

## KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ENZYM LIGNIN PEROXIDASE CỦA NẤM *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*

Nguyễn Thị Thanh Kiều, Phạm Thành Hồ

Khoa Sinh học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 8 năm 2003)

**TÓM TẮT:** *Phanerochaete chrysosporium* được biết như một chủng nấm có khả năng phân hủy lignin của gỗ. Khảo sát hoạt tính enzyme lignin peroxidase của chủng *Phanerochaete chrysosporium* ký hiệu P.36201 thu được từ sự nuôi cấy trên môi trường lỏng và mùn của trà mùn dựa vào khả năng oxi hoá veratryl alcohol thành veratryl aldehyd, kết quả cho thấy: Trên môi trường lỏng tốc độ hình thành veratryl aldehyd tăng cao đến ngày thứ 6 và sau đó thì giảm dần, đây là thời gian phù hợp để thu nhận enzyme này. Trên môi trường mùn của, enzyme lignin peroxidase thu được từ sự tủa ở phân đoạn 40% bão hoà  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cho hoạt tính cao nhất.

### MỞ ĐẦU

Nhiều nghiên cứu cho thấy *Phanerochaete chrysosporium* là loài nấm có khả năng phân hủy lignin. Tính chất này mở ra nhiều ứng dụng nhất là đối với công nghiệp sản xuất bột giấy sinh học cũng như khả năng sử dụng nguồn nguyên liệu gỗ sau khi loại trừ lignin vào các quy trình lên men tạo ethanol sử dụng vào nhiều ngành công nghiệp khác như năng lượng, thực phẩm, mỹ phẩm... Từ các nghiên cứu trước về định tính các chủng *Phanerochaete chrysosporium*, chúng tôi sử dụng chủng P36201 có khả năng phân hủy lignin tốt nhưng ít phân hủy cellulose để tiếp tục khảo sát hoạt tính một loại enzyme hiện diện trong loài nấm này có vai trò chính trong sự phân hủy lignin là Lignin peroxidase. Nghiên cứu nhằm bước đầu quan sát sự hiện diện, hoạt tính và thời điểm thu nhận enzyme tốt nhất trong giai đoạn nuôi cấy. Kết quả của nghiên cứu này sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho những nghiên cứu tương tự tiếp theo trên các chủng nấm sợi được thu nhận tại Việt Nam.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

- **Đối tượng nghiên cứu:** Chủng nấm sợi *Phanerochaete chrysosporium* gốc ngoại do Bảo tàng Giống chuẩn vi sinh vật- ĐHQG Hà nội cung cấp và hiện lưu giữ tại Phòng thí nghiệm bộ môn CNSH- ĐHKHTN TPHCM, ký hiệu P.36201.

#### - Môi trường nuôi cấy:

\* Giữ giống trên môi trường Raper gồm peptone (2g), yeast extract (2g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0g), glucose (20g), agar (20g), thêm nước cất đủ 1000ml.

\* Môi trường nhân giống trung gian gồm gạo lức, nước.

\* Môi trường định tính phân hủy lignin gồm lignin (1g), agar (20g), thêm nước cất đủ 1000ml.

\* Môi trường lỏng giới hạn nitrogen để sản xuất enzyme gồm Basal III (100ml), glucose 10% (100ml), đệm succinat 0.1M, pH 4.2 (100ml), dd Thiamin 100mg/l (25ml),



veratryl alcohol 0.4M (100ml), dd ammonium tartrate 8g/l (25ml), dd các yếu tố vi lượng (60ml), thêm nước cất vô trùng đủ 900ml cho pha ổn định hoặc Tween 80 (0.05%) cho pha lắc.

**- Hoá chất:**

Succinate 77mM (hút chính xác 1003.4µl, thêm nước cất đủ 100ml, điều chỉnh pH=2.5); veratryl alcohol (hút chính xác 0.2402ml, thêm nước cất vừa đủ 100ml); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6.75mM (hút chính xác 69µl, thêm vừa đủ 100ml nước cất).

**2. Phương pháp nghiên cứu**

**- Sản xuất enzyme bằng phương pháp nuôi cấy lỏng (Ming Tien & T.Kent Kirk)**

P.36201 nuôi cấy trên môi trường Raper để thu nhận bào tử; huyền phù bào tử với nước cất vô trùng (khử trùng bằng Hypoclorat Ca 0.1%); pha loãng đến mật độ 4.5x10<sup>6</sup> bào tử /ml. Cho 100ml dịch bào tử này vào 100ml môi trường sản xuất enzyme, nuôi cấy ổn định trong erlen 500ml. Sau 4 ngày, bào tử đã nảy mầm và mọc thành những bó tơ nhỏ. Tiến hành pha lắc bằng cách nuôi trong 80ml môi trường, thêm nước cất đủ 1000ml, tỷ lệ giống là 2%.

**- Xác định hoạt tính enzyme lignin peroxidase (LiP) (Ming Tien & T.Kent Kirk)**

Hoạt tính LiP được xác định dựa vào sự oxy hoá veratryl alcohol tới veratryl aldehyd, biểu hiện bằng sự gia tăng hấp thu ở bước sóng 310nm. Thành phần phản ứng gồm: succinate 77mM, pH 2.5 (390µl); dịch enzyme (820µl); veratryl alcohol 14mM (210µl); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6.75mM (80µl). Phản ứng được bắt đầu khi cho H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vào, tiến hành đọc giá trị hấp thu sau mỗi 30 giây.

Công thức tính:

$$\text{Hoạt tính (U/L)} = \frac{C \times d \times 10^{12}}{t \times V}$$

Với:

C = hàm lượng veratryl aldehyde tạo thành

A

$$A = \epsilon l C \quad (A \text{ là giá trị } OD_{310nm}) \Rightarrow C = \frac{A}{\epsilon \times l}$$

$$\epsilon = 9300M^{-1}cm^{-1}$$

l = 1cm (bề dày cuvette quang phổ)

V = thể tích enzyme

d = hệ số pha loãng

Kiểm tra sự hiện diện của lignin peroxidase ở bước sóng 408nm.

**- Tách chiết enzyme từ mùn cưa nuôi cấy nấm bằng tua phân đoạn với ammonium sulfat bão hoà (BioDirectory 2001)**

Mùn cưa nuôi cấy nấm khi đã đầy bịch, nghiền sơ bộ với nước cất lạnh và ngâm lạnh trong 20 phút, thu dịch, bổ sung (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nâng nồng độ bão hoà lên 20%, để yên trong lạnh 30 phút, ly tâm lạnh 4<sup>o</sup>C, 10000 vòng trong 15 phút, thu dịch, tua với 25ml đệm Natri acetate 10mM pH=6, bảo quản lạnh. Tua như trên với nồng độ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bão hoà 40%, 50%, 60%, 70%, 80%.

**Thử lại hoạt tính enzyme trên môi trường lignin**

Dịch chiết enzyme thô đem thử lại trên môi trường lignin, nếu có hoạt tính sẽ xuất hiện vòng phân giải.



## KẾT QUẢ

### 1. Sự sản xuất enzyme Lignin peroxidase trên môi trường lỏng

#### 1.1 Sự oxy hoá veratryl alcohol thành veratryl aldehyd

Dịch nuôi cấy lỏng trong pha lắc được xác định hoạt tính Lignin peroxidase dựa vào sự oxy hoá veratryl alcohol tới veratryl aldehyd biểu hiện bằng gia tăng sự hấp thu ở bước sóng 310nm với hằng số tắt ( $\epsilon$ ) là  $9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dịch enzyme được giữ lạnh trước khi xác định.

Giá trị hấp thu được đo trong 5 phút, cứ 30 giây một lần.

Hình 1: Chủng nấm P36201 nuôi cấy trên môi trường lỏng



Bảng 1: Sự hình thành veratryl aldehyd theo thời gian

Giây		0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
Có $\text{H}_2\text{O}_2$	OD 310nm	0.368	0.373	0.375	0.375	0.376	0.377	0.378	0.378	0.379	0.380	0.381
	$\Delta\text{OD}$ 310nm	0	0.005	0.007	0.007	0.008	0.009	0.010	0.010	0.011	0.012	0.013
	Veratryl aldehyd tạo thành ( $\mu\text{mole}$ )	0	0.538	0.753	0.753	0.860	0.968	1.075	1.075	1.183	1.290	1.398
Không $\text{H}_2\text{O}_2$	OD 310nm	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368
	$\Delta\text{OD}$ 310nm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ở ngày nuôi cấy lắc thứ 3, đo giá trị hấp thu ở bước sóng 310nm. Kết quả cho thấy hàm lượng veratryl aldehyde tăng dần theo thời gian trong điều kiện có mặt  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Khi không có  $\text{H}_2\text{O}_2$  phản ứng không xảy ra. Điều này phù hợp với lý thuyết về chuỗi phản ứng xúc tác của lignin peroxidase, trong đó lignin peroxidase kết hợp với  $\text{H}_2\text{O}_2$  ngay từ giai đoạn đầu để hình thành cơ chất trung gian trong dây chuyền phản ứng phân hủy lignin.

#### 1.2 Hoạt tính lignin peroxidase của chủng P.36201 trên môi trường nuôi cấy lắc

Bảng 2: Kết quả đo hoạt tính lignin peroxidase trong giai đoạn 7 ngày nuôi cấy lắc

Ngày	1	2	3	4	5	6	7
OD 310nm	0	0.72	1.29	2.39	2.94	3.52	3.68
Veratryl aldehyd tạo thành ( $\mu\text{mole}$ )	0	77.419	138.71	256.99	316.129	378.49	395.7
OD 408nm			0.32	0.43	0.547	0.71	0.88
LiP tạo thành ( $\mu\text{mole}$ )			34.41	46.24	58.82	76.34	94.62



Ở ngày thứ 7, veratryl aldehyde vẫn tiếp tục hình thành tuy nhiên tốc độ đã chậm lại. Đo giá trị hấp thụ ở bước sóng 408nm. Kết quả này cho thấy enzyme nên được thu nhận ở ngày thứ 6 trong giai đoạn nuôi cấy lắc sẽ cho hoạt tính cao.

## 2. Hoạt tính enzyme Lignin peroxidase của phân đoạn

P.36201 nuôi cấy trong các bịch mùn cưa tràm, mỗi bịch 200g. Khi tơ nấm lan nay (khoảng 15 ngày), tiến hành tủa phân đoạn và đem đo ở bước sóng 406nm là bước sóng hấp thụ của lignin peroxidase:

Hình 2: Chủng nấm P.36201 nuôi cấy trong bịch mùn cưa tràm



Bảng 3:

Hoạt tính lignin peroxidase của P.36201 trong dịch chiết enzyme ở từng phân đoạn muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

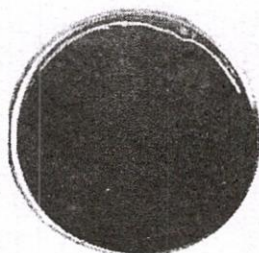
Phân đoạn bão hoà $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	OD <sub>310nm</sub>			Veratryl aldehyd tạo thành ( $\mu\text{mole}$ )	OD <sub>408nm</sub>	LiP tạo thành ( $\mu\text{mole}$ )	Hoạt tính LiP (U/L)
	Giá trị 1	Giá trị 2	$\Delta\text{OD}$				
40	0.1600	0.1700	0.0100	1.0752	0.053	5.6989	26226.07
50	0.1220	0.1270	0.0050	0.5376	0.022	2.3656	13113.03
60	0.1320	0.1350	0.0030	0.3226	0.021	2.2581	7867.82
70	0.1220	0.1240	0.0020	0.2150	0.020	2.1505	5545.21
80	0.0928	0.0930	0.0002	0.0215	0.012	1.2903	524.52

Kết quả cho thấy dịch enzyme lignin peroxidase tủa ở phân đoạn bão hoà  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40% cho hoạt tính cao nhất.

## 3. Kiểm tra hoạt tính enzyme lignin peroxidase trên môi trường lignin

Hút 200  $\mu\text{l}$  dịch enzyme tủa ở phân đoạn bão hoà  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (80%) cho vào giữa đĩa petri chứa môi trường thạch lignin. Sau 30 phút, vòng phân giải lignin có đường kính 3cm. Dịch enzyme sau khi tủa được giữ lạnh ở 4°C, sau 1,2,3 ngày vẫn giữ được hoạt tính.

Hình 3: Dịch chiết lignin peroxidase từ P.36201 tác động lên môi trường lignin





**KẾT LUẬN**

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Thu nhận enzyme từ chủng *Phanerochaete chrysosporium* P.36201 nuôi cấy trên môi trường lỏng vào ngày thứ 6 trong giai đoạn lác cho hiệu quả tốt nhất.
- Dịch enzyme tách chiết từ chủng P.36201 nuôi cấy trên mùn cưa tràm tủa ở phân đoạn bão hoà  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40% cho hoạt tính cao hơn các phân đoạn  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50%, 60%, 70%, 80%.
- Điều kiện thu nhận enzyme khi nuôi cấy P36201 trên môi trường lỏng tốt hơn môi trường mùn cưa.
- Trong điều kiện lưu giữ ở  $4^{\circ}\text{C}$ , enzyme tách chiết được có hoạt tính khá ổn định.

## STUDYING ENZYME LIGNIN PEROXIDASE ACTIVITY OF PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM

Nguyen Thi Thanh Kieu, Pham Thanh Ho

**ABSTRACT:** *Phanerochaete chrysosporium* is the white rot fungi which can degrade lignin of wood. The result of studying enzyme lignin peroxidase activity of the strain P.36201 of this fungi by oxidation veratryl alcohol to veratryl aldehyd shows that: the rate of veratryl aldehyde formation on liquid medium increases to the sixth day then decreases gradually. This is the suitable period to receive enzyme. On acisia sawdust, the enzyme which has the highest activity is received from 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  segment.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. NGUYỄN THỊ THANH KIỀU, PHẠM THÀNH HỒ- Nghiên cứu sự phân hủy lignin và cellulose của ba chủng *Phanerochaete chrysosporium* nhập nội- Tạp chí Khoa học ĐHQG TPHCM số
2. NGUYỄN VĂN MÙI. Thực hành hoá sinh học- NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội 2001.
3. AMERSHAM PARMACIA BIOTECH ASIA PACIFIC - BioDirectory 2001
4. MICHAEL H. GOLD & MARGARET ALIC. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*- Microbiological. Reviews. 9/1993. Vol 57.
5. TIEN, M & T.K.KIRK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*- Methods in Enzymology. 1988. Vol 161.
6. TÀI LIỆU INTERNET: Tienzyme. <http://www.tienzyme.com>