

Phân loại và nghiên cứu khả năng phân hủy nhựa cây trong dăm mảnh gỗ keo của chủng nấm mục trắng *Perenniporia* sp. TĐ95 nhằm ứng dụng trong sản xuất bột giấy sinh học

Nguyễn Thị Hồng Liên^{1,2}, Trần Thị Hương¹,
Nguyễn Văn Hiếu¹, Phan Thị Hồng Thảo^{1,*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18, Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18, Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Hiện nay, nhựa cây đang gây ra nhiều khó khăn cho các nhà máy sản xuất giấy, làm giảm hiệu quả hoạt động của máy móc và chất lượng sản phẩm, gây ô nhiễm môi trường. Trên thế giới, việc ứng dụng công nghệ sinh học (sử dụng enzym và vi sinh vật, đặc biệt là các chủng nấm) nhằm loại bỏ nhựa cây trong nguyên liệu gỗ sản xuất giấy một cách an toàn và hiệu quả đang được quan tâm và phát triển. Trong nghiên cứu này, chủng nấm mục trắng TĐ95 đã được phân loại, định tên và đánh giá khả năng loại nhựa cây trong nguyên liệu gỗ sản xuất bột giấy sinh học. Quả thể nấm của chủng TĐ95 có màu đỏ nâu, mỏng, dạng quạt, mép trơn. Lớp bào tử mịn. Cuống nấm ngắn, nằm ngang, bám chắc vào thân gỗ. Khuẩn lạc có màu trắng tuyết, bông xốp và tỏa tròn đều. Chủng TĐ95 có tốc độ sinh trưởng khá nhanh và khả năng sinh enzym ngoại bào (ligninase, amylase, protease) cao. Trình tự vùng ITS – rDNA của chủng TĐ95 đã được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập [KY849400](#). Dựa vào một số đặc điểm hình thái và phân tích trình tự vùng ITS - rDNA, chủng nghiên cứu được xếp vào chi *Perenniporia* và được đặt tên là *Perenniporia* sp. TĐ95. Chủng TĐ95 sinh trưởng tốt trên dăm mảnh gỗ keo. Sau 15 ngày tiên xử lý dăm mảnh keo với chủng nấm TĐ95, 47,31% lượng nhựa tổng số đã được loại bỏ. Kết quả ban đầu cho thấy chủng TĐ95 có tiềm năng ứng dụng trong tiên xử lý nguyên liệu gỗ nhằm loại bỏ nhựa cây trong sản xuất bột giấy sinh học.

Từ khóa: Bột giấy, dăm mảnh gỗ, nấm mục trắng, nhựa cây, loại nhựa.

1. Đặt vấn đề

“Nhựa cây” là từ dùng để chỉ một số hợp chất tự nhiên có trong gỗ, không tan trong nước

nhưng tan được trong một số dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp. Thành phần chính của nhựa cây bao gồm các triglyxerit, các chất sáp, steryl este, sterol, axit béo và axit nhựa [1]. Dù chỉ chiếm một lượng rất nhỏ (2-5%) trong gỗ nhưng nhựa cây có thể gây ra những vấn đề nghiêm trọng trong sản xuất giấy và bột giấy. Bột giấy bị bẩn do có nhựa cây sẽ làm giảm

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-24 -37916882.

Email: pthongthao@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4626>

chất lượng giấy, giấy bị đốm và có các lỗ thủng. Các chất nhựa có xu hướng kết bám trên bề mặt thiết bị gây ra hỏng hóc và phải dừng sản xuất. Thiệt hại về kinh tế của nhựa cây gây ra đối với quá trình sản xuất bột Kraft chiếm khoảng 1 – 2% giá thành. Ngoài ra, chúng có tác động bất lợi đến môi trường, như tăng độc tố của nước thải, ảnh hưởng đến hệ thủy sinh,... [2]. Sử dụng nấm để loại bỏ nhựa cây trước khi sản xuất giấy được xem là công nghệ đầy triển vọng. Loài nấm đất gỗ *Osphiostoma piliferum* đã được phát triển thành sản phẩm thương mại CartapipTM, được sử dụng nhiều để loại nhựa trong sản xuất giấy đối với gỗ mềm. Tuy nhiên, loài nấm này không thể tấn công vào thành tế bào gỗ nên không thể ăn sâu vào trong tâm gỗ mềm - nơi tập trung nhiều nhựa hơn cả, nhược điểm này đã hạn chế khả năng ứng dụng loại nhựa của nấm *O. piliferum* trên gỗ [3]. Một số loài nấm mục trắng như *Phlebiopsis gigantea*, *Ceriporiopsis subvermisporea* và *Phanerochaete chrysosporiu*,... có thể loại nhựa trên cả gỗ cứng và gỗ mềm. Ngoài khả năng phân hủy lignin giúp tiết kiệm được năng lượng và tăng chất lượng bột giấy, nấm mục trắng có thể loại được các thành phần chính trong nhựa cây như các sterol và axit nhựa hiệu quả hơn nấm đất gỗ. Nấm mục trắng có thể phân hủy các chất chiết béo ở cả phần dất gỗ và tâm gỗ của gỗ thông. Các triglycerit, axit béo, sterol và sáp bị phân hủy gần như hoàn toàn. Hơn nữa, chúng giúp làm giảm độc tính của nước thải sản xuất bột giấy cơ học [4]. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại của chủng nấm mục trắng TĐ95, được phân lập từ rừng tự nhiên cũng như đánh giá khả năng phân hủy nhựa cây trong dăm mảnh gỗ keo nguyên liệu cho sản xuất bột giấy.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Chủng nấm TĐ95 được phân lập từ thân cây mục thu được ở Vườn quốc gia Tam Đảo,

thị trấn Vĩnh Phúc. Gỗ keo được lấy tại nhà máy nguyên liệu thuộc Tổng Công ty Giấy Việt Nam.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường cao malt (MEA) (g/L): cao malt 20; glucose 10; agar, 20; pH 6,0. Môi trường khoai tây (g/L): glucose 20; nước chiết khoai tây 1 lít; pH 6,0. Môi trường Hansen (g/L): Glucose 20, trypton 10, MgSO₄.7H₂O 2, K₂HPO₄ 2, agar 20, pH 6.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân loại TĐ95 bằng đặc điểm hình thái và phân tích trình tự vùng ITS

Hình thái của quả thể nấm được mô tả theo phương pháp của Trịnh Tam Kiệt (2011) [5]. Chủng TĐ95 được nuôi cấy trên môi trường cao malt ở 28°C. Sau 5 ngày, mô tả hình thái của khuẩn lạc. Hình thái hệ sợi được quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus IX71 ở độ phóng đại 400 lần. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi được xác định theo phương pháp của Schwantes và Saltler (1971) [6].

Tách chiết DNA tổng số của chủng TĐ95 theo phương pháp của Sambrook & Russell (2001) [7]. Vùng ITS – rDNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') và ITS4 (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3') [8]. Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100, xử lý bằng phần mềm BioEdit. Sử dụng chương trình BLAST đánh giá mức độ tương đồng gen vùng ITS - rDNA của chủng TĐ95 với các trình tự gen trong GenBank.

Phương pháp nuôi cấy bề mặt và xác định hoạt tính enzym phân hủy lignin

100 g dăm mảnh keo được chặt với kích thước 1-2 cm², cho vào túi nylon, bổ sung nước đạt độ ẩm 60% và khử trùng 121°C trong 15 phút. Giống nấm TĐ95 được thu trên môi trường MEA sau 5 ngày. Nấm được bổ sung vào các túi gỗ đã khử trùng theo tỷ lệ 10⁶ CFU/100g gỗ ướt. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 2 lần

và ủ ở 25°C trong 15 ngày. Mẫu đối chứng được xử lý tương ứng bằng nước khử trùng [2]. Enzym được thu hồi bằng cách chiết dăm gỗ sau nuôi cấy với đệm tương ứng, lắc ở 150 vòng/phút trong 30 phút. Lọc, thu lấy dịch nổi là dịch enzym thô. Hoạt tính của laccase và sterol esterase lần lượt được xác định theo phương pháp của Cho và cộng sự [9] và Fernández và cộng sự [10].

Xác định hàm lượng các chất trích ly trong acetone và cellulose

Dăm mảnh keo sau ủ 15 ngày, được rửa bằng nước cất khử trùng, sấy ở 60°C trong 2 giờ, chẻ mảnh và nghiền thu bột gỗ có kích cỡ 0,3-0,4 mm. Hàm lượng các chất trích ly được xác định theo phương pháp chiết Soxhlex bằng acetone trong 6 giờ [2]. Xác định hàm lượng cellulose theo TAPPI T 203cm-99 [11].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Một số đặc điểm sinh học của chủng TĐ95

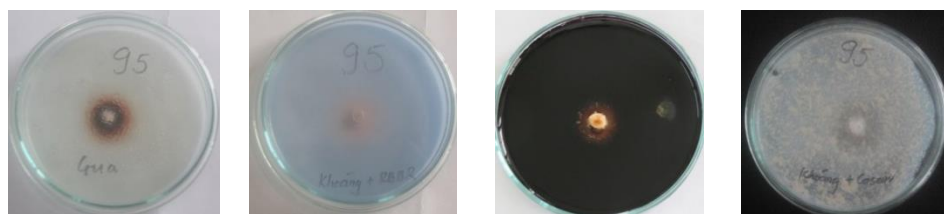
Quả thể nấm của chủng TĐ95 có màu đỏ nâu, mỏng, dạng quạt, kích thước 35 x 45 mm,

mép tron, lượn sóng. Mặt trên tron, lớp bào tử mịn, lỗ bào tử có kích thước nhỏ. Cuống nấm ngắn, nằm ngang, bám chắc vào thân gỗ. Thịt nấm khá cứng. Chủng TĐ95 phát triển tốt trên các môi trường như MEA, Hansen và khoai tây với tốc độ sinh trưởng đạt khoảng 202,38 $\mu\text{m}/\text{giờ}$. Khuẩn lạc có màu trắng tuyết, mép ngoài màu trắng trong, hệ sợi ngắn mảnh, kết vào nhau không chặt làm khuẩn lạc bông xốp, tỏa tròn đều (Hình 1b). Mặt dưới của khuẩn lạc có màu vàng nhạt. Dưới kính hiển vi quang học, sợi nguyên thủy có hình thành vách ngăn và các khóa (clamp connection) (Hình 1c). Theo Hood (2006), khóa là cấu trúc được hình thành trong suốt sự phân chia tế bào của khuẩn ty bậc hai trong hầu hết các dòng nấm thuộc ngành phụ nấm đảm Basidiomycotina [12].

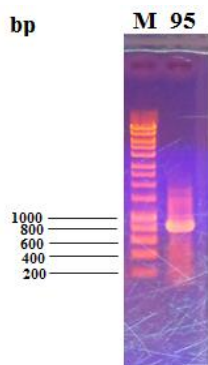
Ngoài hoạt tính phân giải lignin, chủng nấm TĐ95 còn có thể phân huỷ một số cơ chất khác như casein và tinh bột. Khả năng sinh enzym ngoại bào cao sẽ giúp cho nấm dễ dàng thích nghi và sinh trưởng trên nhiều loại cơ chất khác nhau. Nhiệt độ và pH nuôi cấy thích hợp cho chủng sinh trưởng là 20-30°C và pH 4 - 7.



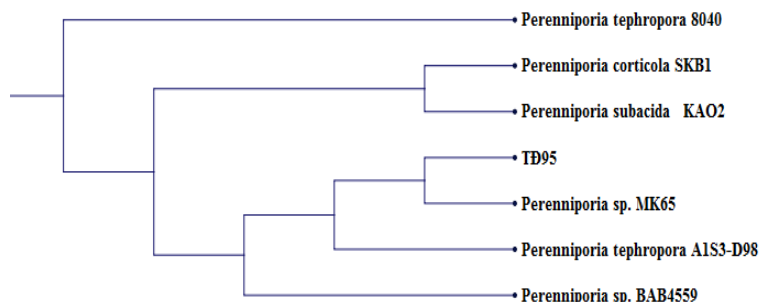
Hình 1. Nấm TĐ95: Trong tự nhiên (a); Trên môi trường MEA: Khuẩn lạc (b) và hệ sợi với các khóa (c).



Hình 2. Hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng nấm TĐ95.



Hình 3. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen vùng ITS của chủng TĐ95.



Hình 4. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng TĐ95 với các loài nấm mục trắng họ hàng gần

3.2. Phân tích trình tự vùng ITS của nấm TĐ95

Vùng ITS được lồng vào bên trong đoạn rDNA lặp lại, có thể cho phép định danh các loài nấm mà ngay cả hệ thống phân loại trước đó không thể làm được [13]. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS của TĐ95 thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất trên gel điện di, có kích thước khoảng 800 bp.

Khi so sánh trình tự gen nhận được trong nghiên cứu với các trình tự gen tương ứng trên ngân hàng dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy trình tự ITS – rDNA của chủng TĐ95 có độ tương đồng cao (99%) so với gen tương ứng của các chủng *Perenniporia* sp. MK65 (KR907878), *P. tephropora* A1S3-D98 (KJ780755), *P. subacida* KAO2 (KC570336)... (Hình 4) và đã được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập KY849400. Kết hợp với các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, tạm xếp chủng TĐ95 thuộc vào chi *Perenniporia* và đặt tên chủng 95 là *Perenniporia* sp. TĐ95. *Perenniporia* là một chi lớn thuộc họ Polyporaceae, có khoảng 90 loài thuộc chi này đã được công bố và phân lập từ nhiều nơi khác nhau trên thế giới: Trung Quốc, Nhật Bản, Brazil, Hoa Kỳ, châu Âu, châu Phi [14].

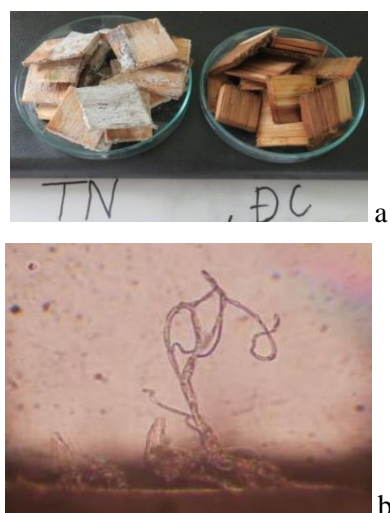
3.3. Khả năng loại nhựa gỗ keo của chủng TĐ95

Sau 15 ngày tiên xử lý dăm mảnh gỗ, hệ sợi nấm mọc trên gỗ ngấn mảnh, có màu trắng tuyết, nấm sát phủ kín dăm gỗ. Khả năng ăn lan của nấm TĐ95 trên dăm gỗ không đều. Phần gỗ có hệ sợi nấm ăn lan có màu sáng hơn đối chứng. Kiểm tra hoạt tính một số enzym chính tham gia vào quá trình loại nhựa cho thấy sterol esterase và laccase lần lượt đạt 258,05 U/g và 88,72 nkat/g gỗ. Hàm lượng nhựa tổng số chiết bằng acetone trong mẫu đối chứng (không xử lý với nấm TĐ95) và trong mẫu thí nghiệm (có xử lý với nấm TĐ95) lần lượt là 3,72% và 1,96% (hình 6). Chủng TĐ95 loại được 47,31% nhựa có trong gỗ keo so với mẫu đối chứng. Có thể thấy hiệu suất loại nhựa của chủng nấm TĐ95 là rất đáng kể. Trong khi đó, hàm lượng cellulose trong mẫu thí nghiệm là khoảng 50,9%, trong mẫu đối chứng là 50,4%, như vậy khi tiên xử lý dăm mảnh keo bằng nấm TĐ95 trước khi sản xuất bột giấy không ảnh hưởng gì đến lượng cellulose có trong gỗ.

Theo nghiên cứu của Farrell và cộng sự (1997), một số loài nấm như *Phanerochaete chrysosporium*, *P. gigantea*, *Perenniporia subacida*, *Phlebia tremetosa*, *Hyphodontia setulosa*, *Coriolus versicolor*, *Inonotus rheades* có hiệu suất loại nhựa trong gỗ thông

vàng từ 33 – 41% cũng sau 15 ngày [2]. Kết quả ban đầu cho thấy có thể sử dụng chủng nấm

Perenniporia sp. TĐ95 để loại nhựa cây trong sản xuất bột giấy trong tương lai.



Hình 5. Nuôi cấy chủng TĐ95 trên cơ chất gỗ keo
a. Mẫu gỗ được tiền xử lý với nấm TĐ95 (TN) và mẫu đối chứng (ĐC);
b. Hình ảnh hiển vi nấm TĐ95 trên gỗ keo



Hình 6. Thu hồi nhựa tổng số tan trong acetone của các mẫu gỗ.

4. Kết luận

Chủng nấm mục trắng TDD được phân lập từ vườn quốc gia Tam Đảo có khả năng loại nhựa cây. Trong bài báo này, kết hợp nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và phân tích trình tự vùng ITS-rDNA, chủng TĐ95 có độ tương đồng cao (99%) với chi *Perenniporia* sp., do đó, được định tên là *Perenniporia* sp. TĐ95. Thử nghiệm nuôi cấy trên dăm mảnh gỗ keo cho thấy chủng *Perenniporia* sp. TĐ95 có tiềm năng ứng dụng tiền xử lý nguyên liệu nhằm loại bỏ nhựa cây trong sản xuất bột giấy.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí của đề tài cơ sở cấp Viện Công nghệ Sinh học, mã số CS16-09.

Tài liệu tham khảo

- [1] Covarrubias R.M., Memphis T.N., Liputra B., Barat J., Methods to control lipophilic extractives in Acacia wood pulp and fiber, United States Patent US8308900B2 (2012).
- [2] Farrell R. L., Hata K. and Wall M. B., Solving Pitch Problems in Pulp and Paper Processes by the Use of Enzymes or Fungi, *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, Vol.57 (1997): 197-212.
- [3] Coloma J., Reyes L., Navarrete J., Alarcón J., Delgado L., Vera R., Ubilla P., Vásquez K., Becerra J., Effect of Albino Ophiostoma strains on Eucalyptus nitens extractives, *Maderas. Ciencia y tecnología*, Vol. 17, No. 1 (2015): 161 – 170.
- [4] Singh A.P., Singh T., Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass bioenergy* Vol. 62 (2014): 198-206.
- [5] Trịnh Tam Kiệt, Nấm lớn ở Việt Nam, Tập 1 (tái bản lần thứ 2) (2011), Nxb. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- [6] Schwantes H. O., Salttler P. W., Methoden zur Messung der Wachstumsgeschwindigkeit von

- Pilzmycelien. Oberhess Naturwiss Zeitschr, Vol. 38 (1971): 5-18.
- [7] Sambrook J. and Russell D. W., Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed (2001). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [8] Gardes M. and Bruns T. D., ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol.Eco.*, Vol. 2 (1993): 113-118.
- [9] Cho N. S., Pashenova N., Hop P. T. B., Leonowicz A. - Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor*, *Cheongju, Korea* (2003): 19-40.
- [10] Fernández J. G., Vaquero M. E., Prieto A., Barriuso J, Martínez MJ., Hermoso JA. Crystal structures of *Ophiostoma piceae* sterol esterase: Structural insights into activation mechanism and product release *J. Struct. Biol.* Vol. 187 (2014): 215–222.
- [11] Tappi. T 203cm-99. Alpha-, beta-, gamma-cellulose in pulp. (2009): 7p.
- [12] Hood I.A., The mycology of the Basidiomycetes. Proceedings of a workshop held in Yogyakarta, Indonesia, Canberra, ACIAR Proceedings Vol. 124 (2006):34-45.
- [13] Jebapriya G. R. and Gnanadoss J. J., Screening and molecular characterization of white rot fungi capable of laccase production and dye decolourization, *Inter J life sci & phar res.*, Vol. 4, No. 2 (2014): 12-20.
- [14] Gerber A.L., Neves M.A., Leite C.L., Some species of *Perenniporia* Murrill (Poriales, Basidiomycotina) from Southern Brazil, *Revta Brasil. Bot.*, São Paulo, Vol. 22, No. 2 (1999):185-193.

Identification and Investigation of the White Rot Fungus *Perenniporia* sp. TD95 for Pretreatment on Wood Chips for Pitch Control in the Biopulping

Nguyen Thi Hong Lien^{1,2}, Tran Thi Huong¹,
Nguyen Van Hieu¹, Phan Thi Hong Thao¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Wood extractives cause production troubles during pulp and paper manufacture, low-quality pulp, pitch deposition and effluent toxicity. New biotechnological solutions such as fungal pretreatment of wood chips can reduce pitch problems. The fungus TD95, which showed high laccase and sterol esterase activity, was identified and assessed for biodegradation of Acacia wood extractives. The fruiting bodies of strain TD95 were red brown, fan-shaped, thin with wrinkled margin. The hymenium was smooth. This fungus was firmly attached to the tree trunk. The colony was off-white, blossom, radiate. The internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA gene sequence of TD95 was deposited in GenBank (NCBI) under the accession number [KY849400](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/KY849400). The fungal strain TD95 belongs to *Perenniporia* species based on its morphological characteristics and the analysis of ITS – rDNA. This fungus could grow well on Acacia wood chips under solid state fermentation. After 15 days of incubation, total extract removal from wood was 47.31% by fungal degradation and holocellulose was not affected. The strain TD95 could be used in pretreatment on wood chip for pitch control in the biopulping.

Keywords: Chips, pitch control, pulping, white rot fungi, wood extractives.