

SÀNG LỌC VÀ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LIGNIN PEROXIDASE (LiP) TỪ NẤM TRÊN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN LỎNG

Vũ Đình Giáp^{1,2}, Đặng Thu Quỳnh^{1,3}, Đỗ Hữu Nghị^{1,3,✉}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ HaUI, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

³Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nghi@inpc.vast.vn

Ngày nhận bài: 07.12.2020

Ngày nhận đăng: 05.7.2021

TÓM TẮT

Nấm lớn được biết đến có khả năng sinh tổng hợp nhiều enzyme khác nhau như enzyme thủy phân ngoại bào và oxy hóa để tấn công hiệu quả các cấu trúc lignocellulose trong thành tế bào thực vật. Lignin peroxidase là enzyme ngoại bào được sinh tổng hợp ở nhiều loại nấm khác nhau và lần đầu tiên năm 1987 được phân lập từ nấm *P. chrysosporium*. Enzyme có khả năng oxy hóa các hợp chất có tiềm năng oxy hóa khử cao khi có mặt H₂O₂ dẫn đến quá trình oxy hóa electron các hợp chất khác nhau bao gồm phenol, amin thơm. Thông qua phản ứng trùng hợp, các hợp chất có vòng phenol giảm khả năng phản ứng và độ hòa tan, do đó làm giảm độc tính. Vì vậy, LiP được ứng dụng để làm sạch nguồn chất thải có hàm lượng phenol cao và độc tố phenol halogen với thành phần chính là các hợp chất hydroxyl phenol. Trong nghiên cứu này, 39 chủng nấm phân lập tại Vườn quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mường Phăng (Điện Biên) được sàng lọc khả năng sinh enzyme LiP. Trong đó, 14 chủng biểu hiện hoạt tính từ 13,8 đến 108,8 U/mL khi phát triển trên môi trường lỏng, cơ chất rơm. Chủng *Lentinus squarrosulus* MNP12 định danh bằng sinh học phân tử biểu hiện hoạt tính cao nhất với hoạt độ LiP đạt 108 U/mL trên môi trường cơ bản và 896 U/mL ở điều kiện thích hợp, bổ sung chất cảm ứng veratryl alcohol (0,3 g/L), nguồn carbon từ sucrose (10 g/L), nguồn nitrogen từ urea (5 g/L) sau 9 ngày lên men dịch thể ở 28 °C, pH 5,0 trong điều kiện lắc liên tục 200 vòng/phút.

Từ khóa: Hemeprotein, lignin, lignin peroxidase, lignocellulose degrading enzymes, polymer carbohydrate

ĐẶT VẤN ĐỀ

Lignin là một trong những nguyên liệu tái tạo thô dồi dào, chiếm 20-30 % thành tế bào thực vật thân gỗ, là polyphenol có cấu trúc mở và đóng vai trò là chất liên kết giữa cellulose và hemicellulose trong thành tế bào thực vật (Palonen *et al.*, 2004). Nấm được biết đến là vi sinh vật phân giải lignin hiệu quả nhất. Sự phân hủy sinh học lignin do nấm là một quá trình phân giải bằng đa enzyme có tác dụng hiệp đồng. Chúng có vai trò quan trọng trong nhiều ứng dụng công nghệ sinh học như trong công nghiệp giấy, xử lý nước thải, sản xuất ethanol, tẩy trắng sinh học nhờ khả năng oxy hóa cao (Leonowicz *et al.*, 1999). Lignin peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14) là enzyme ngoại bào được sinh tổng hợp ở nhiều loại nấm khác nhau và được phân lập lần đầu tiên (năm 1987) từ nấm *P. chrysosporium* (Tien *et al.*, 1984). Enzyme LiP là một hemeprotein ngoại bào có khả

năng oxy hóa các hợp chất có tiềm năng oxy hóa khử cao khi có mặt H₂O₂ dẫn đến quá trình oxy hóa electron của các hợp chất khác nhau như phenol, amin, methoxy benzene, nonphenolic nên có thể oxy hóa cả các chất có cấu trúc phenol và dẫn xuất phenol của lignin ngay cả khi không có chất trung gian (Leonowicz *et al.*, 1999). Vì vậy, chúng đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy sinh học lignin của thành tế bào thực vật. Enzyme LiP thường được ứng dụng để làm sạch nguồn chất thải có hàm lượng phenol cao và chất có độc tố phenol halogen hóa với thành phần là các hợp chất hydroxyl phenol (Sahadevan *et al.*, 2016). Thông qua phản ứng trùng hợp, các hợp chất phenol làm giảm khả năng phản ứng và độ hòa tan của chúng và có xu hướng kết tủa nên làm giảm độc tính của những hợp chất này (Kirk *et al.*, 1990). Quá trình sinh tổng hợp enzyme LiP từ nấm bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như: thành phần môi trường lên men, thời gian,

nguồn cacbon và nitrogen, pH, nhiệt độ và đặc biệt là nồng độ cơ chất cảm ứng (veratryl alcohol). Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày một số kết quả sàng lọc hoạt tính enzyme LiP của một số chủng nấm phân lập từ 2 vùng sinh thái (Vườn quốc gia Cúc Phương và Mường Phăng). Sau đó, xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp để nâng cao khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng nấm: 39 chủng nấm nghiên cứu được phân lập tinh sạch từ mẫu nấm thu thập tại Vườn quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và Mường Phăng (Điện Biên). Một số chủng tiềm năng sau khi sàng lọc hoạt tính enzyme được định tên bằng phương pháp sinh học phân tử phục vụ cho những nghiên cứu sâu hơn và được lưu giữ tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường nhân giống: Nấm phát triển trên môi trường thạch PDA (khoai tây 200 g/L, dextrose 20 g/L, agar 17 g/L, H₂O 1 lít), nuôi cấy ở 27 °C và lưu giữ 4 °C sau khi khuẩn ty phát triển đầy bề mặt thạch. Để nhân giống cho quá trình sinh tổng hợp enzyme, khuẩn ty nấm từ môi trường thạch được cấy chuyển sang các đĩa môi trường thạch mới, khoảng 1 tuần để nấm phát triển phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp nghiên cứu

Sàng lọc trên môi trường dịch thể

Nấm được nuôi cấy trên môi trường cơ bản bao gồm các thành phần cần thiết cho sự phát triển của nấm: MgSO₄ (0,5 g/L); KH₂PO₄ (1,5 g/L); cao nấm men (2,0 g/L); dịch vi lượng (100 mL), Tween-80 (0,5 g/L), pH 5,5 và bổ sung 2 % (w/v) cơ chất giàu lignocellulose (rom). Sau đó mẫu được nuôi cấy trong các bình Erlenmeyer 250 ml chứa 75 ml môi trường trong điều kiện lắc liên tục 200 vòng/phút, ở 25 °C. Sau 10 ngày, dịch nuôi cấy lỏng được lấy để đánh giá hoạt tính enzyme LiP. Hoạt tính cao nhất trong suốt quá trình nuôi cấy được so sánh giữa các chủng nấm với nhau để lựa chọn chủng sinh enzyme có hoạt tính enzyme cao.

Định tên nấm bằng phương pháp sinh học phân tử

Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết bằng CTAB của Doyle (1987) và

kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1 % (80 - 100 V). Sau quá trình tách chiết hàm lượng ADN tổng số được kiểm tra và định lượng bằng thiết bị đo quang phổ ở bước sóng $\lambda = 260$ và 280 nm. Quá trình tinh sạch DNA được thực hiện bằng bộ KIT Fermentas (Thermo Fisher, Waltham, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nhân gen đích bằng kỹ thuật PCR: Vùng gen đích (ITS) được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990). Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25 μ L gồm các thành phần: 13 μ L d.H₂O; 2,5 μ L đệm 10X; 1 μ L MgCl₂ 25 mM; 2,5 μ L dNTP 2,5 mM; 1,25 μ L mồi xuôi (10 pmol/ μ L); 1,25 μ L mồi ngược (10 pmol/ μ L); 0,5 μ L Taq polymerase (5 U μ L); 3 μ L DNA (10–20 ng). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: 94 °C trong 3 phút; tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94 °C trong 45 giây, 55 °C trong 45 giây, 72 °C trong 45 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72 °C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4 °C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose 1,5 % và tinh sạch bằng Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Đức). Sản phẩm này được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp hai chiều (mồi xuôi và mồi ngược) với mồi ITS1/ITS4, sử dụng BigDye terminator cyclor v3.1 và đọc kết quả trên hệ thống ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ).

Trình tự nucleotide của các chủng nấm được so sánh với các trình tự đã có trên GenBank, sử dụng phần mềm BLAST trong NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Trình tự DNA sau khi đọc được hiệu chỉnh bằng mắt với sự trợ giúp của phần mềm ChromasPro 1.7.6 (Technelysium Pty Ltd., Australia) để loại bỏ các vùng tín hiệu nhiễu. Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 (Hall *et al.*, 1999), Clustal W, GeneDoc 2.7 (Nicholas *et al.*, 1997). Các vùng không có khả năng sắp xếp bị loại bỏ trước khi phân tích. Mối quan hệ họ hàng của chủng nấm MPN12 với các loài/thứ trong cùng chi được lấy trên Ngân hàng gen (GenBank). Dựa trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA của các loài thuộc chi *Lentinus* spp., sau đó sắp xếp căn chỉnh bằng GeneDoc để xây dựng cây phả hệ bằng MEGA X sử dụng phương pháp Maximum Likelihood (ML) với hệ số tin tưởng (bootstrap) 1000 lần lặp lại (Kumar *et al.*, 2018).

Xác định hoạt tính lignin peroxidase

Hoạt tính lignin peroxidase (LiP) được xác định bằng cách sử dụng 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) (Sigma) làm cơ chất. Thể tích cuối cùng là 1 mL trong hỗn hợp phản ứng chứa dung dịch đệm natri succat 100 mM (pH 5,5), 82 mM 4-aminoantipyrine (Sigma), 1,0 mM 2,4-DCP, 4,0 mM H₂O₂ và 100 µL dịch enzyme. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm H₂O₂ và sự gia tăng độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm trong 1 phút ở 37 °C. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U) được xác định là 1 µmol 2,4-DCP bị oxy hóa mỗi phút (Mehboob *et al.*, 2011).

Ảnh hưởng của chất cảm ứng veratryl alcohol (Va) đến khả năng sinh LiP của nấm

Nấm được lên men trong môi trường cơ bản bao gồm các thành phần như mô tả ở trên và có bổ sung chất cảm ứng veratryl alcohol với nồng độ 0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 g/L. Dịch bào từ nấm được chuyển vào 100 mL môi trường đã được chuẩn bị sẵn trong bình 250 mL với tỷ lệ tiếp giống là 5 %. Nấm được lên men ở 30 °C, 200 vòng/phút.

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitrogen đến khả năng sinh LiP của nấm

Ảnh hưởng của nguồn carbon khác nhau đến sinh tổng hợp enzyme LiP được xác định bằng cách bổ sung (10 g/L) các loại đường khác nhau bao gồm glucose, fructose, sucrose, lactose, maltose và tinh bột vào môi trường nuôi cấy. Trong khi đó, để xác định khả năng đồng hóa các nguồn nitrogen khác nhau, cao nấm men cung cấp nitrogen cho nấm sinh trưởng từ môi trường cơ bản được thay thế và thử nghiệm bằng các nguồn khác bao gồm (5 g/L): KNO₃, (NH₄)₂SO₄, pepton, NaNO₃ và urea.

Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng sinh LiP của nấm

Chủng nấm nghiên cứu được lên men trên môi trường cơ bản (pH 5,5) bổ sung chất cảm ứng, nguồn carbon và nitrogen thích hợp. Quá trình lên men nấm được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau bao gồm 22, 24, 26, 28, 30 và 32 °C. Bên cạnh đó, để nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến sự sinh tổng hợp enzyme LiP, môi trường lên men được điều chỉnh pH từ 4,5–8,0 bằng dịch đệm acetate 100 mM (pH 4,5–5,5) và đệm phosphate 100 mM (pH 6–8). Nấm được lên men trong điều kiện lắc liên tục 200 vòng/phút, sau 9 ngày lên men, dịch enzyme thô thu nhận sau quá trình lên men được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút sau đó xác định hoạt tính enzyme LiP.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc chủng nấm sinh tổng hợp enzyme LiP

Khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP của 39 chủng nấm được đánh giá thông qua việc xác định hoạt tính enzyme trong dịch lên men (sau ly tâm loại bỏ sinh khối) trên cơ chất 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP, Sigma).

Kết quả bảng 1 cho thấy, có 14/39 chủng (chiếm ≈ 35 %) có khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP với hoạt tính dao động từ 13,8 đến 108,8 U/mL. Trong đó, có một số chủng biểu hiện hoạt tính cao là *Lentinus* sp. MPN12 (108,8 U/mL), *Schizophyllum commune* CPG27 (67,9 U/mL) và *Pleurotus pulmonarius* CPG6 (102,6 U/mL). Hoạt tính enzyme LiP từ chủng nấm trên cao hơn so với *Ganoderma leucidum* (2,8 U/mL) trên môi trường rắn bổ sung nguồn carbon từ cao nấm men (4 %) và nguồn nitrogen từ ri đường (3 %) sau 96 giờ lên men ở 35 °C và pH 4,5 (Mehboob *et al.*, 2011). Hammel *et al.* (2002) đã chỉ ra sự có mặt của glucose (1 %) có trong môi trường lên men sẽ làm tăng hoạt độ enzyme LiP lên đáng kể sau 7 ngày nuôi cấy.

Khả năng sinh enzyme LiP trên một số chủng nấm thối trắng cũng đã được nghiên cứu, hoạt độ enzyme cao nhất được ghi nhận là 22 U/mL từ chủng LPS, 19 U/mL từ chủng LPS2 và 13 U/mL từ chủng LPS3 (Vendruscolo *et al.*, 2008). Trong một nghiên cứu khác, ba chủng nấm *Pleurotus flabellatus*, *Poria placenta* và *Coriolus versicolor* được lên men trên môi trường lỏng bổ sung cơ chất rom, hoạt tính LiP thu được tương ứng là 45,7; 35,7 và 67,5 U/mL (Sridhar *et al.*, 2014).

Như vậy, so sánh với kết quả từ một số nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy, chủng *Lentinus* sp. MPN 12 có khả năng sinh enzyme LiP cao (108,8 U/mL) trên môi trường nuôi cấy lỏng với cơ chất là rom. Nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP từ chủng nấm này, nghiên cứu định danh chủng nấm đến loài và các điều kiện nuôi cấy thích hợp (nồng độ chất cảm ứng, nguồn carbon, nitrogen, nhiệt độ và pH) đã được thực hiện.

Định danh nấm chủng MPN12 bằng phương pháp sinh học phân tử

Kết quả kiểm tra DNA tổng số của chủng ký hiệu MPN12 trên gel agarose 1 % cho thấy giêng chỉ xuất hiện một băng duy nhất, đậm, sắc nét, thể hiện DNA tách chiết được có độ tinh sạch cao. Cặp mồi ITS1/ITS4 đã nhân bản thành công đoạn gen có kích thước khoảng 700 bp từ chủng nấm.

Kết quả giải trình tự gen nhân (ITS) của chủng nấm MPN12 đã xác định trình tự vùng gen nhân (ITS-rDNA) cho ảnh điện di đồ với các đỉnh huỳnh quang rõ nét, cường độ mạnh và rõ ràng. Sau khi loại bỏ trình tự môi và các vùng tín hiệu nhiễu, chúng tôi đã thu được trình tự nucleotide và kiểm tra độ tương đồng của trình tự trên Ngân hàng gen. Kết quả cho thấy, trình tự được kiểm tra tính tương đồng tương đồng cao 100% với loài *Lentinus squarrosulus* số đăng ký GU001951. Các trình tự tương đồng với chủng nấm MPN12 có trong Ngân hàng gen được thu thập và so sánh đối chiếu căn chỉnh để thực hiện phân tích phả hệ.

Vị trí phân loại của chủng nấm MPN12

Chín chuỗi nucleotide của vùng gen ITS của các loài thuộc chi *Lentinus* từ Ngân hàng gen được

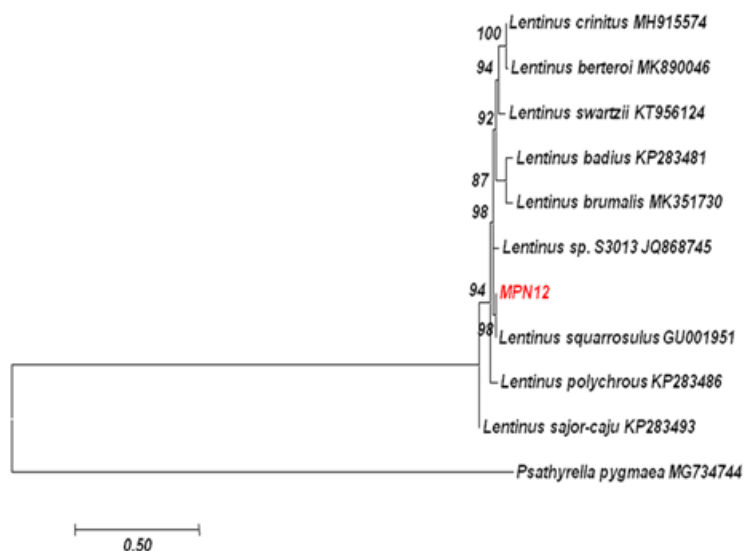
sắp xếp so sánh với chuỗi ITS của chủng nấm MPN12 và một chuỗi của loài *Psathyrella pygmaea* (MG734744) được sử dụng làm chuỗi ngoại hợp (outgroup) để phân tích phả hệ xác định vị trí phân loại. Sơ đồ mối quan hệ phả hệ của một số loài thuộc chi *Lentinus* xây dựng theo phương pháp ML được thể hiện trên hình 1. Chủng nấm MPN12 và loài *Lentinus squarrosulus* tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (100%) và có quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap 100%.

Từ kết quả phân loại bằng phương pháp sinh học phân tử và phân tích hình thái bào tử có thể kết luận mẫu nấm phân lập ký hiệu MPN12 có chung nguồn gốc với loài *Lentinus squarrosulus* thuộc họ Polyporaceae.

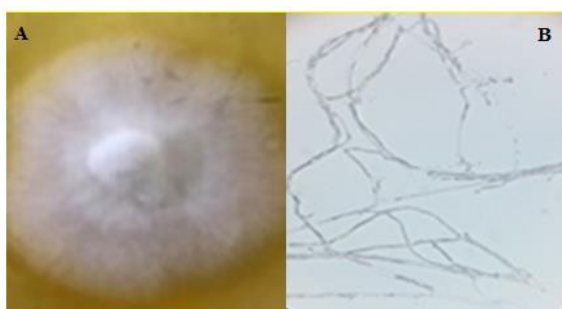
Bảng 1. Hoạt tính enzyme LiP của chủng nấm nghiên cứu.

TT	Tên chủng/Ký hiệu	Lignin peroxidase*** (U/mL)	TT	Tên chủng/Ký hiệu	Lignin peroxidase*** (U/mL)
1	<i>Deconica coprophila</i> CPG1*	0	21	<i>Tyromyces</i> sp. CPG25*	0
2	<i>Mycena</i> sp. CPG2*	0	22	<i>Mycenasp.</i> CPG26*	0
3	<i>Umbelopsis isabellina</i> CPG3**	0	23	<i>Schizophyllum commune</i> CPG27**	67,9 ± 0,8
4	<i>Psathyrella pygmaea</i> CPG4**	0	24	<i>Hexagonia</i> sp. CPG28*	0
5	<i>Xylaria allantoidea</i> CPG5**	16,9 ± 0,7	25	<i>Ganoderma</i> sp. CPG29*	0
6	<i>Pleurotus pulmonarius</i> CPG6**	102,6 ± 0,5	26	<i>Campanella</i> sp. CPG30*	37,0 ± 0,3
7	<i>Bisporella</i> sp. CPG7*	0	27	<i>Tyromyces lacteus</i> MPL1**	0
8	<i>Nigrospora oryzae</i> CPG8**	24,3 ± 0,3	28	<i>Ganoderma</i> sp. MPL2*	0
9	<i>Flammulina</i> sp. CPG9*	0	29	<i>Xylaria polymorpha</i> MPL3**	22,1 ± 0,5
10	<i>Auricularia</i> sp. CPG11*	0	30	<i>Hericium erinaceus</i> MPL4**	0
11	<i>Ganoderma</i> sp. CPG12*	0	31	<i>Lentinus squarrosulus</i> MPL5**	103,2 ± 0,2
12	<i>Nemania bipapillata</i> CPG13**	17,8 ± 0,5	32	<i>Tyromyces</i> sp. MPL6*	0
13	<i>Xylaria xanthinovelutina</i> CPG15**	13,8 ± 0,4	33	<i>Trametes</i> sp. MPL7*	0
14	<i>Trametes</i> sp. CPG16*	0	34	<i>Agrocybe chaxingu</i> MPL8**	26,7 ± 0,4
15	<i>Lecanicillium fungicola</i> CPG17**	0	35	<i>Lentinus swartzii</i> MPL9**	89,3 ± 0,8
16	<i>Clitopilus prunulus</i> CPG19**	26,0 ± 0,8	36	<i>Marasmius</i> sp. MPL10*	0
17	<i>Trametes</i> sp. CPG21*	0	37	<i>Xylaria</i> sp. MPL11*	15,8 ± 0,9
18	<i>Coprinus</i> sp. CPG22*	0	38	<i>Lentinus</i> sp. MPN12*	108,8 ± 0,7
19	<i>Fomitopsis feei</i> CPG23**	0	39	<i>Coprinellus aureoconulatus</i> MPG14**	0
20	<i>Ganoderma</i> sp. CPG24*	0			

Ghi chú: * Nấm được định danh bằng phương pháp so sánh hình thái giải phẫu. ** Nấm được định tên bằng phương pháp sinh học phân tử. *** Hoạt tính LiP được xác định bằng phương pháp quang phổ (λ=510nm) qua khả năng oxy hóa cơ chất 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP).



Hình 1. Mối quan hệ họ hàng của chủng nấm MPN12 với các loài/thứ trong cùng chi lấy trên GenBank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML). Các số trên các nhánh tượng trưng cho sự hỗ trợ bootstrap. *Psathyrella pygmaea* (GenBank: MG734744) được xem như loài ngoài nhóm (outgroup).



Hình 2. Chủng nấm phân lập *Lentinus* sp [ký hiệu MPN12; (A)] phát triển trên môi trường thạch và hình thái bào tử [độ phóng đại x100; (B)].

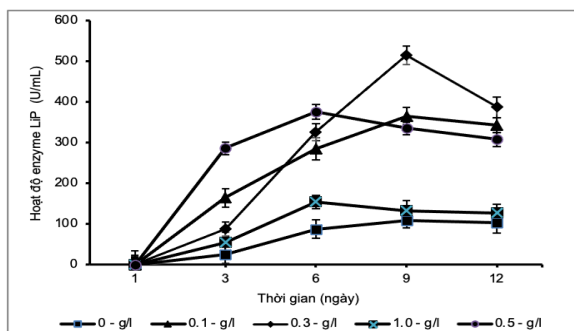
Điều kiện lên men thích hợp sinh tổng hợp enzyme LiP của nấm

Chủng nấm *L. squarrosulus* MPN 12 đã được sàng lọc hoạt tính enzyme LiP (108,8 U/mL) trên môi trường cơ chất rom. Nhằm tăng hiệu suất sinh tổng hợp và tinh sạch enzyme LiP của chủng nấm, cơ chất cảm ứng veratryl alcohol được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ khác nhau để đánh giá hiệu quả sinh tổng hợp enzyme LiP.

Ảnh hưởng nồng độ veratryl alcohol (Va)

Veratryl alcohol (3,4-dimethoxybenzyl alcohol) là sản phẩm thứ cấp của quá trình chuyển hóa do nấm sinh ra. Sự có mặt của Va ở nồng độ thích hợp trong môi trường lên men sẽ kích thích nấm sinh

tổng hợp enzyme LiP (Breen *et al.*, 1999). Trong nghiên cứu này, veratryl alcohol được bổ sung vào môi trường với các nồng độ 0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1,0 g/L để xác định mức độ ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp enzyme LiP của nấm *L. squarrosulus* MPN 12. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở ngày lên men thứ 3 trên môi trường bổ sung Va, hoạt độ LiP tăng đáng kể so với mẫu đối chứng (0 g/L) và có chiều hướng tăng dần theo thời gian. Ngày thứ 6 hoạt độ enzyme đo được ở mẫu bổ sung Va tại nồng độ 0,5 và 1,0 g/L đạt giá trị cao nhất, tương ứng 376 U/mL và 154 U/mL và có xu thế giảm ở ngày thứ 9 và 12 (308 U/mL và 127 U/mL). Điều này có thể giải thích khi môi trường lên men bổ sung Va ở nồng độ cao (> 0,3 g/L) dẫn đến enzyme LiP bị ức chế bởi chính sản phẩm chuyển hóa, do Va hoạt động như một chất trung gian trong phản ứng phân hủy lignin thông qua sự hình thành gốc cation và chính gốc cation này tấn công trở lại cấu trúc lignin (Faison, Kirk, 1985). Hơn nữa, khi Va vượt quá nồng độ cần thiết thì gây độc với nấm làm hoạt tính Lip bị giảm (Arora, Gill, 2001). Ngày thứ 9 hoạt độ enzyme thu được cao nhất tại nồng độ 0,1 và 0,3 g/L tương ứng 365 U/mL và 515 U/mL và bắt đầu giảm sau 12 ngày lên men ở cả hai nồng độ trên. Trong khi đó, mẫu đối chứng hoạt độ LiP cao nhất đạt 109 U/mL và giảm dần ở những ngày tiếp theo (> 9 ngày). Như vậy có thể thấy, ở hầu hết các thí nghiệm bổ sung Va với nồng độ khác nhau thì hoạt độ enzyme tăng cao rõ rệt, gấp từ 1,2 (Va: 1,0 g/L) đến gần 5 lần (Va: 0,3 g/L) so với mẫu đối chứng ở ngày lên men thứ 9.



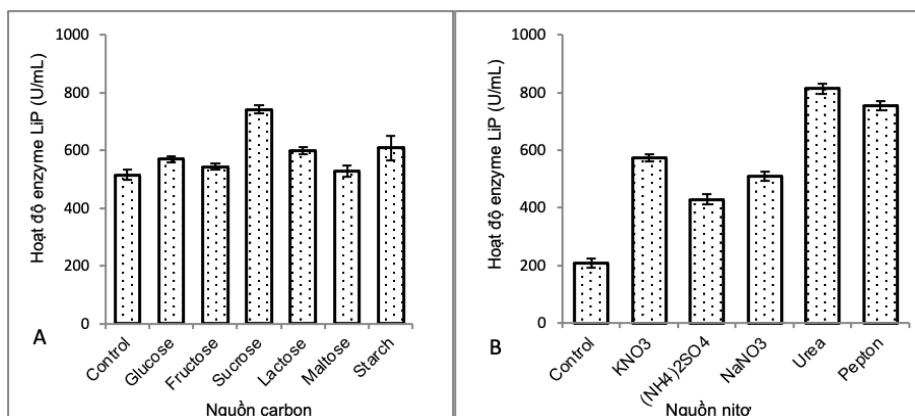
Hình 3. Ảnh hưởng nồng độ veratryl alcohol tới khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP bởi nấm *L. squarrosulus* MPN 12 ở 30°C trên môi trường lỏng.

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitrogen

Chủng *L. squarrosulus* MPN 12 được nuôi cấy trên môi trường bổ sung nguồn carbon và nitrogen sau 9 ngày lên men ở 30 °C, pH 5,5. Kết quả cho thấy, nấm sinh tổng hợp enzyme LiP cao hơn so với đối chứng trên các môi trường với nguồn carbon và nitrogen. Hoạt độ enzyme cao nhất đạt 742 U/mL trong môi trường bổ sung sucrose và thấp nhất đạt 528 U/mL trên môi trường bổ sung maltose (528 U/mL), hoạt độ LiP cao gấp 1,0 đến 1,4 lần so với mẫu đối

chứng, các mẫu còn lại hoạt độ LiP cao hơn không đáng kể so với đối chứng (Hình 4A). Khả năng sinh enzyme LiP bị ảnh hưởng đáng kể bởi nguồn nitrogen khác nhau. Kết quả hình 4B nhận thấy, trong các môi trường bổ sung nguồn nitrogen hoạt độ enzyme đều cao hơn từ 2 đến hơn 3 lần so với đối chứng. Nguồn nitrogen từ urea nấm sinh tổng hợp enzyme cao nhất đạt 814 U/mL và thấp nhất từ amonium sulphate đạt 429 U/mL sau 9 ngày lên men.

Theo Thiagarajan *et al.* (2008), các chủng nấm thuộc chi *Coprinus* sử dụng nguồn carbon từ saccharide và methyloxoyl cellulose không kích thích sinh tổng hợp enzyme LiP khi sử dụng nguồn carbon từ glucose hoạt tính LiP tăng chậm, chỉ đạt 10–14 U/mL bởi nấm *Coprinus* sp. UAMH 10067 và 20–28 U/mL bởi nấm *C. cinnereus* UAMH 4103. Tuy nhiên, nguồn carbon sucrose (0,5 %) thu nhận hoạt tính cao nhất đạt 120 U/mL. Trong một nghiên cứu khác của Stajic *et al.* (2006), trong số các nguồn nitrogen khác nhau từ các hợp chất vô cơ và hữu cơ hoạt độ enzyme LiP cao nhất thu được từ môi trường bổ sung nguồn carbon pepton (0,5 %) đạt 473 U/mL sau 13 ngày lên men đối với chủng *P. eryngii* 616. Như vậy, nguồn carbon từ sucrose và nitrogen từ urea làm tăng khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP đối với chủng *L. squarrosulus* MPN 12.



Hình 4. Ảnh hưởng nguồn carbon (A) và nitrogen (B) tới khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP bởi nấm *L. squarrosulus* MPN 12.

Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH

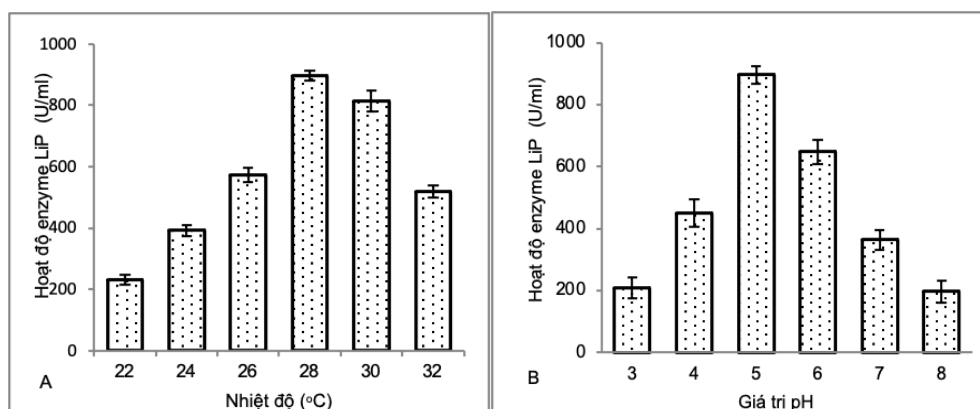
Nấm *L. squarrosulus* MPN 12 được lên men trên môi trường lỏng bổ sung chất cảm ứng Va (0,3 g/L), nguồn carbon từ sucrose (10 g/L), nguồn nitrogen từ urea (5 g/L), pH 5,0 với thời gian lên men 9 ngày từ 22 đến 32 °C. Nấm sinh enzyme LiP cao nhất ở 28 °C (896,4 U/mL) và thấp nhất ở 22 °C (231 U/mL). Khi nhiệt độ tăng lên 28 °C thì khả năng sinh enzyme của nấm cũng tăng. Khi nhiệt độ tăng lên trên 28 °C

nấm phát triển kém hơn nên hoạt độ enzyme giảm rõ rệt chỉ đạt 518 U/mL (32 °C). Kết quả trên khá tương đồng với nghiên cứu của Padma đối với nấm *G. lucidum* hoạt độ LiP thu được cao nhất ở 27 °C trên môi trường lên men lỏng sử dụng nguồn carbon từ lá cây thông (Padma *et al.*, 2013). Mặt khác, nấm *T. versicolor* sinh enzyme LiP cao nhất ở 30 °C trên môi trường bổ sung cơ chất rom (Iqbal *et al.*, 2012).

Chủng *L. squarrosulus* MPN 12 có khả năng

phát triển và sinh tổng hợp enzyme LiP trên môi trường có pH từ 3,0 đến 8,0. Tuy nhiên, khả năng sinh enzyme LiP giảm khi pH trong môi trường axit ($\text{pH} \leq 4$) hay trung tính đến kiềm ($\text{pH} \geq 7$). Hoạt độ LiP cao nhất đạt 896 U/mL tại pH 5 và thấp nhất 197U/mL tại pH 8 sau 9 ngày lên men. Mỗi loài nấm có phạm vi pH thích hợp để phát triển và sinh tổng hợp enzyme. LiP từ nấm *S.*

commune NI-07 trong môi trường lên men lỏng có pH tối ưu từ 4,43 đến 4,46 và khi pH tăng thì hoạt độ enzyme giảm (Asgher *et al.*, 2016). Tuy nhiên, nấm *P. ostreatus* sinh enzyme LiP tăng với pH từ 4 đến 7 và giảm khi pH nằm ngoài khoảng trên. Như vậy, chủng nấm *L. squarrosulus* MPN 12 tăng khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP khi lên men ở 28 °C và pH 5,0.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và pH (B) tới khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP bởi nấm *L. Squarrosulus* MPN 12.

KẾT LUẬN

Từ 39 chủng nấm phân lập ở các vùng môi sinh khác nhau, qua sàng lọc hoạt tính enzyme LiP chúng tôi đã chọn được chủng nấm ký hiệu MPN 12 biểu hiện hoạt tính enzyme LiP cao nhất (515 U/mL) và được định danh là *Lentinus squarrosulus* MPN 12. Sau 9 ngày lên men trên môi trường lỏng bổ sung chất cảm ứng veratryl alcohol (0,3 g/L) nguồn carbon từ sucrose (10 g/L), nguồn nitrogen từ urea (5 g/L) ở 28 °C, pH 5,0 trong điều kiện khuấy lắc liên tục 200 vòng/phút, hoạt tính enzyme LiP đạt 896 U/mL. Chủng nấm trên có tiềm năng cao trong việc thu nhận enzyme LiP để chuyển hóa các phụ phẩm công-nông nghiệp giàu lignocellulose.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam cho đề tài Hỗ trợ sau tiến sĩ (Mã số: GUST.STS.ĐT 2020-HH02) và Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) cho đề tài KHCN (Mã số: FWO.104.2017.03).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Asgher M, Abdul W, Muhammad B, Muhammad N (2016) Lignocellulose degradation and production of lignin

modifying enzymes by *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid-state fermentation. *Biocatal Agric Biotechnol* 6: 195–201.

Arora DS, Gill PK (2001) Effect of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresour Technol* 77: 89–91.

Breen A, Singleton FL (1999) Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr Opin Biotechnol* 10: 252–258.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.

Faison BD, Kirk TK (1985) Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 49: 299–304.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95–98.

Hammel KE, Kapich AN, Jensen KA (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb Technol* 30: 445–53.

Iqbal HMN, Kamal S (2012) Economical bioconversion of lignocellulosic materials to value-added products. *J Biotechnol Biomater* 2: 5–6.

Kirk TK (1990) Comparison of lignin peroxidase horseradish peroxidase and laccase in the oxydation of methoxybenzenes. *J Biochem* 268: 475–480.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

- across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549.
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wasilewska M, Rogalski J (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet Biol* 27: 175–185.
- Mehboob N, Asad MJ, Imran M, Gulfraz M, Asghar M (2011) Production of lignin peroxidase by *Ganoderma leucidum* using solid state fermentation. *Afr J Biotechnol* 10(48): 9880–9887.
- Nicholas KR, Nicholas KB, Nicholas K, Nicholas HG, Nicholas HB, Deerfield DW, Nicholas HBJ, Nicholas HJ, Nicholas A, Nicholas H, Gauch H (1997) *GeneDoc 2.7: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>).
- Palonen H (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *VTT Biotechnol* 11–39.
- Padma, Nambisan, Sudha, Hariharan (2013) Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf. *Biores* 8(1): 250–271.
- Sridhar M, Bhatta R, Dhali A, Vidya PH, Vandana T, Senani S (2014) *In vitro* evaluation of the effect of exogenous lignolytic enzymes on the nutritive value of *Eleusine coracana* (ragi straw). *Adv Appl Res* 6(1): 45–52.
- Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP (2006) Effect different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidase production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb Technol* 38: 65–73.
- Sahadevan LDM, Misra SC, Thankamani V (2016) Characterization of lignin-degrading enzymes (LDEs) from a dimorphic novel fungus and identification of products of enzymatic breakdown of lignin. *Biotech* 6(1): 56.
- Thiyagarajan A, Saravanakumar K, Kaviyaran V (2008) Optimization of extracellular peroxydase production from *Coprinus* sp. *Indian J Sci Technol* 1(7): 124–129.
- Tien M, Kirk TK (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2280–2284.
- Vendruscolo F, Albuquerque PCM, Streit F, Esposito E, Ninow JL (2008) Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* 28: 1–12.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor F (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA, 315–322.

INVESTIGATION OF LIGNIN PEROXIDASE (LiP) PRODUCTION FROM FUNGI GROWN ON LIQUID CULTURE MEDIUM

Vũ Đình Giáp^{1,2}, Dang Thu Quynh^{1,3}, Do Huu Nghi^{1,3}

¹Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

²HaUI Institute of Technology, Hanoi University of Industry (HaUI)

³Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Fungi are known to be capable of biosynthesizing various enzymes such as extracellular hydrolytic enzymes and oxidizing to effectively attack lignocellulose structures in the plant cell wall. Lignin peroxidase (LiP) is an extracellular enzyme biosynthesized in a variety of fungi and first isolated in 1987 from *P. chrysosporium*. The LiP enzyme is capable of oxidizing compounds with high redox potential (aromatic ring polymers) in the presence of H₂O₂ resulting in electron oxidation of various compounds including phenols, aromatic amines. Therefore, LiP is an important component of the extracellular enzyme system for lignocellulose degradation. Through polymerization, phenolic compounds reduced reactivity and solubility to be precipitated, thereby reducing toxicity. Therefore, LiP is applied in wastewater cleaning in wastewater containing high phenol content and halogenated phenol toxins, that are the hydroxyl phenolic compounds. In this study, 39 fungal strains isolated from two ecological regions (Cúc Phương National Park in Ninh Binh and Muong Phang in Dien Bien provinces) were screened for LiP enzyme production. In which, 14 strains grew on a straw substrate medium exhibiting LiP activity with the level ranging from 13.8 to 108.8 U/mL. The LiP of *Lentinus squarrosulus* MPN 12 identified by molecular analysis exhibited the highest activity as 108 U/mL on basic culture medium and 896 U/mL in optimal culture medium, that was basic medium supplemented with an inducer veratryl alcohol (0.3 g/L), sucrose (10 g/L), urea (5 g/L) for 9 days fermentation at 28 °C, pH 5.0 and 200 rpm. This strain has a high potential for the production of LiP enzyme to convert lignocellulose material.

Keywords: Hemeprotein, lignin, lignin peroxidase, lignocellulose degrading enzymes, polymer carbohydrate