S., Ding, Z., Zhao, L., Du, L., and Qiu, Y., 2023, Improved laccase production by *Trametes versicolor* using Copper-Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine as a novel and high-efficient inducer, *Front Bioeng Biotechnol*, 11, 1176352. 10.3389/fbioe.2023.1176352
27. Ruijsenaars, H.J. and Hartmans, S., 2004, A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(2), 177-182. 10.1007/s00253-004-1571-0
28. Machczynski, M.C., Vijgenboom, E., Samyn, B., and Canters, G.W., 2004, Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity, *Protein Science*, 13(9), 2388-2397. <https://doi.org/10.1110/ps.04759104>
29. Li, T., Wang, H., Li, J., Jiang, L., Kang, H., Guo, Z., Wang, C., Yang, W., Liu, F., Lu, F., and Liu, Y., 2021, Enzymatic characterization, molecular dynamics simulation, and application of a novel *Bacillus licheniformis* laccase, *Int J Biol Macromol*, 167, 1393-1405. 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.093
30. Gogotya, A., Nnolim, N., Digban, T., Okoh, A., and Nwodo, U., 2021, Characterization of a thermostable and solvent-tolerant laccase produced by *Streptomyces* sp. LAO, *Biotechnology Letters*, 43, 10.1007/s10529-021-03131-z
31. Gu, J., Qiu, Q., Yu, Y., Sun, X., Tian, K., Chang, M., Wang, Y., Zhang, F., and Huo, H., 2024, Bacterial transformation of lignin: key enzymes and high-value products, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1), 2. 10.1186/s13068-023-02447-4
32. Edith Ayala-Rodríguez, A., Valdés-Rodríguez, S., Enrique Olalde-Mathieu, V., Arias-Padró, M., Reyes-Moreno, C., and Olalde-Portugal, V., 2024, Extracellular ligninases production and lignin degradation by *Paenibacillus polymyxa*, *J Gen Appl Microbiol*, 70(1), 10.2323/jgam.2023.12.001

33. Yu, D., Liu, Y., Cai, H., Huang, W., Wu, H., and Yang, P., 2025, Metagenomic investigation of bacterial laccases in a straw-amended soil, *PeerJ*, 13, e19327. 10.7717/peerj.19327
34. Zhang, K., Li, J., Wang, Z., Xie, B., Xiong, Z., Li, H., Ahmed, M., Fang, F., Li, J., and Li, X., 2024, Cloning, expression and application of a novel laccase derived from water buffalo ruminal lignin-degrading bacteria, *Int J Biol Macromol*, 266(Pt 2), 131109. 10.1016/j.ijbiomac.2024.131109
35. Minhas, W.R., Bashir, S., Zhang, C., and Raza, A., 2025, Optimized production of laccase from *Pseudomonas stutzeri* and its biodegradation of lignin in biomass, *Folia Microbiologica*, 70(5), 1043-1050. 10.1007/s12223-024-01232-6
36. Ru, J., Jiang, Z., Li, J., Li, X., Su, Z., Li, T., and Xu, M., 2025, Screening of microbial consortium with high efficiency of lignin-degrading and its synergistic metabolic mechanism, *Frontiers in Microbiology*, 16, 10.3389/fmicb.2025.1709019
37. Fu, N., Liu, R.-Y., Zhou, Y., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., and Liu, Z.-H., 2025, Technological Advances in Ligninolytic Enzymes for the Biological Valorization of Lignin, *Green Chemistry*, 27, 10.1039/D4GC05724D
38. Nguyễn Thị Hồng Liên, Trần Thị Hương, Nguyễn Văn Hiếu, Đặng Thị Nhung, Phan Thị Hồng Thảo, 2024, NGHIÊN CỨU ĐỊNH LOẠI VÀ ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP LACCASE CỦA CHỦNG NẤM MỤC TRẮNG *Trametes polyzona* TĐ16, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 21(12), 1561-1568.
39. Phùng Khắc Huy Chú, Đào Thị Ngọc Ánh, Đặng Thị Cẩm Hà, 2017, Nấm đảm sinh tổng hợp laccase có khả năng loại màu thuốc nhuộm hoạt tính được sử dụng để nhuộm vải may quân trang, *Tạp chí Khoa học và công nghệ quân sự*, 52.
40. Nguyễn Thị Lan Anh, Đào Thị Ngọc Anh, Đặng Thị Cẩm Hà, Jacco, K., Abraham, B., E.de, B.T., and M., S.v.R.J., 2022, Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) by fungi originating from Vietnam, *Biodegradation*, 33(3), 301-316. 10.1007/s10532-022-09982-1
41. Phùng Khắc Huy Chú, Đào Thị Ngọc Ánh, Đàm Thúy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà, 2015, Phân lập, phân loại và khảo sát khả năng sinh tổng hợp laccase-like của một số chủng xạ khuẩn từ đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa, tỉnh Đồng Nai, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 10, 1.
42. Đào Thị Ngọc Ánh, Bùi Thị Khánh Ly, Trần Hương Quỳnh, Nguyễn Thị Nguyệt, Hồ Ngọc Anh, Vi Thị Kim Chi, Phạm Ngọc Long, Cung Thị Ngọc Mai, Nguyễn Phương Minh, Lê Thị Nhi Công, 2025, Xạ

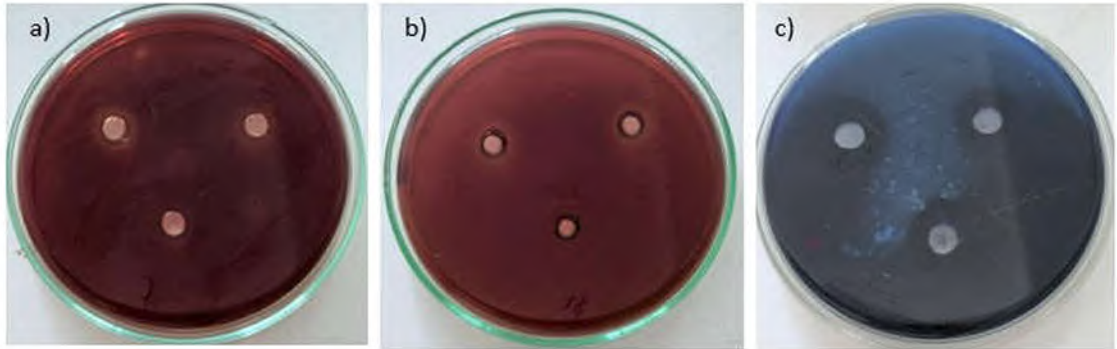
- khuẩn có khả năng nuôi cấy trong đất ô nhiễm dioxin, khả năng sinh laccase và tiềm năng ứng dụng trong xử lý sinh học, *Tạp chí Khoa học và công nghệ quân sự*, 67(6),
43. Abioye, O.P., Umaru, S., Aransiola, S.A., Oyewole, O.A., Maddela, N.R., and Prasad, R., 2025, Production of laccase by *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* for treatment of textile effluent, *Sustainable Chemistry for the Environment*, 9, 100222. <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2025.100222>
 44. Allain, H., Koullen, L., Coroller, L., Mathot, A.-G., and Desriac, N., 2026, An optimized isolation chip approach targeting recovery of soil spore-forming bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, 245, 107491. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2026.107491>
 45. Valizadeh, S., Enayatizamir, N., Ghomsheh, H., Motamedi, H., and Moghadam, B., 2023, Characterization of the biosurfactant production and enzymatic potential of bacteria isolated from an oil-contaminated saline soil, *International Microbiology*, 26, 10.1007/s10123-022-00318-w
 46. Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M.J., Dhouib, A., and Sayadi, S., 2010, Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds, *Process Biochemistry*, 45(4), 507-513. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.009>
 47. J, S., K, K., and E, H., 2021, Screening, Isolation and Biochemical Characterization of Laccase Producing Bacteria from Contaminated Sites, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 71, 10.47583/ijpsrr.2021.v71i02.018
 48. Mehandia, S., Sharma, S.C., and Arya, S.K., 2020, Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes, *Biotechnology Reports*, 25, e00413. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00413>
 49. Sumranwanich, T., Amosu, E., Chankhamhaengdech, S., Phetruen, T., Loktumraks, W., Ounjai, P., and Harnvoravongchai, P., 2024, Evaluating lignin degradation under limited oxygen conditions by bacterial isolates from forest soil, *Sci Rep*, 14(1), 13350. 10.1038/s41598-024-64237-8
 50. Abdelgalil, S., Attia, A., Reyed, R.M., and Soliman, N., 2019, Application of Central Composite Designs Utilized for Scale-up Strategies in the Optimization Process for Development Laccase Production and for the Bioremediation of Various Industrial Pollutants, *ACTA SCIENTIFIC MICROBIOLOGY*, 2, 18-27. 10.31080/ASMI.2019.02.0393

51. Desai, S.A. *Isolation and characterization of Laccase producing bacteria from contaminated sites*. 2017.
52. Jones, A.L. and Goodfellow, M., 2015, *Rhodococcus*, In (Ed.)^(Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-50),
53. Mate, D. and Alcalde, M., 2014, Laccase engineering: From rational design to directed evolution, *Biotechnology Advances*, 33, 10.1016/j.biotechadv.2014.12.007
54. Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., and Gupte, A., 2014, Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1, 3 *Biotech*, 4(1), 77-84. 10.1007/s13205-013-0129-1
55. Xu, F., 1997, Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases, *J Biol Chem*, 272(2), 924-8. 10.1074/jbc.272.2.924
56. Larkin, M.J., Kulakov, L.A., and Allen, C.C.R., 2005, Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility, *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), 282-290. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.04.007>
57. Rezende, C.A., de Lima, M.A., Maziero, P., deAzevedo, E.R., Garcia, W., and Polikarpov, I., 2011, Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility, *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 54. 10.1186/1754-6834-4-54
58. Sharker, B., Islam, M.A., Hossain, M.A.A., Ahmad, I., Al Mamun, A., Ghosh, S., Rahman, A., Hossain, M.S., Ashik, M.A., Hoque, M.R., Hossain, M.K., Mamun, M.A., Haque, M.A., Patel, H., Prodhan, M.Y., Bhattacharya, P., and Haque, M.A., 2023, Characterization of lignin and hemicellulose degrading bacteria isolated from cow rumen and forest soil: Unveiling a novel enzymatic model for rice straw deconstruction, *Science of The Total Environment*, 904, 166704. 10.1016/j.scitotenv.2023.166704
59. Dzepe, D., Ndindeng, S.A., Ogbon, E.A., Riggi, L., Lalander, C., and Djouaka, R., 2025, Enzymatic pretreatment optimizes rice husk decomposition by black soldier fly, *Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae) larvae, *BMC Environmental Science*, 2(1), 10. 10.1186/s44329-025-00025-7
60. Zhang, Z., Islam, M.S., Noman, M., Hao, Z., Chai, R., Qiu, H., Wang, J., Cai, Y., Wang, Y., and Wang, J., 2025, Enhanced Mesophilic Degradation of Rice Straw by Microbial Consortium SXJG15 Through Coordinated Enzymatic Activity and Community Reshaping, *Microorganisms*, 13(12), 10.3390/microorganisms13122707

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Thí nghiệm enzyme ngoại bào của chủng SPS3.4

a) cellulase, b) protease, c) amylase



Phụ lục 2. Thí nghiệm xử lý nguồn phế phẩm lignocellulose của chủng SPS3.4



Properties of the Laccase-Producing Bacterial Strain *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 Isolated from Mangrove Forests in Xuan Thuy National Park

Abstract: Xuan Thuy National Park (XTNP), a typical mangrove forest for Northern mangroves in Vietnam, is a shelter for living organisms in tropical and subtropical coastal zones as well as microorganisms that are key players in the mangrove ecosystem processes for the decomposition of organic matter and cycling sulfur, phosphate, and nitrogen. In this study, sediment samples from Xuan Thuy National Park were collected for isolating bacteria capable of producing laccase enzyme, which is a potential tool for the synthesis of biodegradable plastics. Among the isolates, isolate 4XT7.1 was selected and identified as *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 by 16S rRNA gene sequence (accession number: PX658217.1). The enzyme activity was further confirmed by its ability to oxidize Guaiacol, a characteristic of laccase activity. The bacterium showed the enzyme activities at a low temperature (25°C) and optimal activity at pH 6 (with a reduction efficiency of 21.46% after 72 hours). The strain 4XT7.1 is a Gram-positive rod that forms characteristic yellow colonies, and it simultaneously expresses important extracellular hydrolytic enzymes such as protease, amylase, and cellulase. Notably, *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 also demonstrated high decolorization efficiency, achieving 96.55% degradation of the Malachite Green dye (50 mg/L) in just 24 hours of cultivation. These results confirm that *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 is a highly promising and applicable bacterial strain, providing a robust and sustainable biocatalytic enzyme system for industrial application.

Keywords: Mangrove forests, bioplastics, Laccase, *Microbacterium*, bacterial decolourization.

1. INTRODUCTION

Mangrove ecosystems, particularly those in tropical and subtropical coastal zones, represent some of the most productive and biologically diverse environments on Earth. These "blue carbon" sinks serve as critical interfaces between land and sea, where microorganisms play a fundamental role in nutrient cycling, specifically in the transformation of sulfur, phosphate, and nitrogen compounds [1]. In Northern Vietnam, the Xuan Thuy National Park (XTNP) stands as a representative mangrove forest, harboring a unique microbial consortium adapted to fluctuating salinities and organic-rich sediments. The metabolic plasticity of these indigenous microbes offers an untapped reservoir for discovering novel enzymes with robust industrial properties.

Among the various biocatalysts found in such environments, laccases have garnered significant attention in environmental engineering due to their high redox potential and substrate non-specificity. As members of the multicopper oxidase (MCO) family, these enzymes utilize a cluster of four copper ions—classified into Type 1 (T1), Type 2 (T2), and Type 3 (T3) sites—to coordinate a sophisticated four-electron reduction of molecular oxygen (O₂) to water (H₂O), coupled with the one-electron oxidation of a wide array of phenolic and non-phenolic substrates [2]. Laccases are able to operate without the need for expensive co-factors such as NAD(P)H or the harsh oxidants (e.g., H₂O₂) required by peroxidases. Furthermore, the catalytic range of laccases can be significantly extended by using low-molecular-weight "redox mediators." These mediators act as electron

shuttles between the enzyme's active site and bulky or high-redox-potential polymers, allowing laccase to modify complex matrices [3].

The transition from a linear "take-make-dispose" plastic economy to a circular bio-economy necessitates innovative strategies for polymer assembly. Laccases in the synthesis of biodegradable plastics, offer a "green" alternative to traditional chemically-catalyzed polymerization. Conventional petroleum-based plastics, such as polyethylene (PE) and polypropylene (PP), continue to pose an existential threat to marine and terrestrial ecosystems due to their recalcitrance. On the other hand, the adoption of bioplastics significantly mitigates plastic pollution in environments, and laccase enzymes play a pivotal role in the synthesis of these biodegradable polymers. Laccases can facilitate the enzymatic polymerization of renewable phenolic monomers—such as vanillin, syringic acid, or ferulic acid derived from agricultural waste—into high-performance biopolymers [4]. Beyond direct polymerization, laccases are uniquely capable of grafting functional groups onto existing biopolymers, e.g., lignin, cellulose, and chitosan. By creating reactive radical intermediates on these backbones, the enzyme promotes the formation of covalent "bridges" that significantly enhance the mechanical strength, thermal stability, and hydrophobicity of the resulting "green" plastics. This process, often referred to as bio-functionalization, allows for the tailoring of plastic properties without the need for toxic cross-linking agents like formaldehyde or glutaraldehyde [5]. Furthermore, laccases play a pivotal role in the upstream pretreatment of lignocellulosic biomass. By selectively oxidizing the recalcitrant lignin

"glue" that shields plant cell walls, these enzymes facilitate the liberation of fermentable sugars and phenolic precursors. These products are essential substrates for the microbial synthesis of bio-based polymers, such as polylactic acid (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs) [6]. This dual functionality—acting as both a "deconstructor" of complex biomass and a "builder" of high-value molecular structures—positions laccase-producing bacteria as a strategic cornerstone for sustainable manufacturing [7]. Specifically, strains sourced from extreme environments like mangroves, which have evolved to degrade complex polyphenolic compounds under saline and fluctuating conditions, offer the necessary robustness for industrial-scale bioplastic production [8]. Consequently, isolating strains from extreme or dynamic environments—such as the intertidal sediments of XTNP—is essential for finding enzymes with superior stability and multi-functional catalytic profiles.

In this study, we report the isolation and characterization of *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 from the sediments of Xuan Thuy National Park. We evaluate its multi-enzymatic potential, focusing on laccase production and its auxiliary hydrolytic activities (protease, amylase, and cellulase). Additionally, we demonstrate its industrial versatility through the rapid decolorization of Malachite Green dye, positioning this strain as a robust candidate for both wastewater bioremediation and the sustainable synthesis of biodegradable materials.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Mineral salt medium (MSM) was used for bacterial enrichment and isolation. It was prepared by mixing specific stock solutions to a final volume of 1,000 mL. The composition of the stock solutions was as follows:

Solution A (25X concentration): containing $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (69.5 g/L) and KH_2PO_4 (69.5 g/L). The pH of this solution was maintained at 7.1.

Solution B (50X concentration): Comprised KOH (7.3g), Nitrilotriacetic acid (10g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (14.45g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.34g), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (9.25mg), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99mg), and 50 mL of a metals stock solution, all dissolved in 1 L of distilled water. The pH of Solution B was adjusted to 6.6–6.9 using 1N NaOH.

Solution C (200X concentration): Contained $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at the concentration of 200 g/L.

To prepare 1 L of complete MSB medium, 40 mL of Solution A, 20 mL of Solution B, and 5 mL of Solution C were combined with 935 mL of distilled water. The medium was sterilized by autoclaving at 121°C for 15–20 minutes before use.

Nutrient broth (NB) was used for inoculating bacteria. The composition of NB included 3 g of Yeast extract, 5 g of peptone, and 5 g of NaCl dissolved in 1 L of water.

Guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP), and Malachite Green (MG) were employed as substrates for the qualitative and quantitative screening of laccase activity and dye decolorization potential.

All inorganic chemicals were purchased from either Fisher (UK) or Merck (Germany).

2.2. Methods

2.2.1. Sampling and enrichment of laccase-producing bacteria:

Sediment samples were collected from Xuan Thuy National Park. Samples were enriched in 50 mL of MSM containing 5 or 100 mM guaiacol. Enrichment cultures were incubated at 30°C for 5 days. Thereafter, 1% (v/v) of inoculum was transferred into fresh 50 mL MSM and incubated for an additional 7 days. The transfer was repeated 4 times to enrich laccase-producing bacteria.

2.2.2. Isolating and screening of laccase-producing bacteria:

Enrichment cultures were serially diluted and spread in MSM agar plates containing 5 mM of 2, 6-DMP or 5 mM guaiacol as a substrate. 0.5 mM of copper sulfate (CuSO_4) was added to all media to facilitate laccase activity. Plates were incubated at 30°C until colony growth was observed. The enzymatic activity was assessed by observing around color changes with precipitation of black particles around colonies. The pure isolates were stored in 30% of glycerol at -4°C freezer for further experiments.

2.2.3. Identification of isolates by 16S rDNA:

The isolates were cultured to produce pure biomass, and their total DNA was extracted. To amplify ~1.5 kb gene from the isolates' genomic DNA, 16S rDNA universal primer set [27F: 5'-AGA GTT RGA TCM TGG CTC AG-3' and 1492R: 5'-CGG YTA CCT TGT TAC GAC TT-3'] was used. The NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to assess DNA sequence similarity and perform sequence alignments. The sequences with the highest identity scores were then retrieved and aligned using the CLUSTAL W multiple sequence alignment tool in MEGA 12. Subsequently, the aligned sequences were used to construct a phylogenetic tree using the same software (MEGA) by applying the maximum-likelihood method.

2.2.4. Physicochemical properties of selected isolates:

Bacterial cells were observed using SEM (JSM-6510LV, JOEL, Japan). Standard biochemical tests, including fermentation (glucose) reactions, the Voges-Proskauer (VP) test, and assays for citrate, nitrate reductase, urease, ammonia, amylase, protease, cellulase, and lipase activities, were carried out as described by Mehndia et al. [9].

2.2.5. Enzyme Activity Assays

To determine the extracellular laccase activity of the isolates, bacterial strains were inoculated into 25 mL of nutrient medium with an initial OD_{600} of 0.02. The cultures were incubated at 30 °C under constant shaking at 150 rpm. Periodically, 1 mL of the culture broth was collected and centrifuged at 13,500 rpm for 2 minutes. The resulting supernatant was harvested as the crude enzyme source for subsequent laccase activity assays.

Laccase activity was quantified based on the oxidative capability toward the substrate 2, 6-DMP in the presence

of 0.5 mM CuSO₄. The reaction mixture (total volume of 1 mL) comprised 5 mM 2, 6-DMP in 100 mM acetate buffer (pH 5.0). After incubation at 30 °C for 2 minutes, the absorbance was measured at a wavelength of 468 nm using a UV-Vis spectrophotometer [10]. One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μmol of 2, 6-DMP per minute under the specified experimental conditions. A control treatment consisting of the sterile medium without bacterial inoculation was maintained under the same conditions. All assays were performed in triplicate to ensure statistical reliability.

The laccase enzyme activity was calculated according to the formula described by Siva et al [11]:

$$E.A = (A \cdot V) / (t \cdot \epsilon \cdot v)$$

Where:

- **E. A:** Enzyme activity (U/L).
- **A (Absorbance):** The measured absorbance at the maximum wavelength (λ_{max})
- **V:** Total volume of the reaction mixture (1 mL).
- **t:** Reaction incubation time (minutes).
- **ϵ (Extinction coefficient):** Molar extinction coefficient of the substrate ($\epsilon_{468} = 27.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- **v:** Volume of the crude enzyme extract added to the mixture (0.2 mL).

2.2.6. Extracellular Enzymatic Decolorization of Malachite Green:

Initially, the bacterial strain was cultured in NB medium for 48 hours at room temperature. The culture was then centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 minutes to separate the biomass. Subsequently, 100 μL of the supernatant was introduced into pre-cut wells on MSM agar plates supplemented with 50 mg/L MG. The plates were incubated and monitored for 72 hours. The presence of a clear, transparent halo surrounding the wells was recorded as positive evidence of the enzymatic breakdown of the dye's chromophore structure.

2.2.7. Quantitative Analysis of Malachite Green Decolorization

Malachite Green was added to the MSM to achieve a final concentration of 50 mg/L. The medium was then inoculated with a standardized bacterial suspension and incubated at room temperature (approximately 25°C). At specific time intervals (24 and 48 hours), 5 mL aliquots were withdrawn and centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 minutes to remove the bacterial biomass. The residual concentration of MG in the cell-free supernatant was determined by measuring absorbance at the maximum absorption wavelength ($\lambda = 619 \text{ nm}$) using a Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). An uninoculated medium containing 50 mg/L MG was used as a control. The decolorization efficiency was calculated according to the formula:

$$\text{Decolorization (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Where A_0 : is the initial absorbance of the control, and A_t : is the absorbance of the treated sample at time t. All experiments were performed in duplicate (or triplicate).

2.2.8. Temperature and pH effect on Laccase

The optimization of laccase activity for strain 4XT7.1 was conducted by monitoring the reduction of total phenolic content (TPC), following the method described by Sumranwanich et al. [12].

Experimental Conditions: To determine the optimal conditions for enzymatic activity, the cultures were incubated across a range of temperatures (25°C, 35°C, 45°C, and 55°C) and initial pH values (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, and 9.0).

Sample Processing: Bacterial growth and phenolic degradation were monitored over a 72-hour period at 30°C (or the specified test temperature). At intervals of 24, 48, and 72 hours, culture aliquots were withdrawn and acidified to pH 2.0 using concentrated hydrochloric acid (HCl) to precipitate proteins and stop the enzymatic reaction. The samples were then subjected to centrifugation at $12,000 \times g$ for 10 minutes to obtain the cell-free supernatant.

Quantification of Total Phenolics: The residual phenolic concentration in the supernatant was quantified by measuring the absorbance at 280 nm using Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). The phenolic removal efficiency (%) was calculated using the following equation:

$$\text{Efficiency (\%)} = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100$$

Where: C_0 : The initial absorbance at 280 nm at $t = 0$ hours; C_t : The residual absorbance of the culture supernatant at 280 nm at a specific time interval ($t = 24, 48, 72$ hours).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Enrichment, Isolation, and Selection of Laccase-producing Bacteria

The enrichment of sediment samples from Xuan Thuy National Park in MSM medium supplemented with guaiacol exerted selective pressure to recruit microorganisms with potential lignin-degrading activity, such as laccase. Guaiacol, acting as a lignin model compound, effectively identified isolates possessing robust oxidative enzymatic systems. From the enrichment cultures at high concentration of guaiacol (100 mM), no colonies of bacteria were observed, but at low concentration of guaiacol (5mM), a few colonies of bacteria were observed (data not shown). Among observed colonies, strain 4XT7.1 was isolated and purified. The strain is distinguished by its circular, raised, and glossy yellow colonies. The strain 4XT7.1 is a rod-shaped (Figure 1) and Gram-positive cell. Scanning electron microscopy (SEM) provided detailed visualization of the cellular architecture, revealing that 4XT7.1 consists of short, rod-shaped cells with uniform dimensions, arranged either singly or in small clusters.

3.2. Identification and Phylogenetic Analysis of Strain 4XT7.1

The taxonomic position of the strain 4XT7.1 was determined through molecular sequencing of the 16S rRNA gene. The obtained sequence was phylogenetically reconstructed using the Maximum Likelihood method (based on the Tamura-Nei model), identifying the strain

4XT7.1 within the *Microbacterium* cluster. The isolate shared a high degree of sequence similarity with *Microbacterium paraoxydans*, supported by a robust bootstrap value of 95% (Figure 2). Other major nodes in the dendrogram exhibited bootstrap stabilities between 97% and 99%, validating the accuracy of the taxonomic placement.



Figure 1. Isolation of strain 4XT7.1 via the streak plate method on nutrient agar (A), and SEM image of the strain 4XT7.1 cells (B). Scale bar 1 mm

The convergence of morphological traits—characterized by yellow-pigmented, circular colonies and Gram-positive staining—and the molecular data confirm strain 4XT7.1 as *Microbacterium paraoxydans*, thereby, the strain is registered in GenBank with accession number: PX658217.1. (Figure 2)

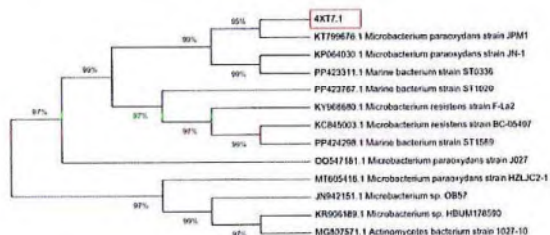


Figure 2. Phylogenetic tree of the 4XT7.1 strain

3.3. Biochemical Characterization

The metabolic versatility of *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 was further evaluated through a series of biochemical and extracellular enzyme assays (Table 1). The strain 4XT7.1 was characterized by several negative biochemical traits including Indole production, Methyl Red (MR), and Voges-Proskauer (VP) tests, indicating the absence of mixed-acid fermentation pathways [13]. Furthermore, negative results were recorded for urease activity and phenylalanine deamination. These metabolic limitations are consistent with the typical physiological profile of the *Microbacterium* genus and help differentiate strain 4XT7.1 from other closely related taxa. The strain 4XT7.1 showed positive activities for a broad spectrum of hydrolytic enzymes, including amylase, chitinase, protease, and cellulase (Table 1). The formation of distinct degradation halos (clear zones) on specific substrate-supplemented agar plates provides visual confirmation of the secretion of these extracellular enzymes (Figure 1S).

Table 1. Biochemical characteristics of the strain

4XT7.1

Test	4XT7.1
Fermentation	-
VP	-
Nitrate reduction	-
PGL	-
Urease	-
Lipase	-
Protease	+
Amylase	+
Cellulase	+
Chitinase	+

In the context of biodegradable plastic production, this multi-enzymatic profile is highly advantageous. The presence of cellulase and amylase allows the strain to break down complex lignocellulosic or starchy biomass into fermentable sugars and phenolic precursors. Simultaneously, the laccase and protease activities can facilitate the oxidative cross-linking and modification of protein/polyphenol-based biopolymers, enhancing the mechanical properties of the resulting "green" plastics [13]. Notably, the expression of chitinase suggests that the strain 4XT7.1 has evolved to utilize chitin, the second most abundant natural polymer found in mangrove environments (from crustacean shells), as a carbon and nitrogen source. This capability further underscores its potential in developing bio-composite materials derived from marine waste streams.

3.4. Extracellular Laccase Activity

The results (Figure 3) indicated that the extracellular laccase activity of strain 4XT7.1 increased progressively over the incubation period, reaching a peak value of 2.130 ± 0.082 U/L after 72 hours, followed by a slight decline at 96 hours. Specifically, a robust increase in enzyme activity was observed between 24 and 72 hours, reflecting the active growth phase of the bacteria and the subsequent accumulation of the enzyme within the culture medium.

This observed trend aligns with the general physiological patterns of extracellular enzymes, where laccase production typically intensifies during the exponential growth phase and the early stationary phase, as microorganisms secrete these enzymes to utilize complex substrates such as lignin. Recent studies characterize laccases as multicopper oxidases that catalyze the oxidation of various phenolic compounds and lignin [14]. It is well-documented that their activity frequently reaches an optimum after a specific incubation duration before undergoing a downward trend. These findings are in good agreement with the work of Albulaihed et al. (2023), who observed that laccase activity in *Stenotrophomonas maltophilia* increased significantly during the initial stages and peaked within the 48–72 hour incubation [15].

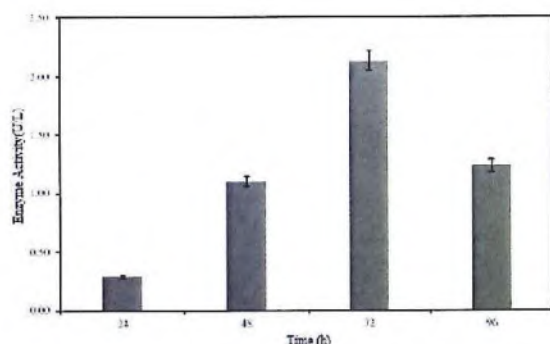


Figure 3. Extracellular laccase activity of *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 at different incubation time intervals.

3.5. Malachite Green Decolorization

On MG-supplemented agar plates (50 mg/L), the strain 4XT7.1 produced large, transparent decolorization halos around the inoculation points (Figure). This visual evidence confirms that the decolorization process is mediated by extracellular enzymes secreted into the medium, rather than mere biosorption onto the biomass. The formation of these clear zones indicates the complete cleavage of the dye's chromophore structure by the oxidative power of the secreted biocatalysts.

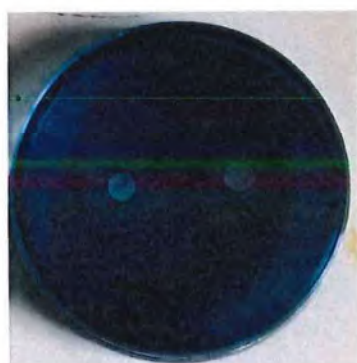


Figure 4. Screening for extracellular enzyme activity in the degradation of Malachite Green

In liquid medium, strain 4XT7.1 exhibited exceptional degradation kinetics. The strain 4XT7.1 demonstrated a remarkably rapid decolorization peak (~96.5%) within the first 24 hours; however, a slight decline in mean efficiency and increased variability (standard deviation) were observed at 48 and 72 hours (Figure). This trend likely reflects metabolic feedback inhibition caused by the accumulation of intermediates, such as leucomalachite green, which can interfere with laccase or peroxidase activities [16], [17]. Furthermore, as previously observed in the degradation of triphenylmethane dyes by *Agrobacterium radiobacter* MTCC 8161, the desorption of dye molecules from the thick Gram-positive cell walls during the stationary or decline phases—coupled with the proteolytic degradation of extracellular enzymes by the strain's own high protease activity—likely contributed to the observed fluctuations in residual dye concentrations over extended incubation periods [18]. This highlights that for the strain 4XT7.1, a 24-hour incubation period is optimal for achieving maximum treatment efficiency

while minimizing the risks of byproduct interference.

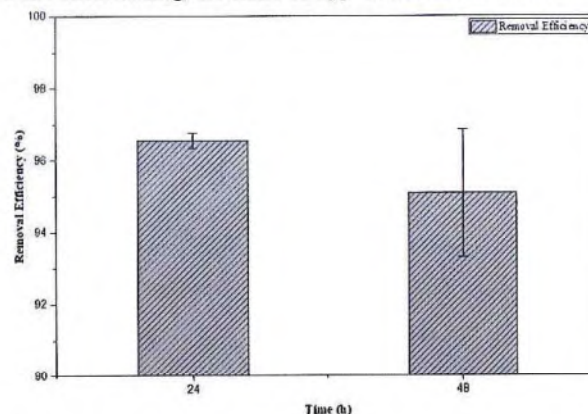


Figure 5. Malachite green decolorization efficiency of the strain 4XT7.1 after 24 and 48 hours

3.6. Effect of temperature and pH on Laccase Activity (Guaiacol Oxidation)

The laccase activity of *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 was evaluated through the oxidation of guaiacol. To maximize the biocatalytic efficiency for future applications in bioplastic synthesis, the effects of temperature and initial pH were systematically investigated.

3.6.1. Effect of Temperature on Guaiacol Removal

Temperature is a critical factor influencing the stability and catalytic rate of bacterial laccases. The effect of incubation temperature on the phenol degradation capacity of the strain 4XT7.1 was evaluated across a range of 25°C to 55°C. The experimental data, illustrated in Figure 5, reveal several key trends regarding the metabolic activity of this mangrove-derived isolate.

Across all tested temperatures, the guaiacol removal rate at 48 hours was significantly higher than at 24 hours. This suggests that the enzymatic oxidation of phenolic compounds by the laccase system of strain 4XT7.1 requires a prolonged contact time to achieve substantial degradation. The highest degradation efficiency was recorded at 25°C, reaching approximately 30% after 48 hours. This removal efficiency aligns with the natural environmental conditions of the mangrove ecosystem.

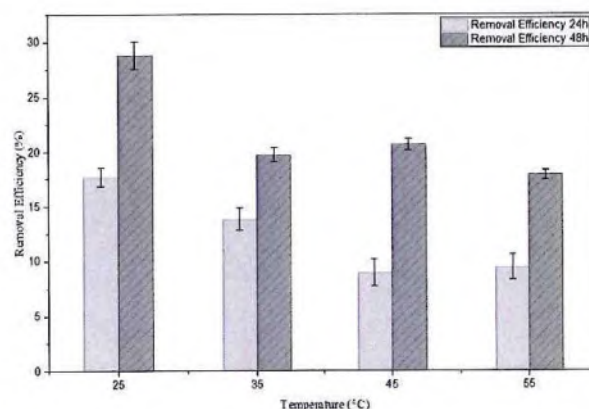


Figure 6. Guaiacol removal efficiency of strain 4XT7.1 at different temperatures after 24 and 48 hours

A gradual decline in removal efficiency was observed

as the temperature increased to 45°C, dropping to below 25%. However, notably, the strain maintained a stable removal efficiency of approximately 18–20% even at 55°C. This demonstrates that the laccase system derived from *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 possesses considerable industrial potential for treating heated industrial wastewater, as it does not undergo immediate and total loss of enzymatic activity under thermal stress.

3.6.2. Effect of Initial pH on Guaiacol Removal

The environmental pH exhibited a decisive influence on the phenol degradation capacity of strain 4XT7.1 over the 72-hour incubation period. At pH 6.0, strain 4XT7.1 achieved its peak guaiacol removal efficiency, with degradation values steadily increasing over time to exceed 20% after 72 hours. This preference for slightly acidic conditions is a characteristic trait often observed in microbial laccases, where the ionization state of the active site and the redox potential difference between the T1 copper center and the phenolic substrate are most favorable [18].

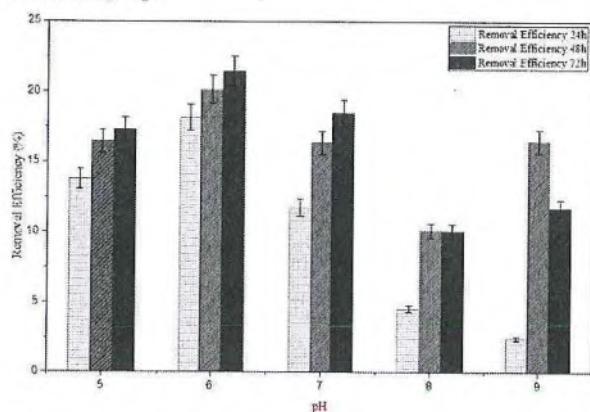


Figure 7. Effect of initial pH on the Guaiacol removal efficiency of strain 4XT7.1 after 24, 48, and 72 hours

The isolate maintained stable and progressive degradation activity within the pH 5.0 to 7.0 range. Notably, at pH 7.0 (neutral), the efficiency remained robust, reaching approximately 18% at the 72-hour mark. This stability indicates that the enzymatic system of *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 is well-adapted to the natural pH fluctuations of mangrove sediments.

The ability of strain 4XT7.1 to function effectively at pH 6.0–7.0 is of high industrial relevance. Mangrove-derived soils and many industrial effluents are naturally slightly acidic due to the decomposition of organic matter. The fact that this strain does not require extreme pH adjustment to maintain its degradative capacity could significantly reduce chemical costs in large-scale wastewater treatment frameworks.

5. CONCLUSION

This study successfully isolated and characterized strain 4XT7.1 from a mangrove ecosystem, definitively identifying it as *Microbacterium paraoxydans* 4XT7.1 through 16S rRNA phylogenetic analysis and SEM imaging. The isolate exhibits a robust multi-enzymatic profile, including laccase, cellulase, and protease

activities, which underpins its exceptional bioremediation potential. The strain 4XT7.1 achieves a remarkable 96.5% decolorization of Malachite Green within only 24 hours. Furthermore, the guaiacol degradation performance is optimized at 25°C and pH 6.0–7.0, while maintaining significant functional stability at elevated temperatures (up to 55°C). These attributes, combined with its natural resilience to saline environments, position *M. paraoxydans* 4XT7.1 as a highly efficient and strategic candidate for the sustainable treatment of industrial effluents and the upstream processing of lignocellulosic biomass for bioplastic production.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (RS-2024-00348474) under the Contract between GUST and KNU.

REFERENCES

- [1] D. M. Alongi, "Present state and future of the world's mangrove forests," *Environ. Conserv.*, vol. 29, no. 3, pp. 331–349, 2002, doi: 10.1017/S0376892902000231.
- [2] S. Riva, "Laccases: blue enzymes for green chemistry," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 219–226, 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.03.006.
- [3] A. I. Cañas and S. Camarero, "Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 6, pp. 694–705, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.
- [4] M. Mogharabi and M. A. Faramarzi, "Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 356, no. 5, pp. 897–927, 2014, doi: 10.1002/adsc.201300960.
- [5] S. Slagman, H. Zuilhof, and M. C. R. Franssen, "Laccase-mediated grafting on biopolymers and synthetic Polymers: A critical review," *ChemBioChem*, vol. 19, no. 4, pp. 288–311, 2018, doi: 10.1002/cbic.201700518.
- [6] R. Reshmy *et al.*, "Bioplastic production from renewable lignocellulosic feedstocks: a review," *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 20, no. 1, pp. 167–187, 2021, doi: 10.1007/s11157-021-09565-1.
- [7] M. B. Agustin, D. M. de Carvalho, M. H. Lahtinen, K. Hilden, T. Lundell, and K. S. Mikkonen, "Laccase as a tool in building advanced lignin-based materials," *ChemSusChem*, vol. 14, no. 21, pp. 4615–4635, 2021, doi: 10.1002/cssc.202101169.
- [8] A. S. S. Pulungan, L. A. Utami, M. N. S. Rangkuti, A. P. Ningsih, and C. S. Muliandhira, "Potential microplastic-degrading bacteria from mangrove sediment in the Paluh Getah area, Percut Sei Tuan District," *J. Penelit. Pendidik. IPA*, vol. 11, no. 10, pp. 243–249, 2025, doi: 10.29303/jppipa.v11i10.12647.
- [9] S. Mehandia, S. C. Sharma, and S. K. Arya, "Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes," *Biotechnol. Reports*, vol. 25, p. e00413, 2020, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00413.
- [10] H. Chakroun, T. Mechichi, M. J. Martinez, A. Dhoub, and S. Sayadi, "Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds," *Process Biochem.*, vol. 45, no. 4, pp. 507–513, 2010, doi: 10.1016/j.procbio.2009.11.009.
- [11] S. J. J., K. K. K., and H. L. E., "Screening, isolation and biochemical characterization of laccase producing bacteria

from contaminated sites," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 71, no. 2, pp. 117–121, 2021, doi: 10.47583/ijpsrr.2021.v71i02.018.

[12] T. Sumranwanich *et al.*, "Evaluating lignin degradation under limited oxygen conditions by bacterial isolates from forest soil," *Sci. Rep.*, pp. 1–14, 2024, doi: 10.1038/s41598-024-64237-8.

[13] O. Access, M. Monthly, O. Magazine, and V. Proskauer, "Determination of fermentation pathway by methyl red and Voges Proskauer (MRVP) test," *AgriCos e-Newsletter*, vol. 2, no. 11, pp. 3–5, 2021.

[14] E. Martin, P. Dubessay, E. Record, F. Audonnet, and P. Michaud, "Recent advances in laccase activity assays: A crucial challenge for applications on complex substrates," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 173, p. 110373, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110373>.

[15] Y. Albulaihed, M. Adnan, A. Jamal, M. Snoussi, K. Patel, and M. Patel, "Optimization of laccase from *Stenotrophomonas maltophilia* E1 by submerge fermentation using coconut husk with its detoxification and biodecolorization ability of synthetic dyes," *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 10, no. 1, 2023, doi: 10.1186/s40643-023-00703-x.

[16] A. S. Youssef, M. F. El-Sherif, and S. A. El-Assar, "Studies on the decolorization of Malachite Green by the local isolate *Acremonium kiliense*," *Biotechnology*, vol. 7, no. 2, pp. 213–223, 2008.

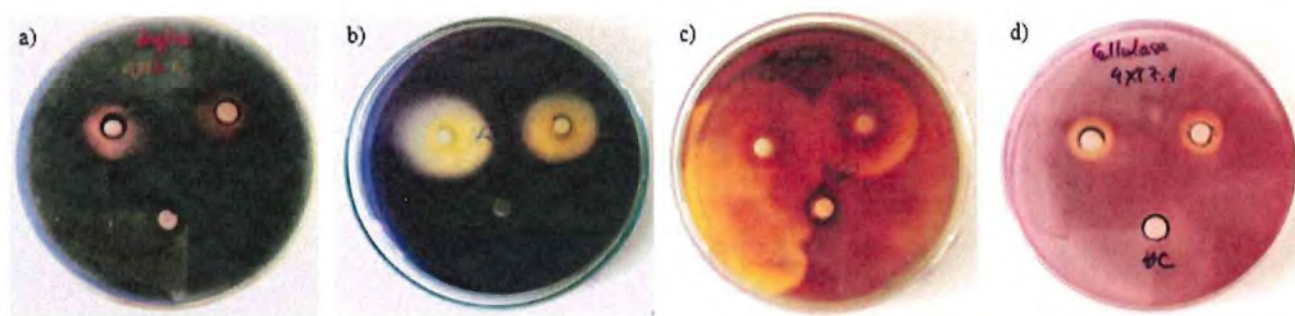
[17] B. A. Jakhrani *et al.*, "Improved decolorization of triphenylmethane dyes by halo-thermotolerant bacteria isolated from hypersaline environments," *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 19, no. 4, pp. 3261–3274, 2022, doi: 10.1007/s13762-021-03320-3.

[18] G. K. Parshetti, S. G. Parshetti, A. A. Telke, D. C. Kalyani, R. A. Doong, and S. P. Govindwar, "Biodegradation of crystal violet by *Agrobacterium radiobacter*," *J. Environ. Sci.*, vol. 23, no. 8, pp. 1384–1393, 2011, doi: 10.1016/S1001-0742(10)60547-5.

Appendix Supplementary

Figure 1S. **Screening for extracellular enzyme production by strain 4XT7.1.** The formation of clear zones (halos) indicates positive enzymatic hydrolysis of specific substrates:

a) amylase activity, b) chitinase activity, c) protease activity, and d) cellulase activity.



Số 188 - QĐ/HVKHCN

Hà Nội, ngày 08 tháng 5 năm 2026

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

-
- Căn cứ Quyết định số 175-QĐ/VHLKHCNVN ngày 28 / 4 /2026 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;
 - Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/8/2021 của Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
 - Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
 - Căn cứ Quyết định số 724/QĐ-HVKHCN ngày 28/06/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 1 năm 2024;
 - Căn cứ Quyết định số 955/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2025 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;
 - Xét đề nghị của Trưởng khoa Công nghệ môi trường và Năng lượng, Trường phòng Đào tạo.

GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
QUYẾT ĐỊNH

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Nguyễn Thị Thảo với đề tài: **“Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme laccase ngoại bào phân hủy lignin”**.

Ngành: Kỹ thuật môi trường;

Mã số: 8 52 03 20

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký và phải đảm bảo thời hạn đào tạo theo quy định của Học viện. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức – Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng khoa Công nghệ môi trường và Năng lượng, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. *gh*

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, HK.(14).

GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lãm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 188- QĐ/HVKHCN ngày 08/5/2026
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận văn của học viên: Nguyễn Thị Thảo

Tên đề tài: “**Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme laccase ngoại bào phân hủy lignin**”.

Ngành: Kỹ thuật môi trường

Mã số: 8 52 03 20

Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Hồ Tú Cường, Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Nguyễn Diệu Trinh, Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Trịnh Văn Tuyên	Công nghệ hóa học và môi trường	Học viện KH và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Lê Thị Nhi Công	Vi sinh vật	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 1
3.	TS. Mai Đàm Linh	Vi sinh vật	Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện 2
4.	TS. Đinh Thị Thu Hằng	Hóa sinh học	Học viện KH và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên- Thư ký
5.	PGS.TS. Trần Thị Ngọc Dung	Kỹ thuật môi trường	Học viện KH và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

Hội đồng gồm 05 thành viên./.

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 188 -QĐ/HVKHCN ngày 08/ 5 /2026 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Nguyễn Thị Thảo

Tên đề tài: “Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme laccase ngoại bào phân hủy lignin”.

Ngành: Kỹ thuật môi trường

Mã số: 8 52 03 20

Hôm nay, ngày 10/06/2026 Hội đồng đã họp tại Phòng 1710 nhà A28, Học viện Khoa học và công nghệ vào lúc 14h00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

TT	Họ và tên	Chức danh
1.	GS.TS. Trịnh Văn Tuyên	Chủ tịch Hội đồng
2.	TS. Đinh Thị Thu Hằng	Thư ký Hội đồng
3.	PGS.TS. Lê Thị Nhi Công	Phản biện 1
4.	TS. Mai Đàm Linh	Phản biện 2
5.	PGS.TS. Trần Thị Ngọc Dung	Ủy viên Hội đồng

Thành viên vắng mặt: (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ)

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1, đọc bản nhận xét luận văn, đặt câu hỏi

① PGS.TS. Lê Thị Nhi Cao
Thiên nhiên pháp văn lược bỏ phần G.ox., trong 29 b'ơ'
sug. t' l' k' m' và soat ban lo' t' Latip, TTK k' c' c' c'
in d' m' t' h' i' u' 47, 48, 50 c' n' ghi r' t' t' t' g' i' a' o' g' i' o'
v' i' t' , b' s' u' g' : 7. t' r' a' y' đ' a' y' c' u' a' g' e' n' 16 S. rRNA, t' i' n' h' 3.7
n' i' n' s' p' d' u' n' g' h' i' e' u' đ' i' c' o' t' , t' i' n' h' c' i' e' n' m' a' i' t' i' e' y' q' u' a' n' c' u' a' c' a' i'
s' a' h' t' r' a' n' g' v' a' h' i' e' u' s' a' t' p' h' a' n' h' u' y' , v' a' s' a' t' l' o' i' c' h' i' n' h' t' a'
k' e' t' l' u' a' t' c' a' n' b' a' m' s' u' t' h' o' i' d' u' n' g' .
L' e' n' t' h' i' n' a' o' đ' i' k' h' a' n' g' đ' i' n' h' l' à e' n' z' y' m' e' n' g' o' a' i' b' a' o' l' a' c' c' a' s' e

6. Phản biện 2, đọc bản nhận xét luận văn, đặt câu hỏi

TS. Mai Văn Linh: Đọc các luận văn của các phân
tổng quan chi tiết các tập trung về laccase, đặc biệt hóa sinh
và sinh lý, thí nghiệm 2, 2, 2, 4, 2, 8 các xử lý...
Giá trị... 67... tại sao hình thức... phải... giải
thích rõ... Phần 3.1... của... thể... hoạt... của... enzyme
laccase... 1, 699... cao... hay... 50... các... khác, cần
lưu... 3.3.1... chưa... về... khác... Tại
sao... 6.2... MR... test... dùng... các... cho các vi
khẩn... cần... ta... biết... i-chip...

7. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

Hỏi... tên... về... của... vi... Rhodococcus
có... sinh... hay...? Met... tại... than
khả... đây... thấy... thấy... tập... lại
các... lại
PGS. TS. Trần Thị Ngọc Dung: các... địa... phân... tại... sao...
chọn... tập... tập... tập... tập... tập... tập... tập... tập...
i-chip... tập... tập... tập... tập... tập... tập... tập... tập...
hình... các... lại, hình... 3.1... quá... quá... quá...

8. Học viên trả lời... màu, hiệu suất khử màu của 2 chất màu k^o giống
nhau... phân... kết... lại... phân... sinh... sinh... sinh...
phân... một... tập... tập... vi... sinh... sinh... sinh...
Lên... sinh... sinh... sinh... sinh... sinh... sinh... sinh...
Lại... sinh... sinh... sinh... sinh... sinh... sinh... sinh...

9. Hội đồng hợp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: PGS. TS. Trần Thị Ngọc Dung

Ủy viên: TS. Mai Văn Linh

Ủy viên: TS. Đinh Thị Thu Hằng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 04

Số phiếu thu về: 04

Tổng số điểm: 34,2

Điểm trung bình: 8,6

Điểm thưởng công trình công bố: 0,3

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 8,9

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn *Đạt* (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Luận văn không trùng lặp về nội dung và tên đề tài với các công bố trước đó

10. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

*Đề tài... đáp ứng... yêu cầu... của... luận văn... thạc sĩ... về... nội
dung... và... hình thức...
Đề nghị... bổ sung... và... chỉnh sửa...*

Buổi họp đã kết thúc vào 11 giờ 30 phút ngày 10/6/2026

Hà Nội, ngày 10 tháng 6 năm 2026

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

Đinh Thị Thu Hằng

Đinh Thị Thu Hằng

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

Nguyễn Thị Trung

Nguyễn Thị Trung

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

Nguyễn Thị Trung



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người phản biện: Lê Thị Nhi Công

Học hàm, học vị: PGS. TS.

Ngành: Công nghệ sinh học, Vi sinh vật học

Cơ quan công tác: Viện Sinh học, VAST

Họ và tên học viên: Nguyễn Thị Thảo

Tên đề tài: Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme laccase ngoại bào phân hủy lignin.

Ngành: Kỹ thuật môi trường

Mã số: 8 52 03 20

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Lignin là một thành phần có trong các phế phụ phẩm nông nghiệp và chiếm tỉ lệ lớn trong các sinh khối này. Việc xử lý lignin sẽ góp phần giải quyết bài toán về sinh khối. Các biện pháp hóa học và vật lý thường gây ô nhiễm thứ cấp và không giải quyết triệt để vấn đề này. Trong khi đó, sử dụng enzyme sinh học đặc biệt là laccase được coi là giải pháp xanh và có thể mở rộng từ việc phân hủy lignin đến nhiều hợp chất khó phân hủy khác. Trên thế giới và ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về việc phân lập và sử dụng laccase từ nấm. Tuy nhiên, các nghiên cứu về các vi khuẩn có khả năng sinh laccase ngoại bào còn chưa có nhiều. Trong khi đó, việc nuôi cấy vi khuẩn lại có nhiều lợi thế như thời gian sinh trưởng ngắn, tốc độ sinh trưởng nhanh và có thể lên men ở quy mô công nghiệp để thu hồi các enzyme này một cách dễ dàng. Chính vì vậy, Đề tài vừa có tính thời sự vừa có tính khoa học, đồng thời lại có ý nghĩa thực tiễn và rất cần thiết cho thực tế.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài không bị trùng lặp so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố trong và ngoài nước. Đề tài được thực hiện một cách logic và khoa học. Các Nội dung nghiên cứu trung thực, rõ ràng và có trích dẫn TLTK một cách đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên Đề tài và Nội dung nghiên cứu là phù hợp với nhau. Đồng thời cũng phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Các Phương pháp sử dụng trong nghiên cứu là hiện đại và truyền thống, phù hợp với các nội dung nghiên cứu. Các phương pháp đều được trích dẫn TLTK một cách rõ ràng, và luận giải được ý nghĩa của các nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Luận văn có kết quả phong phú, phù hợp với các Nội dung đặt ra của đề tài. Các kết quả đã cung cấp thêm dữ liệu khoa học về tiềm năng sử dụng các vi khuẩn sinh enzyme laccase để xử lý sinh khối thực vật. Kết quả này có ý nghĩa to lớn không chỉ trong nước mà cả quốc tế. Hiện nay nhu cầu sử dụng enzyme laccase để xử lý rác thải từ thực vật thành các sản phẩm có giá trị khác là rất cao. Không chỉ trong nông nghiệp (phế phụ phẩm nông nghiệp), công nghiệp (sản xuất mía đường,...) mà còn ngay cả các khu đô thị. Do đó, nếu thu được các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase hiệu năng cao sẽ rất có giá trị thực tế.

Nghiên cứu còn xác định được một số thông số kỹ thuật để tối ưu hóa quá trình sản xuất laccase của chủng SPS3.4. Đồng thời thử nghiệm xử lý các cơ chất như rom rạ, bã mía và trấu. Kết quả đã đánh giá được hiệu suất phân hủy của các cơ chất này trong điều kiện phòng thí nghiệm. Nghiên cứu còn thử nghiệm khả năng khử màu của enzyme ngoại bào thu được này trên các thuốc nhuộm khác nhau. Kết quả cho thấy, chủng SPS3.4 đã có hoạt tính khử màu đối với methyl blue và malachite green.

Các kết quả này có ý nghĩa trong ứng dụng xử lý sinh khối thực vật và xử lý nước thải dệt nhuộm một cách bền vững và an toàn đối với môi trường.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung và hình thức:

- Phần phương pháp nên lược bỏ phần phương pháp nhuộm Gram, vì đây là 1 kỹ thuật đơn giản trong các nghiên cứu về vi sinh vật.
- Trang 29, mục 2.2.4 cần bổ sung nhiệt độ sử dụng để ly tâm là bao nhiêu?
- Cần rà soát trong toàn bài, tên Latin của vi sinh vật phải viết nghiêng; TLTK không cần in đậm lên (ví dụ: trang 22).

- TLTK tiếng Việt như số 47, 48, 50, 51, khi viết trong câu văn nên ghi rõ họ và tên tác giả (chẳng hạn như: Đào Thị Ngọc Ánh và cộng sự ...)

- Trang 41, cần bổ sung % tương đồng khi so sánh với các chủng khác trên cây phát sinh chủng loại.

- Hình 3.7 nên vẽ lại, kết quả phân hủy dùng biểu đồ cột, và 2 Hình trong Hình này vẽ chung trên 1 đồ thị, sử dụng 2 trục tung. Từ đó sẽ dễ dàng nhìn thấy mối tương quan của ảnh hưởng nguồn nitơ với hiệu suất phân hủy guaiacol.

- Vì sao phần ảnh hưởng của Nhiệt độ và pH lại không có phần sinh trưởng (mật độ quang) như phần ảnh hưởng của nitơ?

- Không nên viết hoa tên các hợp chất ở giữa câu và rà soát các lỗi chính tả trong bài.

- Cần viết lại Kết luận cho ngắn gọn súc tích, dựa vào 4 nội dung nghiên cứu để kết luận.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nội dung Luận văn hoàn toàn có thể viết thành bài báo để gửi các tạp chí trong và ngoài nước.

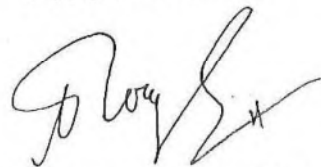
8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Luận văn hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

Người phản biện

(Ký, ghi rõ họ tên)



PGS. TS. Lê Thị Nhi Công

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người phản biện: Mai Thị Đàm Linh

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Ngành: Vi sinh vật học

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

Họ và tên học viên: Nguyễn Thị Thảo

Tên đề tài: Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme laccase ngoại bào phân huỷ lignin

Ngành: Kỹ thuật môi trường.

Mã số: 8520320

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính thời sự, tính cấp thiết, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn

Laccase được biết đến là nhóm enzyme có khả năng ứng dụng cao. Với đặc tính có phổ oxy hóa rộng, độ đặc hiệu cơ chất thấp và dùng O₂ làm chất nhận điện tử, laccase cho thấy tiềm năng trong các quy trình xử lý sinh học như tẩy trắng sinh học, khử màu thuốc nhuộm trong công nghiệp dệt, chế biến thực phẩm, và xử lý ô nhiễm môi trường...

Một trong những hướng đi hiện nay đang được nghiên cứu là ứng dụng enzyme laccase để xử lý các nguồn phế phụ phẩm nông nghiệp. Lignocellulose được biết đến là nguồn sinh khối thực vật chiếm tỷ lệ cao trong nhóm phế phụ phẩm này, trong đó thành phần lignin - một polymer thơm phức hợp có cấu trúc bền vững chiếm tỷ lệ 15-30% tổng khối lượng sinh khối. Đây là nhóm rất khó phân giải, nếu dùng các phương pháp vật lý, hoá học thường đòi hỏi chi phí cao và có thể gây ô nhiễm thứ cấp. Việc sử dụng enzyme laccase là một giải pháp sinh học hiệu quả cao, ít tốn kém và đặc biệt không gây ô nhiễm môi trường.

Enzyme laccase có thể được thu nhận từ nguồn thực vật hoặc từ vi sinh vật trong đó laccase từ các nhóm nấm đã được nghiên cứu nhiều và đưa ra được những sản phẩm cụ thể. Tuy nhiên việc nuôi cấy nấm để thu nhận gặp nhiều khó khăn do thời gian nuôi cấy dài và nguy cơ tạp nhiễm trong quá trình nuôi cấy thu nhận enzyme. Trong nghiên cứu này đã tập trung vào tìm kiếm nguồn laccase từ vi khuẩn - một nhóm vi sinh vật có tốc độ tăng trưởng nhanh, dễ dàng nuôi cấy và đặc biệt có thể sinh trưởng tốt trong các môi trường đặc hiệu để xử lý lignin. Các kết quả thu được cho thấy đã phân lập, tuyển

chọn được chủng vi khuẩn có hoạt tính laccase cao, có khả năng phân giải lignin với hiệu suất lớn đồng thời thăm dò được các điều kiện sinh trưởng thích hợp cũng như khả năng phân huỷ lignin trong một số phế phụ phẩm nông nghiệp của chủng vi khuẩn này. Các kết quả này là tiền đề quan trọng để phát triển các chế phẩm sinh học có hiệu quả và tính ứng dụng cao. Do vậy đề tài có giá trị khoa học và ý nghĩa thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài tập trung nghiên cứu về nhóm vi khuẩn sinh laccase và phân lập, tuyển chọn 01 chủng vi khuẩn bản địa do vậy không có sự trùng lặp với các nghiên cứu khác.

Các nội dung được thể hiện rõ ràng, phần tổng quan được viết cụ thể, tập trung vào hướng nghiên cứu, trích dẫn tài liệu tham khảo đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa đề tài và nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo

Tên đề tài phù hợp với các nội dung nghiên cứu trong luận án và phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Luận văn sử dụng các phương pháp thuần quy trong nghiên cứu về vi sinh vật như phân lập, định tính, xác định hoạt tính sinh học... kết hợp với các phương pháp phân tích, các kỹ thuật sinh học phân tử. Các nghiên cứu đều đảm bảo độ tin cậy và tính hiện đại trong nghiên cứu về vi sinh vật.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã phân lập được 80 chủng vi khuẩn từ hệ sinh thái rừng và tuyển chọn được 01 chủng vi khuẩn SPS3.4 có hoạt tính laccase ngoại bào cao nhất (đạt 1,699U/L sau 48h nuôi cấy)

- Đã xác định được các đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn này và xác định chủng SPS3.4 thuộc về chi *Rhodococcus* thông qua giải trình tự đoạn rRNA 16s.

- Đã xác định được điều kiện nuôi cấy chủng SPS3.4 để đạt hiệu suất phân huỷ lignin cao nhất (nhiệt độ 250C, pH 6 và nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

- Đã xác định được khả năng hoạt động phân giải lignin của chủng vi khuẩn trên nguồn cơ chất bã mía và khả năng khử màu bền vững với hai loại thuốc nhuộm là Methyl blue và Malachite green (hiệu suất đạt tối đa lần lượt là 54,4 và 24,83% sau 96 giờ nuôi cấy).

Các kết quả thu được của luận văn đều có giá trị khoa học, là tiền đề quan trọng để tiếp tục phát triển các chủng vi khuẩn tiềm năng tạo thành các chế phẩm sinh học hiệu quả cao, đặc biệt là trong lĩnh vực xử lý môi trường và phát triển bền vững.

6. Những hạn chế thiếu sót của luận văn và nội dung và hình thức

- Bố trí lại bố cục luận văn cho hợp lý, phần tổng quan quá dài, cần lược bớt.
- Phần tổng quan: Cần bổ sung trích dẫn tài liệu tham khảo ở một số nội dung (trang 8, 11; một số nội dung nên chỉnh sửa cho hợp lý (mục 1.1.2, 1.2.2)
- Phần phương pháp: nên viết khoa học và cụ thể (2.2.3; 2.2.4; 2.2.5); trích dẫn TLTK (2.2.9)
- Phần kết quả: Phần 3.1; 3.2 cần viết cụ thể và có thêm bàn luận kết quả; hình 3.3 bị mờ chưa quan sát được kết quả

Phần 3.4 chưa thấy các kết quả về đánh giá sinh trưởng của vi khuẩn nghiên cứu

- Phần kết luận: nên viết ngắn gọn và khoa học hơn
- Phần tài liệu tham khảo: Một số TLTK chưa đủ thông tin cần bổ sung (TLTK số 1, 2, 5...)

Phần phụ lục: nên để lại tên tiêu đề cho chính xác hơn, phụ lục 2 nên xem lại kết quả, phụ lục 4,5 cần có chú thích.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Luận văn là một công trình nghiên cứu hoàn chỉnh bài bản, từ việc phân lập các chủng vi khuẩn có hoạt tính đến nghiên cứu chuyên sâu về vi khuẩn này. Các kết quả thu được đều có giá trị khoa học cao. Do vậy các nội dung của luận văn có thể viết thành các công trình khoa học để gửi đăng ở các tạp chí khoa học uy tín trong nước.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ hay không?):

Luận văn đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Kỹ thuật môi trường và có thể đưa ra bảo vệ tại Hội đồng cấp Học viện.

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

Người phản biện



Mai Thị Đàm Linh

Hà Nội, ngày 16 tháng 6 năm 2026

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Nguyễn Thị Thảo

Lớp: 2024A

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu và tuyển chọn vi khuẩn sinh enzyme laccase ngoại bào phân hủy lignin

Chuyên ngành: Kỹ thuật môi trường

Mã số: 8520320

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Hồ Tú Cường và PGS Nguyễn Diệu Trinh

Ngày bảo vệ luận văn: 10/06/2026

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Rà soát tên latin, lỗi thiếu chữ, lỗi in đậm	Đã rà soát và sửa lỗi đúng định dạng tên latin của vi khuẩn, bổ sung từ ngữ và bỏ định dạng in đậm từ ngữ không cần thiết
2	Sửa lại các lỗi chính tả	Đã rà soát và sửa các lỗi chính tả
3	Sửa lại danh mục chữ viết tắt theo Alphabet	Đã viết lại danh mục chữ viết tắt theo Alphabet
4	Sửa lại và rút gọn tổng quan	Đã chỉnh sửa và rút gọn tổng quan trang 6, trang 8 và trang 12
5	Phân phương pháp nên lược bỏ nhuộm gram	Đã lược bỏ phân phương pháp nhuộm gram trang 24
6	Bỏ thí nghiệm khử màu thuốc nhuộm cho phù hợp với tên đề tài	Đã bỏ nội dung, phương pháp và kết quả của thí nghiệm khử màu thuốc nhuộm
7	Thiếu mục hóa chất và thiết bị	Đã bổ sung thêm phần dụng cụ thiết bị và hóa chất trang 21
8	Bổ sung thêm về kết quả phương pháp phân lập ichip	Học viên đã tiếp thu ý kiến nhưng số liệu đó lại nằm trong diện bảo mật độc quyền của dự án hợp tác quốc tế (Trường Đại học Quốc gia Kangwon) nên không thể bổ sung thêm
9	Hình 3.3 chưa rõ khuẩn lạc	Đã thay lại hình 3.3 thể hiện rõ ràng



		khuẩn lạc
10	Hình 3.4 bổ sung phần trăm tương đồng của gen 16S rRNA	Đã vẽ lại hình và bổ sung phần trăm tương đồng gen 16S rRNA
11	Xem xét và vẽ lại hình 3.7	Đã vẽ lại hình 3.7 to và rõ ràng hơn
12	Chỉnh sửa lại kết luận	Đã chỉnh sửa phần kết luận trang 44
13	Chỉnh sửa lại format của các tài liệu tham khảo	Báo cáo đã được chỉnh sửa về format của tài liệu tham khảo
14	Sửa lại phần phụ lục cho chính xác và chú thích cụ thể hơn	Đã chỉnh sửa lại phần phụ lục và có chú thích cụ thể

Hà Nội, ngày 26 tháng 06 năm 2026

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GIẢNG VIÊN HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN






GS.TS. Trịnh Văn Tuyên

PGS.TS. Hồ Tú Cường

PGS. TS. Nguyễn Diệu Trinh

Nguyễn Thị Thảo

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung