

# NGHIÊN CỨU SỰ PHÂN HỦY LIGNIN VÀ CELLULOSE CỦA BA CHỦNG *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* NHẬP NỘI

Nguyễn thị Thanh Kiều, Phạm Thành Hồ

Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Sinh học, Trường ĐH Khoa học tự nhiên – ĐHQG-HCM  
(Bài nhận ngày 28 tháng 3 năm 2002, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 03 tháng 5 năm 2002)

**TÓM TẮT:** Nghiên cứu khả năng phân hủy lignin và cellulose của ba chủng nấm sợi *Phanerochaete chrysosporium* gốc ngoại ký hiệu P.36200, P.36201, P.36319. Kết quả cho thấy sau thời gian nuôi cấy 45 ngày trên môi trường mùn của với 3 tỉ lệ meo giống khác nhau, hai chủng P.36201, P.36319 có khả năng phân hủy lignin tốt và phân hủy cellulose yếu, ở chủng P. 36200 thì hai khả năng này đều tốt. Trong điều kiện kích hoạt ở 60°C, tốc độ phân hủy lignin tăng lên trong khi tốc độ phân hủy cellulose chậm lại.

## MỞ ĐẦU

*Phanerochaete chrysosporium* là một loài nấm sợi có khả năng phá hủy gỗ trong tự nhiên. Có nhiều loài nấm phân hủy gỗ, nhưng các chủng *Phanerochaete chrysosporium* được sử dụng nhiều để phân hủy lignin trong sản xuất bột giấy sinh học (biopulp) nhờ một số đặc điểm là hầu như không tác động đến cellulose và cho hiệu quả tốt ở nhiệt độ khá cao (khoảng 40°C) [1]. Ứng dụng *Phanerochaete chrysosporium* trong công nghệ làm bột giấy sinh học có ý nghĩa quan trọng là làm giảm giá thành và bớt ô nhiễm do hóa chất thải ra. Các nghiên cứu 3 chủng *Phanerochaete chrysosporium* gốc ngoại nhằm đánh giá khả năng phân hủy lignin và cellulose trong điều kiện khác nhau để tìm chủng thích hợp cho các ứng dụng tại Việt Nam.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu :

– **Đối tượng nghiên cứu :** Ba chủng nấm sợi *Phanerochaete chrysosporium* gốc ngoại do Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật – ĐHQG HN cung cấp và hiện lưu giữ tại phòng thí nghiệm bộ môn CNSH – ĐHKHTN TPHCM, ký hiệu P.36200, P.36201, P.36319.

– **Môi trường nuôi cấy :**

\* Giữ giống trên môi trường Raper gồm peptone (2g), yeast extract (2g), MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (0,5g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,46g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0g), glucose (20g), agar (20g), nước cất (1000ml).

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

\* Môi trường định tính phân hủy cellulose: CMC (20g), agar (20g), nước cất (1000ml).

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

– **Hóa chất :**



Các hóa chất dùng khảo sát hàm lượng lignin và cellulose gồm : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N, NaOH 17,5%, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,5N, chất chỉ thị Ferroun, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,1N, hỗn hợp ethanol (tuyệt đối) - benzen với tỉ lệ 1 : 2.

## 2. Phương pháp nghiên cứu.

- **Quan sát hình thái:** cấy miếng thạch có tơ nấm của 3 chủng *Phanerochaete chrysosporium* P.36200, P.36201, P.36319 lên miếng lam có trải môi trường Raper mỏng, tạo phòng ẩm vô trùng cho tơ nấm phát triển, 2 ngày sau quan sát dưới kính hiển vi.

- Cấy giống nấm lên môi trường agar, đo mức độ lan tơ để định tính tương đối sự phân hủy lignin và cellulose qua việc sử dụng các chất này làm nguồn dinh dưỡng duy nhất.

- Cấy giống nấm vào mùn cưa cao su với tỉ lệ meo giống 1/5, 1/10, 1/20, thực hiện trong điều kiện bình thường và điều kiện kích hoạt ở 60<sup>0</sup>C, xác định hàm lượng lignin và cellulose theo thời gian bằng phương pháp áp dụng tại Nhà máy giấy Đồng Nai TAPPI TEST METHODS [2]. Dùng acid sulfuric 72% để hydro hóa và hóa lỏng các carbohydrate trong gỗ; lignin không hòa tan trong acid được lọc và cân. Hàm lượng cellulose trong mẫu được chiết rút liên tục bằng NaOH 17,5%; phần hòa tan bao gồm β và γ cellulose được xác định bằng sự oxy hóa với K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,5N, phần α cellulose là phần không tan được hóa lỏng bằng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc và được chuẩn độ bằng dung dịch Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,1N.

## KẾT QUẢ

### 1. Quan sát hình thái.

Ba chủng P.36200, P.36201, P.36319 đều có hình thái đặc trưng riêng của từng chủng và chung của nấm đảm *Phanerochaete chrysosporium*, có đỉnh bào tử trên hệ sợi. (Hình 1, 2, 3: hình thái được quan sát dưới kính hiển vi).

### 2. Kết quả định tính tương đối khả năng phân hủy lignin và cellulose.

Mức độ lan tơ nấm trên 2 loại môi trường chọn lọc, chỉ chứa nguồn carbohydrate duy nhất là lignin hoặc cellulose, giúp xác định nhanh một cách tương đối khả năng phân hủy các chất này làm nguồn dinh dưỡng. Theo dõi tốc độ lan tơ của 3 chủng P.36200, P.36201, P.36319 trên môi trường agar-lignin và agar-CMC, ghi nhận được kết quả trên bảng 1 sau :

Bảng 1: Độ lan tơ trung bình của 3 chủng trên môi trường lignin và CMC(cm)

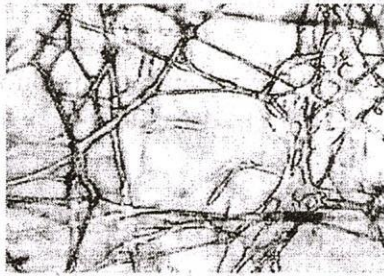
| Chủng    | Ngày | Độ lan tơ trung bình trên môi trường lignin (cm) | Độ lan tơ trung bình trên môi trường CMC (cm) |
|----------|------|--|---|
| P. 36200 | 2    | 2  | 1   |
|          | 3    | 2,4  | 2   |
|          | 4    | 3  | 2,5   |
|          | 5    | 4  | 3,2   |
| P. 36201 | 2    | 2,1  | 0,5   |
|          | 3    | 2,8  | 0,8   |
|          | 4    | 3,5  | 1,1   |
|          | 5    | 4,2  | 1,5   |
| P. 36319 | 2    | 2  | 0,5   |
|          | 3    | 2,5  | 0,8   |
|          | 4    | 3,2  | 1,2   |
|          | 5    | 4,1  | 1,7   |



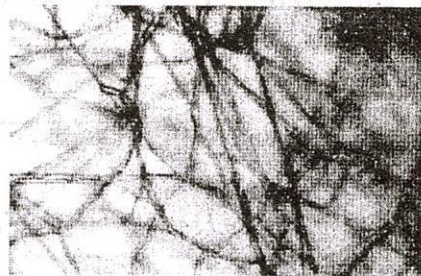
Đến ngày thứ 5, nhỏ dung dịch glugol vào môi trường nuôi cấy trong hộp Petri để quan sát vòng phân giải lignin và cellulose. Kết quả cho thấy :

- Cả 3 chủng đều đồng hóa lignin tốt với mức lan tơ trung bình 4,0 – 4,2 cm và vòng phân hủy lignin lớn (hình 4, 5 và 6) với đường kính 7 cm (P. 36200), 8 cm (P. 36201) và 7 cm (P36319). Vòng phân hủy lignin rộng hơn nhiều so với lan tơ chứng tỏ có tác động của enzyme ngoại bào. Điều này có ý nghĩa quan trọng khi ứng dụng vào sản xuất.

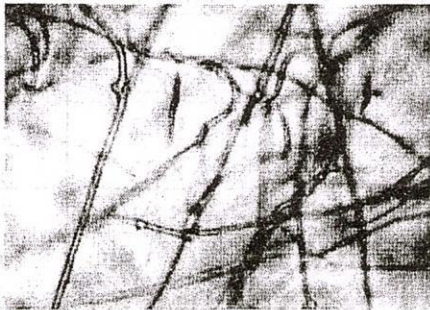
- Khả năng đồng hóa và phân giải cellulose thấp, trừ chủng P. 36200.



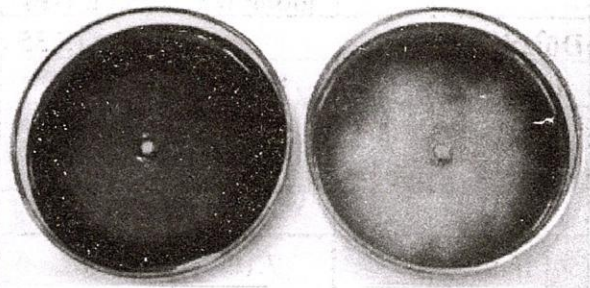
Hình 1. Hình dạng sợi tơ chủng P.36200



Hình 2. Hình dạng sợi tơ chủng P.36201

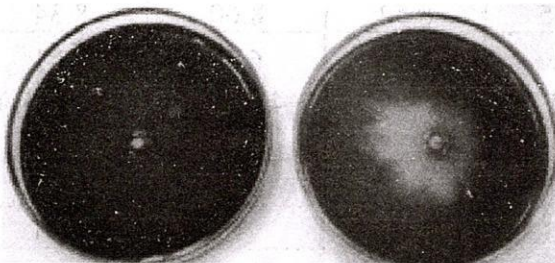


Hình 3. Hình dạng sợi tơ chủng P.36319.

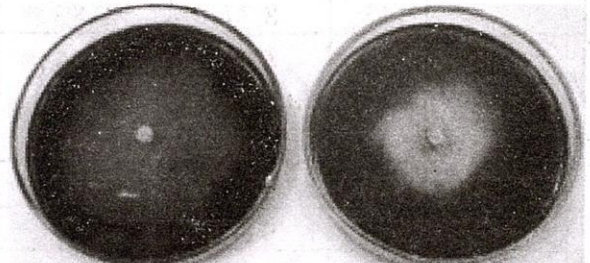


Môi trường lignin    Môi trường CMC  
Chủng P. 36200

Hình 4. Vòng phân giải của P.36200 trên môi trường lignin và CMC sau 5 ngày nuôi cấy.



Môi trường lignin    Môi trường CMC  
Chủng P.36201



Môi trường lignin    Môi trường CMC  
Chủng P. 36319

Hình 5. Vòng phân giải của P.36201 trên môi trường lignin và CMC sau 5 ngày nuôi cấy.

Hình 6. Vòng phân giải của P.36319 trên môi trường lignin và CMC sau 5 ngày nuôi cấy.



### 3. Kết quả định lượng lignin trên mùn của nuôi cấy mẫu.

Bước tiếp theo là đánh giá sự phân hủy bằng định lượng để có kết quả chính xác hơn. Các phân tích được thực hiện sau khi cấy meo giống 15, 25, 35 và 45 ngày với tỉ lệ meo giống 1/5, 1/10 và 1/20 so với lượng nguyên liệu ban đầu. Hàm lượng lignin có trong mẫu được tính theo % so với trọng lượng khô được nêu trên bảng 2 với 2 số liệu : số tuyệt đối và số tương đối (trong ngoặc) so với đối chứng (coi là 100%). Từ kết quả ở bảng 2 có thể rút nhận xét:

– Sau 45 ngày nuôi cấy với 3 tỉ lệ meo giống khác nhau, hàm lượng lignin trong cơ chất giảm ít nhất là 6,11% (39,34% so với đối chứng) và cao nhất là 8,13% (52,96% so đối chứng). Trừ 1 trường hợp 39,34% so với đối chứng, các trường hợp khác lignin đều giảm trên 40%.

– 3 chủng *P.36200*, *P.36201*, *P.36319* có khả năng phân hủy lignin tương đương nhau, đặc biệt chủng *P.36319* tác động mạnh hơn 2 chủng kia, nhất là khi được kích hoạt ở 60°C.

Bảng 2: Hàm lượng lignin (%) có trong mẫu sau thời gian nuôi cấy

| Chủng                   | Ngày | Mẫu bình thường                      |                         |                         | Mẫu kích hoạt 60°C      |                         |                         |
|-------------------------|------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                         |      | Tỉ lệ meo giống 1/5                  | Tỉ lệ meo giống 1/10    | Tỉ lệ meo giống 1/20    | Tỉ lệ meo giống 1/5     | Tỉ lệ meo giống 1/10    | Tỉ lệ meo giống 1/20    |
| <b>Đối chứng</b>        |      | <b>15.35 (tương ứng 100% lignin)</b> |                         |                         |                         |                         |                         |
| <b>P.36200</b>          | 15   | 10.21                                | 10.57                   | 10.58                   | 10.19                   | 10.21                   | 10.14                   |
|                         | 25   | 9.68                                 | 10.05                   | 10.42                   | 9.59                    | 9.07                    | 9.63                    |
|                         | 35   | 9.43                                 | 9.56                    | 10.05                   | 8.66                    | 8.82                    | 9.33                    |
|                         | 45   | 8.25                                 | 8.53                    | 9.24                    | 7.87                    | 8.01                    | 9.15                    |
| Lignin giảm sau 45 ngày |      | <b>7.10</b><br>(46.25%)              | <b>6.82</b><br>(44.43%) | <b>6.11</b><br>(39.34%) | <b>7.48</b><br>(48.73%) | <b>7.34</b><br>(47.82%) | <b>6.20</b><br>(40.39%) |
| <b>P.36201</b>          | 15   | 10.76                                | 10.01                   | 10.5                    | 9.99                    | 9.60                    | 9.73                    |
|                         | 25   | 10.10                                | 9.34                    | 9.87                    | 9.35                    | 9.09                    | 8.98                    |
|                         | 35   | 9.03                                 | 8.94                    | 9.58                    | 8.95                    | 8.80                    | 8.67                    |
|                         | 45   | 8.77                                 | 8.89                    | 9.15                    | 8.52                    | 8.60                    | 8.34                    |
| Lignin giảm sau 45 ngày |      | <b>6.58</b><br>(42.86%)              | <b>6.46</b><br>(42.08%) | <b>6.20</b><br>(40.39%) | <b>6.83</b><br>(44.49%) | <b>6.75</b><br>(43.97%) | <b>7.01</b><br>(45.67%) |
| <b>P.36319</b>          | 15   | 9.73                                 | 10.45                   | 10.89                   | 9.88                    | 9.77                    | 10.06                   |
|                         | 25   | 9.29                                 | 9.01                    | 10.30                   | 8.37                    | 9.18                    | 9.31                    |
|                         | 35   | 8.41                                 | 8.76                    | 9.85                    | 8.10                    | 8.30                    | 8.43                    |
|                         | 45   | 7.93                                 | 8.47                    | 8.61                    | 7.22                    | 7.71                    | 7.89                    |
| Lignin giảm sau 45 ngày |      | <b>7.42</b><br>(48.34%)              | <b>6.88</b><br>(44.82%) | <b>6.74</b><br>(43.90%) | <b>8.13</b><br>(52.96%) | <b>7.64</b><br>(49.77%) | <b>7.46</b><br>(48.60%) |



#### 4. Kết quả định lượng cellulose trên mùn cưa nuôi cấy mẫu.

Việc định lượng cellulose được thực hiện song song và cũng tương tự như phân tích lignin. Kết quả trên bảng 3 cho phép có những nhận xét:

– Sau 45 ngày cấy meo nấm vào cơ chất với các tỉ lệ khác nhau, hàm lượng cellulose trong cơ chất giảm ít nhất là 5,96% (7,96% so với đối chứng) và cao nhất là 17,47% (23,34% so với đối chứng). 13 trường hợp trên 10% so với đối chứng, 5 trường hợp dưới 10%.

– Ở mẫu bình thường hàm lượng cellulose giảm nhiều hơn mẫu được kích hoạt ở 60°C. Điều này có thể là do enzyme tác động lên sự phân giải lignin hoạt động mạnh ức chế lại tác động của enzyme tác động trên sự phân giải cellulose.

– Chủng *P.36200* làm giảm hàm lượng cellulose nhiều hơn hai chủng *P.36201* và *P.36319*. Tính chất này cho phép chọn lựa chủng nấm phù hợp tùy theo mục đích sử dụng.

Bảng 3. Hàm lượng cellulose (%) có trong mẫu sau thời gian nuôi cấy

| Chủng                          | Ngày | Mẫu bình thường                         |                      |                      | Mẫu kích hoạt 60°C    |                      |                      |
|--------------------------------|------|---|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
|                                |      | Tỉ lệ meo giống 1/5                     | Tỉ lệ meo giống 1/10 | Tỉ lệ meo giống 1/20 | Tỉ lệ meo giống 1/5   | Tỉ lệ meo giống 1/10 | Tỉ lệ meo giống 1/20 |
| <b>Đối chứng</b>               |      | <b>74.85 (tương ứng 100% cellulose)</b> |                      |                      |                       |                      |                      |
| <i>P.36200</i>                 | 15   | 71.87                                   | 72.48                | 69.04                | 72.07                 | 72.79                | 74.53                |
|                                | 25   | 65.34                                   | 68.89                | 68.89                | 70.32                 | 72.69                | 70.63                |
|                                | 35   | 61.38                                   | 67.55                | 68.37                | 63.75                 | 71.81                | 70.32                |
|                                | 45   | 57.38                                   | 65.08                | 65.7                 | 61.9                  | 66.93                | 68.58                |
| Cellulose giảm sau 45 ngày (%) |      | <b>17.47 (23.34%)</b>                   | <b>9.77 (13.05%)</b> | <b>9.15 (12.22%)</b> | <b>12.95 (17.30%)</b> | <b>7.92 (10.58%)</b> | <b>6.27 (8.38%)</b>  |
| <i>P.36201</i>                 | 15   | 68.47                                   | 68.89                | 72.74                | 73.82                 | 74.43                | 73.3                 |
|                                | 25   | 67.24                                   | 68.37                | 69.35                | 71.35                 | 73.1                 | 70.73                |
|                                | 35   | 66.11                                   | 68.17                | 68.58                | 65.7                  | 71.66                | 69.6                 |
|                                | 45   | 64.26                                   | 66.73                | 67.19                | 65.08                 | 67.34                | 68.89                |
| Cellulose giảm sau 45 ngày (%) |      | <b>10.59 (14.15%)</b>                   | <b>8.12 (10.85%)</b> | <b>7.66 (10.23%)</b> | <b>9.77 (13.05%)</b>  | <b>7.51 (10.03%)</b> | <b>5.96 (7.96%)</b>  |
| <i>P.36319</i>                 | 15   | 71.56                                   | 71.45                | 71.76                | 71.97                 | 72.17                | 73.61                |
|                                | 25   | 66.73                                   | 68.78                | 70.22                | 67.76                 | 71.76                | 71.97                |
|                                | 35   | 64.21                                   | 67.55                | 69.09                | 65.24                 | 70.12                | 69.5                 |
|                                | 45   | 62.2                                    | 64.67                | 68.06                | 63.54                 | 67.55                | 68.78                |
| Cellulose giảm sau 45 ngày (%) |      | <b>12.65 (16.9%)</b>                    | <b>10.18 (13.6%)</b> | <b>6.79 (9.07%)</b>  | <b>11.31 (15.11%)</b> | <b>7.30 (9.75%)</b>  | <b>6.07 (8.11%)</b>  |



## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy :

- Hai chủng *Phanerochaete chrysosporium* ký hiệu P.36201 và P.36319 có khả năng phân giải lignin khá tốt và phân giải cellulose thấp; chủng P.36200 cũng có khả năng phân giải lignin tốt nhưng đồng thời khả năng phân giải cellulose cũng cao.
- Sự phân hủy lignin của các chủng nghiên cứu do tác động của enzyme ngoại bào.
- Trong điều kiện kích hoạt ở 60<sup>0</sup>C, tốc độ phân giải lignin tốt hơn và tốc độ phân giải cellulose chậm lại.
- Chủng P.36201 có nhiều triển vọng cho ứng dụng vào sản xuất bột giấy sinh học.

## STUDYING THE DEGRADING LIGNIN AND CELLULOSE OF THREE STRAINS OF *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* FROM FOREIGN COLLECTION

Nguyen thi Thanh Kieu, Pham Thanh Ho

Department of Biotechnology, Faculty of Biology, University of Natural Sciences,  
Vietnam National University – Ho Chi Minh City.

**ABSTRACT:** Studying the degrading lignin and cellulose of three strains of *Phanerochaete chrysosporium* from foreign collection, marked P.36200, P.36201, P.36319, the result shows that after 45 days, P.36201 and P.36319 have good lignin-degrading activity but less activity on cellulose. These two activities of P.36200 are good. Lignin- degrading activity increases when putting them in the condition of 60<sup>0</sup>C but cellulose-degrading activity decreases.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bushwell et al. *Microorganisms of the Phanerochaete chrysosporium strain and their use*, USA Patent 4889807, date 26/11/1989.
2. Nhà máy giấy Đồng nai. *Paper and paperboard Testing*, 1991
3. R.G.Veness & Christine S. Evan. *The role of hydrogen peroxide in cellulose-degrading cultures of wood-rotting Basidiomycetes*. School of Biological Sciences, Thames Polytechnic, London,UK. 1996. p. 409 – 414.
4. TÀI LIỆU INTERNET:
  - *Biochemistry of lignin degradation* – <http://www.bmb.ogi.edu/research.html>
  - *Phanerochaete chrysosporium* – Tom Wolk's Fungus of the Month for May 1997 – <http://www.wisc.edu/botany/fungi/may97.html>