

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

TRẦN THỊ THU HIỀN

**PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC
TÍNH CỦA CHỨNG NẤM ĐẢM THU THẬP TỪ VƯỜN QUỐC
GIA BIDOUP- NÚI BÀ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội tháng 12 năm 2015

Lời Cảm Ơn

Trước hết, tôi xin bày tỏ sự biết ơn chân thành và sâu sắc tới PGS.TS. Đặng Thị Cẩm Hà đã tận tình chỉ bảo, quan tâm hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn, giúp tôi có thêm nhiều kiến thức và kinh nghiệm quý báu trong nghiên cứu khoa học.

Xin cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Phân lập và chọn lọc vi sinh vật sinh enzyme ngoại bào ở vườn Quốc gia Bidoup- Núi Bà để tạo nguồn nguyên liệu cho phát triển các chế phẩm ứng dụng trong nông nghiệp, lâm nghiệp” để tôi hoàn thành công trình này. Tôi cũng xin cảm ơn chủ nhiệm đề tài và các thành viên tham gia đã tạo điều kiện giúp tôi thu thập số liệu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới TS. Đinh Thị Thu Hằng, Th.S Đào Thị Ngọc Ánh, Th.S. Nguyễn Thị Lan Anh, Th.S Phạm Quang Huy, Th.S Ngô Thị Huyền Trang, KS. Nguyễn Hải Vân, KS. Nguyễn Đăng Thắng, KS. Hoàng Thị Nhung, CN. Nguyễn Văn Huynh phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã quan tâm, giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình làm khóa luận tốt nghiệp.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn đối với thầy cô viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, viện Công nghệ sinh học đã tận tình dạy dỗ và tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học và thực hiện luận văn này.

Bên cạnh đó, tôi xin cảm ơn bố mẹ, chồng và những người thân yêu nhất đã tạo điều kiện động viên giúp đỡ tôi cả về vật chất và tinh thần để tôi có thể hoàn thành khóa luận này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Trần Thị Thu Hiền

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đã trực tiếp thực hiện các nghiên cứu trong luận văn này. Mọi kết quả thu được không sao chép từ các nghiên cứu khác. Các số liệu, sơ đồ kết quả của luận văn này chưa từng được công bố.

Mọi dữ liệu hình ảnh, biểu đồ và trích dẫn tham khảo trong luận văn đều được thu thập và sử dụng từ nguồn dữ liệu mở hoặc với sự đồng ý của tác giả.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm với những lời cam đoan trên!

Tác giả

Trần Thị Thu Hiền

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

LỜI CAM ĐOAN

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I : TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đặc điểm tự nhiên của Vườn Quốc gia Bidoup – Núi Bà.....	3
1.2. Enzyme laccase.....	4
1.2.1. Giới thiệu về laccase	4
1.2.2. Cấu trúc của phân tử laccase.....	5
1.2.3. Cơ chế xúc tác của laccase	7
1.2.4. Chất gắn kết	8
1.2.5. Tính chất của laccase	8
1.2.5.1. pH tối ưu và độ bền pH.....	8
1.2.5.2. Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt.....	9
1.2.5.3. Hằng số động học của phản ứng laccase	9
1.2.5.4. Chất ức chế laccase	9
1.2.6. Sự phân bố của laccase và vi sinh vật sinh enzyme laccase	10
1.2.7. Gene mã hóa enzyme laccase	12
1.2.8. Ứng dụng của laccase.....	13
1.2.8.1. Xử lý rác thải và loại màu thuốc nhuộm.....	13
1.2.8.2. Ứng dụng xử lý khí độc môi trường ô nhiễm và chuyển hóa polymer mạch dài	14
1.2.8.3. Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm	15
1.2.8.4. Ứng dụng trong công nghệ dược phẩm và công nghệ nano	15
1.2.8.5. Các ứng dụng khác của laccase	16
1.2.9. Chi Polyporus và những đặc tính của nó	17
1.3. Thuốc nhuộm và các đặc tính cơ bản của chúng	20
1.3.1 Khái quát và phân loại về thuốc nhuộm	20

1.3.2. Khả năng phân hủy, loại màu thuốc nhuộm bởi vi sinh vật sinh laccase.....	23
1.3.3. Ô nhiễm nước thải dệt nhuộm và tác hại	26
1.3.3.1. Ô nhiễm nước thải dệt nhuộm do thuốc nhuộm.....	26
1.3.3.2. Tác hại của ô nhiễm thuốc nhuộm.....	26
CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	28
2.1 Vật liệu và phương pháp	28
2.1.1. Vật liệu	28
2.1.2 Hóa chất.....	28
2.1.3 Thiết bị.....	28
2.1.4 Các môi trường nuôi cấy.....	28
2.2 Phương pháp nghiên cứu	29
2.2.1. Phân lập các chủng nấm sinh enzyme ngoại bào	29
2.2.2. Sàng lọc các chủng nấm sinh enzyme ngoại bào	29
2.2.3. Phương pháp thu dịch laccase trên môi trường lên men lỏng để xác định hoạt tính.....	29
2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính laccase	30
2.2.5. Phân loại chủng nấm.....	30
2.2.5.1. Phân loại theo phương pháp truyền thống	30
2.2.5.2 Phân loại bằng phương pháp xác định và so sánh trình tự vùng ITS	31
2.2.5.3. Phương pháp xác định trình tự vùng ITS.....	31
2.2.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp laccase.....	31
2.2.6.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy	32
2.2.6.2. Ảnh hưởng của các chất cảm ứng.....	32
2.2.6.3. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy	32
2.2.6.4. Ảnh hưởng của nguồn cacbon	32
2.2.6.5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ vô cơ.....	32
2.2.6.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ	32
2.2.7. Đánh giá hiệu quả loại màu thuốc nhuộm hoạt tính bằng laccase thô từ chủng nấm FBD154.....	33
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	34
3.1. Phân lập các chủng nấm sinh enzyme ngoại bào	34
3.2. Sàng lọc các chủng nấm sinh enzyme ngoại bào	35
3.3. Đặc điểm hình thái, phân loại và định danh chủng nấm FBD154.....	38
3.3.1. Đặc điểm hình thái.....	38
3.3.2. Phân loại chủng FBD154.....	39

3.3.2.1. Phân loại theo phương pháp truyền thống	39
3.3.2.2. Phân loại bằng phương pháp xác định và so sánh trình tự vùng ITS (ITS1 - 5,8 S - ITS2)	39
3.4. Chọn lọc môi trường và điều kiện nuôi cấy	41
3.4.1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	41
3.4.2. Ảnh hưởng của pH môi trường lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	43
3.4.3. Ảnh hưởng của các chất cảm ứng lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	44
3.4.4. Ảnh hưởng nồng độ CuSO_4 môi trường lên khả năng sinh laccase của chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	46
3.4.5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	47
3.4.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	48
3.4.6.1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ vô cơ.....	48
3.4.6.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ	50
3.5. Khả năng loại màu thuốc nhuộm bằng enzyme thô sinh tổng hợp từ chủng nấm <i>Polyporus sp. FBD154</i>.....	51
3.5.1. Khả năng loại màu nhóm anthraquinone (RBBR, NY5) bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	52
3.5.2. Khả năng loại màu azo (NY1, NY7) bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	54
3.5.3. Khả năng loại màu thương mại (CLS và LF-2B) bởi laccase thô của chủng <i>Polyporus sp. FBD154</i>	55
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	60
Kết luận.....	60
Kiến nghị.....	60
TÀI LIỆU THAM KHẢO	62
Tiếng Việt.....	62
Tiếng Anh	62
PHỤ LỤC.....	74

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
Ace	Acetosyringone
bp	Base pair
CLS	Dimaren Black CLS
CGK	Chất gắn kết
DDT	Dichloro - Trichloroethane Diphenyl
DNA	Deoxyribonucleic acid
Đtg	Đồng tác giả
HCH	Hexachlorocyclohexane
HBT	Hydroxybenzotriazole
ITS	Internal transcribed spacer
Lac	Laccase
LF-2B	Everzol Red
LiP	Lignin peroxidase
MnP	Manganese peroxidase
NY1	Acid red 299
NY5	Acid blue 281
NY7	Acid red 266
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBBR	Remazol brilliant blue R
Si	Sinapic acid
Sy	Syringaldehyde
VIO	Violuric acid
VSV	Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Một số vi sinh vật có khả năng sinh laccase.....	11
Bảng 1.2. Một số loại thuốc nhuộm hoạt tính.....	23
Bảng 3.1. Các chủng nấm sinh enzym ngoại bào	35
Bảng 3.2. Hoạt tính laccase và hình ảnh khuẩn lạc của 7 chủng nấm trên môi trường PDA	36
Bảng 3.3. Hiệu suất loại màu của thuốc nhuộm hoạt tính bằng laccase của FBD154 khi có mặt các chất gắn kết khác nhau	58
Bảng 3.4. So sánh hiệu suất loại màu bởi laccase của chủng nấm FBD154 so với laccase thu được của các chủng nấm khác	59

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh không gian ba chiều của laccase từ <i>M. albomyces</i>	6
Hình 1.2. Trung tâm hoạt động của laccase	6
Hình 1.3. Cơ chế xúc tác của laccase [40]	7
Hình 3.1. Hoạt tính tự nhiên của các mẫu nấm từ Bidoup	34
Hình 3.2. Hoạt tính laccase của 7 chủng nấm phân lập từ Bidoup – Núi Bà.....	38
Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc của chủng nấm FBD154	38
Hình 3.4. Hệ sợi nấm dưới kính hiển vi quang học	39
Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loài của chủng FBD154.....	40
Hình 3.6. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh laccase ở chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154	42
Hình 3.7. Ảnh hưởng pH môi trường lên khả năng sinh laccase của chủng <i>Polyporus</i> sp.FBD154	43
Hình 3.8. Ảnh hưởng của chất cảm ứng lên khả năng sinh laccase của chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154	45
Hình 3.9. Ảnh hưởng nồng độ $CuSO_4$ môi trường lên khả năng sinh laccase của chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154	46
Hình 3.10. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên khả năng sinh laccase của chủng	47
Hình 3.11. Ảnh hưởng của nguồn nitơ vô cơ lên khả năng sinh laccase của chủng <i>Polyporus</i> sp.FBD154	49
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ lên khả năng sinh laccase của chủng <i>Polyporus</i> sp.FBD154	50
Hình 3.13. Khả năng loại màu thuốc nhuộm RBBR (A); NY5 (B) của dịch enzyme thô của chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết	52
Hình 3.14. Sự thay đổi màu RBBR bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus</i> sp.FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.....	52
Hình 3.15. Sự thay đổi màu NY5 bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus</i> sp.FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.....	52
Hình 3.16. Khả năng loại màu thuốc nhuộm NY1 (A); NY7 (B) của enzyme thô của chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.....	54

Hình 3.17. Sự thay đổi màu NY1 bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.....	54
Hình 3.18. Sự thay đổi màu NY7 bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.....	54
Hình 3.19. Khả năng loại màu thuốc nhuộm CLS (A); LF-2B (B) của dịch enzyme thô của chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết	55
Hình 3.20. Sự thay đổi màu CLS bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.....	56
Hình 3.21. Sự thay đổi màu LF-2B bởi laccase thô từ chủng <i>Polyporus</i> sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.....	56