

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	trang 1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
1.1 Sự phân hủy sinh học lignin	trang 3
1.1.1 Sinh khối và sử dụng sinh khối xơ sợi thực vật	3
1.1.2 Khái quát về phân tử lignin	6
1.1.3 Khả năng phân hủy gỗ của nấm đảm Basidiomycetes	8
1.1.4 Cơ chế phân hủy lignin bởi nấm gây mục trắng	14
1.2 Bột giấy sinh học	trang 17
1.2.1 Giới thiệu	17
1.2.2 Thuận lợi và khó khăn trong sản xuất bột giấy sinh học	18
1.2.3 Sản xuất bột giấy sinh học từ nguyên liệu khác gỗ	19
1.2.4 Một số patent trên thế giới về bột giấy sinh học	20
1.3 Các enzyme phân hủy lignin	trang 21
1.4 Sinh học phân tử các gen chi phối sự phân hủy lignin của nấm <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	trang 26
1.4.1 Gen mã hoá cho lignin peroxidase	27
1.4.2. Gen mã hoá cho manganese peroxidase	30
1.5 Nghiên cứu các gen chi phối sự phân hủy ligninocellulose bằng PCR	trang 32
1.5.1 ADN-PCR	33
1.5.2 RT-PCR	34
1.5.3 Inverse PCR	34
1.5.4 Một số ứng dụng của PCR trong nghiên cứu gen chi phối sự phân hủy lignocellulose	35
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	
2.1 Vật liệu và hoá chất	trang 37
2.1.1 Các chủng nấm	37
2.1.2 Môi trường nuôi cấy vi sinh vật và hoá chất	38
2.1.2.1 Các loại môi trường	38
2.1.2.2 Hoá chất	41
2.1.3 Dụng cụ và thiết bị	44
2.2 Phương pháp nghiên cứu	trang 45
2.2.1 Chọn tạo các chủng nấm bằng phương pháp lai	45

2.2.2	Khảo sát khả năng phân hủy lignin và cellulose bằng định tính	46
2.2.3	Khảo sát khả năng phân hủy lignin bằng định lượng	47
2.2.4	Đo hàm lượng cellulose sau khi phân hủy lignin	48
2.2.5	Khảo sát khả năng phân hủy lignin và cellulose của nấm <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	49
2.2.5.1	Khảo sát định tính theo từng mức nhiệt độ	49
2.2.5.2	Khảo sát định lượng	49
2.2.6	Khả năng ứng dụng nấm phân hủy lignin trên một số gỗ thường dùng trong công nghiệp giấy	50
2.2.7	Thu nhận enzyme thô bằng phương pháp rửa phân đoạn với ammonium sulfat bão hoà	50
2.2.8	Thu nhận enzyme bằng nuôi cấy lỏng	52
2.2.9	Xác định hoạt tính enzyme lignin peroxidase và manganese peroxidase	52
2.2.9.1	Xác định hoạt tính enzyme lignin peroxidase	52
2.2.9.2	Xác định hoạt tính enzyme manganese peroxidase	53
2.2.10	Phát hiện các gen chi phối sự phân hủy lignin bằng phương pháp PCR	54
2.2.10.1	Phương pháp tách chiết ADN	54
2.2.10.2	Phương pháp tiến hành phản ứng PCR	55
2.2.10.3	Tinh chế sản phẩm PCR thu nhận được	57
2.2.10.4	Phân tích kết quả PCR	58

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1	Sơ tuyển các dòng nấm tại Việt Nam có khả năng phân hủy lignin	trang 59
3.1.1	<i>Schizophyllum commune</i>	59
3.1.2	<i>Auricularia polytricha</i>	62
3.1.3	<i>Lentinula edodes</i>	64
3.2	Chọn dòng phân hủy lignin tốt từ các chủng nấm thu nhận được	trang 68
3.2.1	Xác định sự phát triển tơ nấm trên môi trường lignin và cellulose	68
3.2.2	Xác định hàm lượng lignin theo thời gian	72
3.3	Khả năng phân hủy lignin của ba chủng <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	trang 74

3.3.1 Chọn chủng <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
phù hợp với yêu cầu nghiên cứu	74
3.3.1.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự phát triển tơ	
nấm trên môi trường lignin và cellulose	74
3.3.1.2 Hàm lượng lignin trên mùn cưa nuôi cấy nấm	79
3.3.1.3 Hàm lượng cellulose trên mùn cưa nuôi cấy nấm	80
3.3.2 Hàm lượng lignin và cellulose còn lại sau thời gian	
nuôi cấy nấm PC.36201 trên các loại gỗ thường dùng	
trong công nghiệp giấy	83
3.3.2.1 Trên trà bông vàng	83
3.3.2.2 Trên keo tai tượng	84
3.3.2.3 Trên bạch đàn	85
3.3.2.4 Trên lồ ô	87
3.4 Tách chiết enzyme phân hủy lignin từ	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	trang 89
3.4.1 Thu nhận enzyme bằng phương pháp nuôi cấy	
trên môi trường lỏng	90
3.4.2 Xác định hoạt tính enzyme lignin peroxidase	90
3.4.3 Xác định sự hiện diện của enzyme	
manganese peroxidase	92
3.4.4 Tách chiết enzyme từ mùn cưa nuôi cấy nấm bằng	
tủa phân đoạn với ammonium sulfat bão hoà	94
3.5 Xác định sự hiện diện của gen chi phối sự phân hủy lignin	trang 98
3.5.1 Thu nhận sản phẩm PCR	98
3.5.2 So sánh trình tự của sản phẩm PCR từ PC.36201 với	
gen <i>mnp1</i> của <i>P.chrysosporium</i> ghi nhận từ Genbank	100
3.5.3 So sánh trình tự của sản phẩm PCR từ LEC với	
gen <i>mnp1</i> của <i>P.chrysosporium</i> ghi nhận từ Genbank	101
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	trang 105
DANH MỤC CÔNG TRÌNH	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	