

## NGHIÊN CỨU SỰ PHÂN HỦY LIGNIN CỦA MỘT SỐ NẤM SỢI

Phạm Thành Hồ, Nguyễn Thị Thanh Kiều

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 17 tháng 6 năm 2003, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 24 tháng 8 năm 2003)

**TÓM TẮT:** Bước đầu thu thập được 15 chủng nấm sợi; tiến hành khảo sát khả năng phân hủy lignin và cellulose. Kết quả tuyển chọn được 12 chủng có khả năng phân hủy lignin tốt và ít phân hủy cellulose.

### I. Đặt vấn đề

Trên thế giới, vấn đề phân hủy lignin bằng vi sinh vật được nghiên cứu nhiều trên nấm *Phanerochaete chrysosporium* và đã có những thành quả nhất định. Ở Nhật, nghiên cứu trên nấm ăn “Shiitake”, thuộc chủng nấm đông cô (*Lentinus edodes*), người ta đã chọn lọc được một chủng có khả năng làm mất 38,4% lignin của gỗ sau một tháng nuôi cấy trên gỗ.

Những kết quả này cho thấy triển vọng nghiên cứu khả năng phân hủy lignin trên một số nấm sợi ở Việt nam là một xứ sở nhiệt đới với sự hiện diện phong phú các loài nấm. Những ứng dụng của nghiên cứu này cũng là vấn đề rất đáng quan tâm nhất là đối với ngành công nghiệp giấy, trước nay vẫn xử lý loại bỏ lignin của gỗ bằng phương pháp hoá học gây ô nhiễm môi trường nước nghiêm trọng.

### II. Vật liệu và phương pháp

#### 1. Đối tượng nghiên cứu

- Chủng *Phanerochaete chrysosporium* nhập từ nước ngoài được lưu giữ tại phòng thí nghiệm, ký hiệu PC
- Chủng *Schizophyllum commune* (nấm chân chim) ngoài tự nhiên, mọc trên thân cây cao su, ký hiệu SC
- *Lentinus edodes* (nấm đông cô) gồm các chủng: *Lentinus edodes* Chiangmai, ký hiệu LE -Ch; *Lentinus edodes* Trung Quốc, ký hiệu LE -TQ; *Lentinus edodes* Cao Bằng, ký hiệu LE -CB; *Lentinus edodes* Nhật Bản, ký hiệu LE-X; *Lentinus edodes* dòng lai, ký hiệu LE-2N; *Lentinus edodes* dòng lai, ký hiệu LE-M; *Lentinus edodes* Mỹ, ký hiệu LE-170; *Lentinus edodes* dòng lai, ký hiệu LE-C.
- *Pleurotus sp.* (nấm bào ngư) : *Pleurotus sp.* (nấm bào ngư) xám Thái Lan, ký hiệu BX-TL; *Pleurotus sp.* (nấm bào ngư) trắng Thái Lan, ký hiệu BT-TL; *Pleurotus sp.* (nấm bào ngư) xám Việt Nam, ký hiệu BX.
- *Auricularia* (nấm mèo): *Auricularia* (nấm mèo) đen, ký hiệu AuD; *Auricularia* (nấm mèo) trắng, ký hiệu AuT.

#### 2. Hoá chất & Môi trường

- Môi trường Raper dùng để nuôi cấy, nhân giống, khảo sát sự tăng trưởng giống, giữ giống. Thành phần gồm: pepton, yeast extract,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , glucose, agar, nước cất.
- Môi trường gạo để nhân giống trung gian gồm gạo lức, nước.
- Môi trường lignin để khảo sát khả năng phân hủy lignin: lignin, agar, nước cất.
- Môi trường CMC để khảo sát khả năng phân hủy cellulose: CMC, agar, nước cất.
- Môi trường mùn cưa để khảo sát hàm lượng lignin bị phân hủy: mùn cưa, vit B<sub>1</sub>,  $MgSO_4$ , nước.
- Hoá chất để khảo sát hàm lượng lignin: HCl đậm đặc,  $H_2SO_4$  đậm đặc, Chlorine, KI,  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  0,2N, tinh bột.
- Thuốc thử CMC: dung dịch Iod.

#### 3. Phương pháp nghiên cứu

##### 3.1 Khảo sát sự tăng trưởng của nấm

- Phân lập tơ thứ cấp: dùng dao cấy tách lấy mô nhầy của tai nấm, cho vào môi trường Raper trong ống nghiệm. Khi tơ nấm đã phát triển đầy ống nghiệm, cấy sang môi trường Raper trong đĩa petri để đo tốc độ lan tơ tương đối.
- Phân lập đơn bào tử: úp tai nấm đã lau sạch trên đĩa petri sạch đã khử trùng trong khoảng 4-5 giờ để thu nhận bào tử. Pha loãng đơn bào tử bằng nước cất, xem mật độ bào tử dưới kính hiển vi bằng phòng đếm hồng cầu, đạt mật độ 200 bào tử/1ml. Hút 0,1ml dịch bào tử cho vào môi trường Raper trên đĩa petri trải đều trên mặt thạch.  
Sử dụng các dòng đơn bào tử để tiến hành lai, cấy 2 miếng thạch của các dòng đơn bào tử để gần nhau, tùy theo kiểu phát triển của tơ, ta xác định được nhân tố di truyền và xác định dòng lai.
- Ở các dòng lai được, cũng khảo sát sự phát triển của nấm bằng cách đo tốc độ lan tơ tương đối như ở tơ thứ cấp.

3.2 Khảo sát khả năng phân hủy lignin và phân hủy cellulose (phương pháp định tính)

- Lấy một miếng thạch nhỏ có tơ nấm, đường kính 5mm, cấy lên môi trường có nguồn cacbon là lignin. Theo dõi độ lan tơ theo thời gian để đánh giá khả năng phân hủy lignin.
- Làm tương tự trên môi trường có nguồn cacbon là CMC để đánh giá khả năng phân hủy cellulose.

3.3 Đo hàm lượng lignin để xác định khả năng phân hủy lignin từ các chủng đã tuyển chọn bằng phương pháp định tính

Dùng phương pháp Tingle để xác định % Cl tiêu thụ. Hàm lượng lignin được tính dựa theo sự tiêu thụ Cl:

$$\% \text{lignin} = 1,86x - 15,65$$

với x: % Cl tiêu thụ

Mẫu dùng để khảo sát hàm lượng lignin là mùn cưa trong ống nghiệm lớn, đường kính 4 cm, giống nấm cấy vào từ meo gạo trung gian. Sau khi cấy 10 ngày, cách 3 ngày mẫu được đem ra đo hàm lượng lignin.

III. Kết quả - thảo luận

3.1. Tốc độ tăng trưởng của chủng *Phanerochaete chrysosporium* trên môi trường Raper với nguồn carbon thay thế

Bảng 1:

Độ lan tơ (mm) của chủng *P. chrysosporium* trên môi trường Raper với nguồn Carbon thay thế

Nguồn C	GLUCOSE	CMC	LIGNIN
Ngày			
2	7,75	0	5,17
3	12,75	0,20	14,57
4	20,35	3,25	23,47
5	32,00	9,85	32,85
6	44,20	16,25	42,10
7	55,30	19,50	51,17
8	65,75	23,60	57,65
9	74,50	27,50	65,50
10	83,75	31,50	69,25

Kết quả trên cho thấy *P. chrysosporium* có khả năng phân hủy lignin tốt nhưng phân hủy cellulose yếu, phù hợp với việc tiền xử lý nguyên liệu làm bột giấy để giảm sử dụng hoá chất và xử lý nước thải.

### 3.2. Tốc độ tăng trưởng của *Schizophyllum commune* trên môi trường Raper với nguồn carbon thay thế

Thu nhận bào tử, tiến hành lai tạo, thu được 17 dòng lai và theo dõi tốc độ tăng trưởng của 17 dòng lai, kết quả như sau:

**Bảng 2:** Độ lan tơ trung bình (mm/ngày) của *Schizophyllum commune*

Tên chủng	Tốc độ lan tơ trung bình trên môi trường CMC	Tốc độ lan tơ trung bình trên môi trường lignin
<u>Dòng tơ thứ cấp ban đầu</u> SC0	18,60	22,70
<u>Dòng lai: (17)</u>		
SC3-SC61	8,30	23,00
SC8-SC62	11,20	17,50
SC8-SC61	13,00	20,50
SC8-SC54	11,00	19,50
SC5-SC50	21,00	24,90
SC3-SC60	18,00	17,30
SC1-SC8	19,20	24,50
SC1-SC7	18,00	20,00
SC1-SC5	19,40	23,50
SC1-SC3	16,00	18,50
SC1-SC12	17,00	18,80
SC1-SC14	13,00	9,40
SC3-SC10	10,20	11,70
SC5-SC10	11,30	9,20
SC4-SC6	14,40	15,00
SC8-SC60	10,70	11,20
SC6-SC9	18,70	20,50

Nhìn chung *Schizophyllum commune* phát triển tốt trên cả hai môi trường lignin và CMC, tuy nhiên bằng phương pháp lai, ta có thể chọn lọc được những dòng phù hợp với mục đích sử dụng. Ta có thể thấy dòng lai SC3-SC61 phù hợp với mục đích phân hủy lignin nhưng ít phân hủy cellulose, còn dòng lai SC1-SC 14 thì ngược lại.

### 3.3. Tốc độ tăng trưởng của *Auricularia polytricha* trên môi trường Raper với nguồn carbon thay thế

**Bảng 3:** Độ lan tơ (mm) của *Auricularia polytricha*

Nguồn Carbon Ngày	GLUCOSE	CMC	LIGNIN
2	8,27	5,90	11,70
3	18,73	15,83	22,70
4	28,67	22,50	32,50
5	37,75	31,25	46,50
6	46,50	40,50	59,00
7	56,17	47,67	70,00
8	67,33	56,33	79,30
9	79,00	64,50	87,50
10	86,50	73,10	-

3.4. Tốc độ tăng trưởng của *Pleurotus* trên môi trường Raper với nguồn carbon thay thế

Bảng 4: Độ lan tơ (mm) của *Pleurotus*

Ngày	Nguồn Carbon		
	GLUCOSE	CMC	LIGNIN
2	8,50	6,90	12,75
3	21,33	19,35	32,15
4	33,75	30,10	45,35
5	47,00	42,75	61,50
6	57,75	54,00	74,25
7	66,25	61,00	84,00
8	74,00	65,75	-
9	83,75	72,00	-
10	-	79,20	-

Ở tơ thứ cấp *Auricularia polytricha* và *Pleurotus* cũng có kết quả tương tự như *Schizophyllum commune*. Chúng tôi chưa tiến hành thí nghiệm lai tạo từ đơn bào tử để tuyển chọn những dòng theo mục đích sử dụng.

3.5. Tốc độ tăng trưởng trên môi trường lignin và môi trường CMC

Chọn lọc và tiến hành khảo sát khả năng phân hủy lignin và phân hủy cellulose của 15 chủng nấm trên môi trường mà nguồn carbon duy nhất là lignin hoặc CMC, sau 2 ngày kể từ khi cấy vào môi trường trên đĩa petri, đo tốc độ lan tơ thu được kết quả sau:

Bảng 5: Tốc độ lan tơ trên môi trường lignin và môi trường CMC (mm)

Chủng nấm	Môi trường lignin					Môi trường CMC						
	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6	Ngày 8	TB (mm/ngày)	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6	Ngày 8	Ngày 10	Ngày 12	TB (mm/ngày)
PC	-	16	30	50	6,25	-	10	11	14,5	17	20,5	1,7
SC	-	-	5	7	0,87	7	13	15,3	18	20	22,5	1,87
LE-Ch	29	36	48,3	74,6	9,33	-	-	-	-	-	-	-
LE-TQ	13,6	23,3	38,6	67,6	8,45	-	-	-	-	-	-	-
LE-CB	20	27,5	38,5	60	7,5	-	-	-	-	-	-	-
LE-X	19,3	27	31	68,6	8,58	-	-	-	-	-	-	-
LE-2N	31,3	34	42,3	72,3	9,04	-	-	-	-	-	-	-
LE-M	26	30,6	37,3	58,3	7,29	-	2	3	4	4	4	0,33
LE-170	18	24	43,3	72,3	9,04	-	-	-	-	-	-	-
LE-C	24,5	30	43,5	72,5	9,06	-	-	-	-	-	-	-
BX-TL	22,5	30,5	36	59	7,37	5	7	8	9	10	12	1
BT-TL	22,3	28,3	39,3	58	7,25	-	10	11	12	12	12	1
BX	31	41	60,6	80,6	10,07	7	17	19	24	26	29	2,4
AuD	12	17,5	24	33,6	4,2	5	12,5	14,5	21	26	33	2,75
AuT	10	17	22	31	3,87	7	12	16,3	21,5	23	25	2,08

Trên môi trường lignin, tuyển chọn được 12 chủng phát triển tốt, tốc độ lan tơ trung bình từ 6,25-10,07 mm/ngày. Đồng thời các chủng này cũng phân giải cellulose với hiệu suất yếu, và chúng

tôi cũng đặc biệt lưu ý, tất cả các chủng *Lentinus edodes* đưa vào thí nghiệm đều không phát triển được trên môi trường CMC.

### 3.6. Sự phân hủy lignin của mùn cưa

Căn cứ vào kết quả định tính trên, chúng tôi tuyển chọn những chủng nấm có khả năng phân hủy lignin tốt nhưng lại ít phân hủy cellulose tiếp tục đưa vào khảo sát khả năng phân hủy lignin của mùn cưa bằng phương pháp định lượng. Điều lưu ý từ kết quả định tính cho thấy tất cả các chủng *Lentinus edodes* đưa vào thí nghiệm đều đáp ứng được yêu cầu này. Các chủng tuyển chọn được bao gồm PC, LE-Ch, LE-TQ, LE-CB, LE-X, LE-2N, LE-M, LE-170, LE-C, BX-TL, BT-TL, BX. Kết quả phân tích định lượng như sau:

Ngày	Hàm lượng lignin trong môi trường mùn cưa nuôi cấy nấm (%)									
	PC	LE-Ch	LE-CB	LE-X	LE-2N	LE-M	LE-170	LE-C	BT-TL	BX
15	99,28	99,14	99,28	98,89	98,75	99,28	97,96	99,02	99,28	98,23
18	98,25	98,09	98,75	98,09	97,96	98,75	96,77	98,62	99,02	96,11
21	96,9	96,64	97,7	97,04	96,51	98,07	95,19	95,45	98,75	94,13
24	94,65	93,72	95,72	95,32	95,85	95,72	93,08	94,4	94,66	93,61
27	94,26	91,89	93,08	95,19	94	95,19	92,95	93,47	94,27	93,21
30	93,72	90,97	92,55	93,47	92,95	92,68	92,81	92,68	93,87	92,42
33	90,56	89,25	90,31	90,44	91,1	91,76	89,12	91,76	92,81	91,36

Hàm lượng lignin giảm dần theo thời gian nuôi cấy, cho đến ngày thứ 33 các chủng nấm vẫn còn tiếp tục phân hủy lignin trong môi trường mùn cưa khá tốt. Tuy nhiên thí nghiệm thực hiện trong ống nghiệm, diện tiếp xúc giữa meo nấm và cơ chất hạn chế nên kết quả hàm lượng lignin bị phân hủy trong 33 ngày chỉ đạt khoảng 8-10%. Chúng tôi sẽ tiến hành thí nghiệm trên cơ chất gỗ ngoài tự nhiên và tiếp tục theo dõi hàm lượng lignin bị phân hủy.

## IV. Kết luận

4.1 Từ 15 chủng thu nhận ban đầu, tuyển chọn được 12 chủng có khả năng phân hủy lignin tốt và phân hủy cellulose yếu để tiếp tục sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

4.2 Tất cả các chủng *Lentinus edodes* đưa vào thí nghiệm đều có khả năng phân hủy lignin tốt và phân hủy cellulose yếu, cần khai thác tốt khả năng này.

4.3 Các dòng lai SC3-SC61 và SC1-SC14 có khả năng khác với dòng cơ bản ban đầu, cho thấy khả năng lai tạo để tuyển chọn những chủng phù hợp với mục đích sử dụng.

## V. Đề nghị

Tiếp tục xem xét khả năng phân hủy lignin và sử dụng cellulose trên môi trường mùn cưa theo thời gian lâu hơn để xác định quy luật phân giải hai cơ chất trên.

Tiến hành thí nghiệm trên gỗ tự nhiên để xem xét khả năng phân hủy lignin.

## STUDY ON LIGNIN-DEGRADING ACTIVITY OF SOME FUNGI

Pham Thanh Ho, Nguyen Thi Thanh Kieu

**ABSTRACT:** Fifteen strains of fungi were isolated and examined for lignin and cellulose-degrading activities. Among them, 12 strains were found to have good lignin-degrading activity but less activity on cellulose.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alexander N.Glazer, Hiroshi Nikaido. *Microbial Biotechnology*. W.II Freeman and company. Newyork 1995, p.328-356
2. Asther et al. *Microbial method for producing lignin peroxidase*. Patent 5153121, date 6/10/1992
3. Blanchette et al. *Pitch and lignin degradation with white rot fungi*. Patent 5705383, date 6/1/1998
4. Buswell et al. *Microorganisms of the Phanerochaete chrysosporium strain and their use*. Patent 4889807, date 26/11/1989
5. Friedrich Emil Brauns, Dorothy Alexandra Brauns. *The chemistry of lignin*. Academic Press, 1960 NY&LD
6. Katsuhiko Babasaki & Masatake Ohmasa. *Breeding of "Shiitake" mushrooms, Lentinus edodes, with high ligninolytic activity*. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher 1991