

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA LIGNIN PEROXIDASE TỪ CHỦNG NẤM MỤC TRẮNG TL4

Trịnh Thị Thu Thủy^{1*}, Nguyễn Quốc Trung¹, Tống Văn Hải¹, Nguyễn Hoàng Anh²

¹*Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Khoa Công nghệ Thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: tthuy@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 29.12.2016

Ngày chấp nhận đăng: 12.11.2018

TÓM TẮT

Lignin là một thành phần của vách tế bào thực vật. Cho đến nay, việc phân hủy lignin trong xử lý các phụ phẩm nông nghiệp vẫn là một thách thức do cấu trúc phức tạp của thành phần này. Lignin peroxidase (LiP) thu nhận từ các chủng nấm mục trắng đã được xác định là enzyme oxy hóa có khả năng loại bỏ thành phần lignin hiệu quả. Trong nghiên cứu này enzyme, ngoại bào LiP từ chủng nấm mốc TL4 đã được thu nhận sau đó tiến hành kết tủa bằng muối trung tính $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và dung môi hữu cơ (ethanol 96%) để loại bỏ các thành phần của môi trường. Chế phẩm enzyme kỹ thuật sau khi kết tủa bằng ethanol được tiến hành xác định một số đặc tính cơ bản của enzyme này. Kết quả cho thấy LiP thu nhận từ chủng nấm mốc TL4 có nhiệt độ và pH tối ưu lần lượt là 30°C và 4.0. Enzyme này hoạt động tốt ở nhiệt độ 20-30°C trong 2 giờ (còn 94,17% và 89,10% ở 2 nhiệt độ tương ứng) và có hoạt tính ổn định ở pH 2,0-4,0 trong 3 giờ (còn 78,97% và 97,87% tương ứng). Như vậy, chủng nấm mục trắng TL4 có tiềm năng để khai thác enzyme LiP ứng dụng trong việc xử lý môi trường và tiền xử lý phụ phẩm nông nghiệp.

Từ khóa: Lignin peroxidase (LiP), nấm mục trắng TL4, đặc tính, độ bền nhiệt, độ bền pH.

Production and Characterization of Lignin Peroxidase from White Rot Fungal Strain TL4

ABSTRACT

Lignin is a component of plant cell wall. The degradation of lignin remains a challenge to date due to its stability. Lignin peroxidase (LiP) from white rot fungi was known as a highly effective oxidase enzyme for lignin degradation. In this study, extracellular LiP obtained from strain TL4 was precipitated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and ethanol 96% for obtaining technical enzyme and then characterized for optimal temperature and pH and thermal and pH stability. Results indicated that the optimal temperature and pH of LiP were 30°C and 4.0, respectively. This enzyme was stable between 20 and 30°C for 2 hours (relative activities remain 94.17% and 89.10%, respectively) and pH from 2.0 to 4.0 for 3 hours (relative activities remain 78.97% and 97.87%), respectively. The LiP from strain TL4 showed potential application in environmental treatment and pre-treatment of crop by-products.

Keywords: Lignin peroxidase (LiP), white rot fungus, characterization, thermal stability, pH stability.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sau cellulose, lignin là vật liệu hữu cơ phong phú thứ hai được thực vật tổng hợp và chiếm phần lớn hàm lượng chất vòng thơm trên trái đất. Lignin tạo độ cứng cho tế bào thực vật, giúp tránh khỏi các xâm nhiễm của vi sinh vật. Trong cấu trúc của gỗ, lignin là một polymer

sinh học dạng vòng bao gồm 62-65% carbon, 5-6% hydro, nhiều nhóm methoxyl ($-\text{OCH}_3$) và nhiều nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$) tự do. Do lignin có cấu trúc không gian ba chiều phức tạp, phân nhánh mạnh, không tan trong nước và không truyền quang nên việc phân hủy lignin rất khó. Việc phân hủy lignin bằng biện pháp vật lý, hóa lý, hóa học có nhiều nhược điểm như chi phí đắt

đỏ, không loại bỏ được cơ chất có hàm lượng lignin cao, ảnh hưởng tới môi trường sống. Vì vậy, hiện nay các nghiên cứu nghiêng về hướng sử dụng các biện pháp sinh học tự nhiên để phân hủy lignin nhằm khắc phục những nhược điểm trên.

Lignin peroxidase (EC 1.11.1.14) là một loại enzyme có khả năng oxy hóa các hợp chất lignin và các dẫn xuất của lignin. Lignin peroxidase có thể thu từ các nguồn khác nhau như nấm mốc, thực vật, vi khuẩn, côn trùng nhưng phổ biến nhất là nấm mục trắng (Hariharan and Nambisan, 2013; Gomes *et al.*, 2009). Hiện nay nhiều chủng nấm mục được phát hiện cho thấy có khả năng tổng hợp lignin peroxidase rất tốt như: *Phanerochaete chrysosporium* (Glumoff *et al.*, 1990; Chai, 2008), *Trametes versicolor* (Johansson & Nyman, 1993), *Phlebia radiate* (Lundell & Hatakka, 1994).

Ưu điểm vượt trội của LiP là khả năng oxy hóa cao và pH tối ưu thấp, do đó có thể nghiên cứu để đưa vào ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành khác nhau. Lignin peroxidase có thể ứng dụng trong công nghiệp tẩy trắng giấy, tẩy màu của thuốc nhuộm vải (Bholay *et al.*, 2012) và loại bỏ hợp chất phenol trong rượu. Lignin peroxidase còn được sử dụng trong xử lý nguồn nước thải bị ô nhiễm bằng việc loại bỏ các hợp chất phenol, ứng dụng trong xử lý phụ phẩm nông nghiệp như rơm, rạ, bã mía để tạo nguyên liệu cho các quá trình khác.

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về hệ enzyme phân hủy lignin trong đó có lignin peroxidase. Các nghiên cứu bao gồm từ phân lập, xác định đặc tính đến các nghiên cứu ứng dụng của các enzyme này (Elena *et al.*, 2014; Johson *et al.*, 1994; Lambertz *et al.*, 2016). Xu *et al.* (2005) đã phân lập được chủng nấm mốc *Trametes versicolor* BBE0970 có khả năng sinh tổng hợp hệ enzyme lignolytic và xử lý tốt nguồn sinh khối lignocellulose. Wang *et al.* (2009) đã tách dòng gen mã hóa lignin peroxidase từ *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 và biểu hiện trên nấm men *Pichia pastoris* X-33. Hiện nay, các nghiên cứu về hệ enzyme phân hủy lignin trong đó có lignin peroxidase vẫn tiếp tục được công bố.

Trong những năm gần đây, ở trong nước đã có một số nghiên cứu về enzyme phân hủy lignin bao gồm lignin peroxidase, laccase và mangan peroxidase đã được công bố. Các nghiên cứu đều tập trung vào các vi sinh vật (chủ yếu là nấm mốc) có khả năng sinh tổng hợp một hoặc một số enzyme thuộc hệ lignolytic và nghiên cứu ứng dụng của chúng trong việc xử lý các thành phần polyphenol trong các hợp chất khó phân hủy (Đặng Thị Cẩm Hà và cs., 2009) hoặc các nghiên cứu về các chủng nấm mốc bản địa để xử lý các hợp chất lignin từ nền đất thâm canh lúa tại địa phương (Võ Thị Ngọc Cẩm và cs., 2015); các nghiên cứu ứng dụng hệ enzyme phân hủy lignin để xử lý một số phụ phẩm nông nghiệp như rơm, rạ, bã mía, bã dong riềng (Trịnh Thị Thu Thủy và cs., 2015) hay nghiên cứu ứng dụng của lignin peroxidase và laccase trong xử lý bột giấy (Phí Quyết Tiến và cs., 2011). Do hệ enzyme phân hủy lignin có nhiều tiềm năng ứng dụng trong thực tiễn nên những nghiên cứu về hệ enzyme này vẫn tiếp tục được thực hiện.

Chủng nấm mốc TL4 là chủng được đánh giá có khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP. Để khai thác hiệu quả ứng dụng của enzyme LiP từ chủng nấm TL4 này, việc xác định các đặc tính cơ bản của LiP là cần thiết. Do đó, chúng tôi khảo sát việc thu nhận LiP ngoại bào từ chủng TL4 và xác định một số đặc tính của enzyme để làm tiền đề cho việc ứng dụng enzyme LiP xử lý phụ phẩm nông nghiệp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng nấm mục trắng TL4 phân lập từ gỗ mục được cung cấp bởi Bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ sinh học ứng dụng, Khoa Công nghệ Sinh học.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nuôi cấy nấm TL4 trên môi trường lỏng Basal

Môi trường Basal lỏng là môi trường tối ưu dùng để sinh tổng hợp các loại enzyme thuộc

nhóm lignolytic (nhóm enzyme phân hủy lignin) (Mikiashvili *et al.*, 2011). Chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp lignin peroxidase được tiến hành nuôi trên môi trường Basal lỏng pH 6 ở 28°C trong 5-7 ngày. Sau đó, toàn bộ dịch nuôi và sinh khối tế bào được thu nhận để dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Xác định hoạt tính lignin peroxidase

- Xác định hoạt độ lignin peroxidase

Phương pháp xác định hoạt độ LiP được tiến hành theo phương pháp tiêu chuẩn mô tả bởi Sigma với cơ chất đặc hiệu ABTS 9,1 mM. 0,06 ml dung dịch ABTS 9,1 mM được trộn với 0,1 ml dịch enzyme (mẫu đối chứng thay enzyme bằng nước cất) và 0,1 ml H₂O₂ 3% sau đó bổ sung 2,74 ml đệm kali phosphate 100 mM pH 5. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 10 phút và tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 405 nm (OD₄₀₅). Số đơn vị hoạt độ của LiP được tính theo công thức phía dưới.

Định nghĩa một đơn vị hoạt độ: Một đơn vị hoạt độ lignin peroxidase sẽ oxy hóa 1 μm ABTS (2,2' azino bis 3 ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) trong 1 phút ở điều kiện pH 5,0 và nhiệt độ 25°C.

- Công thức tính hoạt độ

$$U = \frac{\Delta A \times V \times df}{t \times 36,8 \times V_e}$$

Trong đó: U là hoạt độ enzyme (U/ml); t (phút) là số phút tiến hành thí nghiệm; 36,8 là hệ số thay đổi ở bước sóng A₄₀₅/phút trên 1 đơn vị hoạt độ của peroxidase ở pH 5, 25°C trong 3 ml hỗn hợp phản ứng; df là độ pha loãng; V_e là thể tích enzyme (ml); V là tổng thể tích phản ứng (ml); ΔA là giá trị OD ở bước sóng 405 nm của ống thí nghiệm so với ống đối chứng.

Hoạt độ riêng của enzyme xác định theo công thức:

$$U = \frac{E}{P}$$

Trong đó: U là hoạt độ riêng của enzyme (U/g protein); E là hoạt độ của enzyme (U/ml); P là hàm lượng protein trong dung dịch enzyme (g/ml).

2.2.3. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Lowry *et al.* (1951).

2.2.4. Kết tủa enzyme thu từ môi trường nuôi cấy

- Kết tủa bằng ethanol 96%

Tiến hành kết tủa 10 ml dịch enzyme LiP trong ethanol lạnh (4°C) ở các tỉ lệ khác nhau ứng với tỉ lệ ethanol 96% so với dịch chiết enzyme là 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1. Sau đó dung dịch được ly tâm lạnh ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 10 phút để thu tủa rồi hòa kết tủa trong 3 ml đệm CH₃COONa 50 mM pH 5. Hoạt độ enzyme thu được ở các tỉ lệ ethanol khác nhau sẽ được so sánh để xác định tỉ lệ dung môi/enzyme thích hợp.

- Kết tủa bằng muối trung tính

Tiến hành kết tủa 10 ml dịch enzyme thô với muối (NH₄)₂SO₄ bão hòa ở nồng độ bão hòa khác nhau (%): 50, 55, 60, 65, 70, 75. Ly tâm lạnh thu tủa với tốc độ 6.000 vòng/phút, trong 10 phút. Thu cặn tủa và hòa trong 10 ml dung dịch đệm CH₃COONa 50 mM, pH 5. Kết quả hoạt độ enzyme thu được ở các tỉ lệ muối (NH₄)₂SO₄ bão hòa khác nhau sẽ được so sánh để lựa chọn nồng độ muối bão hòa thích hợp để tủa thu enzyme.

Một số chỉ tiêu được sử dụng để xác định một số đặc tính của enzyme LiP2 gồm:

- Nhiệt độ tối ưu

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của enzyme được khảo sát bằng cách thay đổi nhiệt độ khi tiến hành phản ứng xác định hoạt độ enzyme như mô tả ở mục 2.2.2. Dải nhiệt độ khảo sát là 20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C. Nhiệt độ cho hoạt độ enzyme LiP cao nhất được xác định là nhiệt độ tối ưu.

- pH tối ưu

Để xác định pH phù hợp cho hoạt động xúc tác của LiP, một dải các dung dịch đệm có pH từ 2 đến 7 được chuẩn bị. Sau đó tiến hành phản ứng enzyme (như mục 2.2.2) với các dung dịch đệm là các pH tương ứng ở trên. pH tối ưu tương ứng với pH cho hoạt độ enzyme LiP cao nhất.

- Độ bền nhiệt

Enzyme LiP được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 20-70°C trong các khoảng thời gian khác nhau (30, 60, 90 và 120 phút). Sau đó dịch enzyme này được tiến hành xác định hoạt độ theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.2. Hoạt độ còn lại theo thời gian được quy đổi theo phần trăm so với thời điểm ban đầu để đánh giá độ bền đối với nhiệt độ của enzyme.

- Độ bền pH

Enzyme được chuẩn bị ủ ở các pH khác nhau (từ 2 đến 7) sau đó để trong khoảng thời gian 30, 60, 90, 120, 150, 180 phút và tiến hành xác định hoạt độ theo mô tả ở mục 2.2.2. Hoạt độ còn lại theo gian được quy đổi theo phần trăm so với thời điểm ban đầu để đánh giá độ bền pH của enzyme LiP.

2.3. Xử lý số liệu

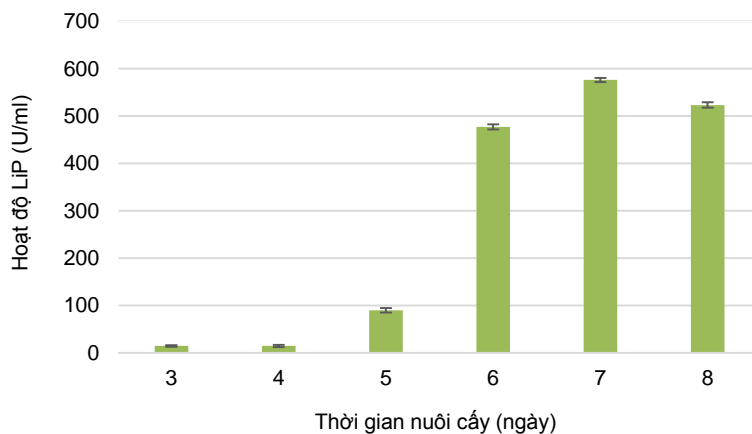
Các thí nghiệm được thực hiện 3 lần, lấy kết quả trung bình. Số liệu được xử lý bằng phân tích ANOVA trong Excel 2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

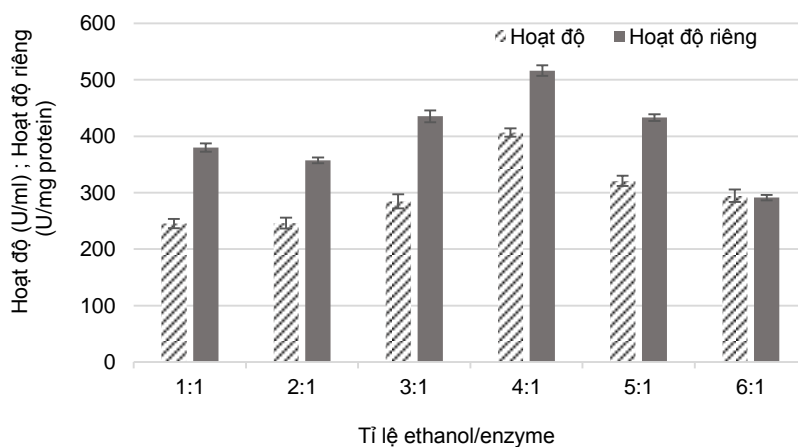
3.1. Khả năng sinh tổng hợp lignin peroxidase của TL4 trên môi trường Basal

Kết quả xác định hoạt độ lignin peroxidase do chủng TL4 tạo ra trong môi trường Basal được thể hiện ở hình 1.

Hình 1 cho thấy ở những ngày đầu của giai đoạn sinh trưởng (ngày 3-5) lượng LiP tạo ra không cao (hoạt độ tổng LiP tổng số/ml chỉ từ 12-85 U/ml). Đến ngày thứ 6 lượng enzyme LiP tạo ra tăng cao đạt gần 500 U/ml và cao nhất ở



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh tổng hợp LiP



Hình 2. Hoạt độ và hoạt độ riêng LiP khi tinh sạch bằng ethanol 96%

ngày thứ 7 lượng enzyme LiP trong môi trường đạt 576,17 U/ml sau đó giảm dần ở những ngày tiếp theo. Có thể giải thích là đến ngày thứ 7 khả năng sinh tổng hợp enzyme cao nhất sau đó chủng TL4 không sinh tổng hợp thêm nữa hoặc hoạt độ enzyme sẽ giảm dần theo thời gian, đồng thời lúc này chủng nấm mốc TL4 bước vào giai đoạn suy thoái do nguồn dinh dưỡng bị cạn kiệt nên hoạt độ enzyme sẽ giảm trong các ngày tiếp theo. Như vậy, chủng TL4 sinh tổng hợp enzyme tốt nhất sau 7 ngày nuôi cấy. Kết quả này được dùng để thu nhận enzyme phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Thu nhận và tinh sạch lignin peroxidase từ chủng nấm mốc TL4

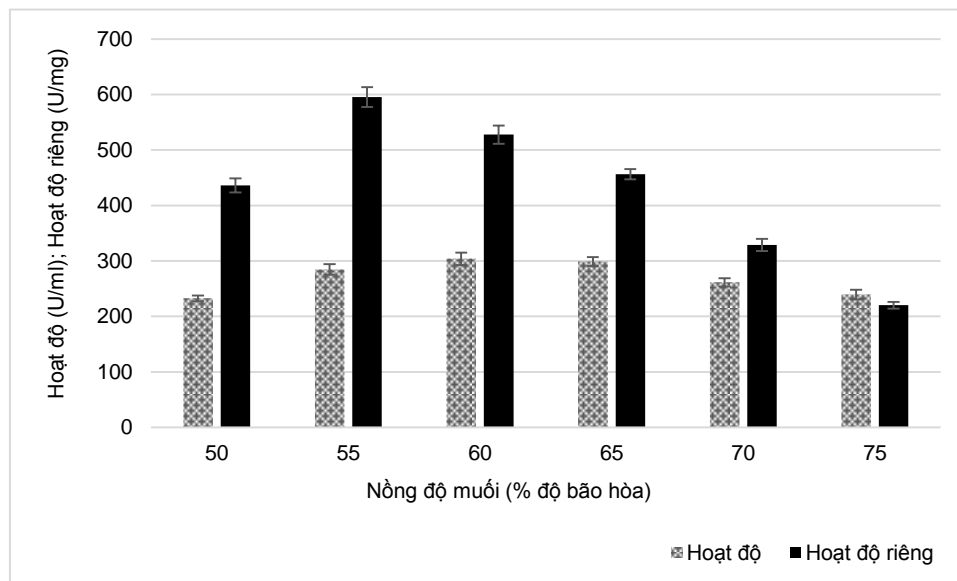
3.2.1. Tinh sạch lignin peroxidase bằng ethanol 96%

Kết quả hoạt độ và hoạt độ riêng LiP sau khi rửa bằng ethanol được thể hiện ở hình 2 cho thấy khi thay đổi tỉ lệ ethanol 96% thì hoạt độ LiP cũng thay đổi theo. Với tỉ lệ kết tủa 1:1 đầu tiên thu được hoạt độ là 237,67 U/ml, hoạt độ riêng đạt 382,15 U/mg protein, khi tăng dần lượng ethanol 96% thì hoạt độ enzyme cũng tăng theo, cụ thể ở tỉ lệ 4:1 thu được hoạt độ enzyme cao nhất là 406,43 U/ml, hoạt độ riêng đạt 516,28 U/mg protein. Ở tỉ lệ này, khả năng

kết tủa enzyme lignin peroxidase tốt. Các phân tử ethanol tách hết lớp phân tử nước bao quanh phân tử protein và làm tăng khả năng kết tủa của LiP. Khi tiếp tục tăng tỉ lệ ethanol lên thì hoạt độ và hoạt độ riêng của LiP giảm xuống. Điều này được giải thích rằng càng tăng lượng dung môi, hằng số điện môi trong hỗn hợp giảm quá mức gây biến tính không thuận nghịch làm phá hủy protein vì vậy hoạt độ enzyme giảm. Để thu nhận enzyme LiP bằng ethanol 96% thì tỉ lệ ethanol:enzyme tốt nhất là 4:1.

3.2.2. Tinh sạch lignin peroxidase bằng muối $(NH_4)_2SO_4$

Hình 3 cho thấy hoạt độ riêng của LiP thu được sau khi kết tủa bằng muối trung tính $(NH_4)_2SO_4$ thay đổi theo độ bão hòa của muối. Khi nồng độ muối bão hòa tăng từ 50% lên 55% thì hoạt độ riêng của enzyme thu được tăng từ 436,02 U/mg protein lên 595,28 U/mg protein. Khi nồng độ muối bão hòa tiếp tục tăng lên 65% thì hoạt độ riêng của LiP thu được giảm nhẹ xuống còn 456,26 U/mg protein. Tiếp tục tăng nồng độ bão hòa của muối thì hoạt độ riêng của enzyme giảm xuống còn 220,12 U/mg ở nồng độ 75%. Hoạt độ enzyme thu được sau khi kết tủa bằng muối trung tính $(NH_4)_2SO_4$ không có sự thay đổi nhiều ở các nồng độ bão hòa từ 50% đến 75%. Như vậy, có thể thấy rằng ở các nồng độ bão



Hình 3. Hoạt độ và hoạt độ riêng LiP khi tinh sạch bằng muối $(NH_4)_2SO_4$

hòa khác nhau của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mặc dù hoạt độ enzyme không thay đổi nhiều nhưng hoạt độ riêng có sự khác nhau rõ rệt. Điều này chứng tỏ các nồng độ muối khác nhau sẽ có tác dụng loại bỏ các protein tạp (không phải LiP) khác nhau. Khi hoạt độ riêng càng cao thể hiện độ tinh sạch của enzyme càng cao. Với kết quả thu được, có thể kết luận sử dụng nồng độ 55% độ bão hòa của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ phù hợp để thu nhận LiP.

3.3. Đặc tính của lignin peroxidase từ chủng TL4

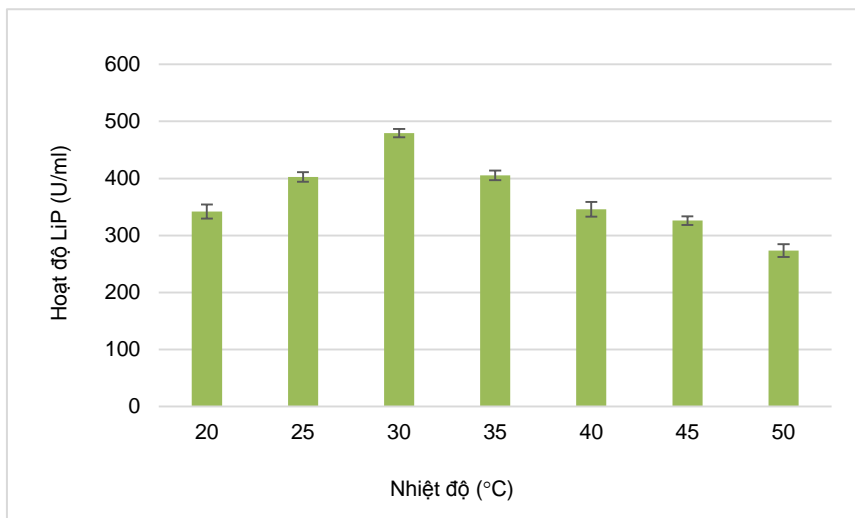
3.3.1. Nhiệt độ tối ưu

Kết quả ở hình 4 cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 20°C đến 30°C hoạt độ lignin peroxidase cũng

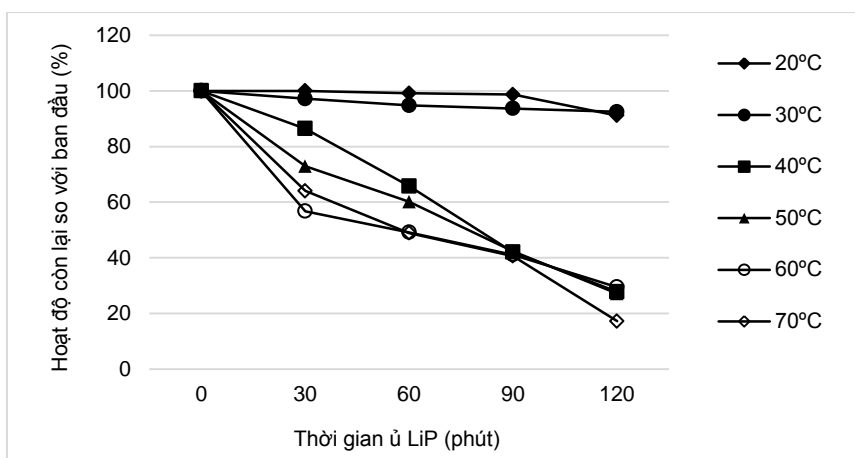
tăng dần từ 172 U/ml đến 239 U/ml. Ở mức nhiệt 40°C đến 70°C hoạt độ enzyme bắt đầu giảm dần, cụ thể ở mức 40°C hoạt độ enzyme giảm xuống còn 165 U/ml và khi tăng lên nhiệt độ lên tới 70°C hoạt độ enzyme chỉ còn 98 U/ml. Như vậy, nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của lignin peroxidase từ chủng TL4 là 30°C. Mức nhiệt độ này thấp hơn so với chủng nấm *Phanerochaete chrysosporium* là 37°C (Tien & Kirk, 1984), và cao hơn mức nhiệt độ tối ưu của 2 chủng nấm *Phlebia radiata* và *Phlebia tremellosa* là 25°C (Hatakka *et al.*, 1991).

3.3.2. Độ bền nhiệt

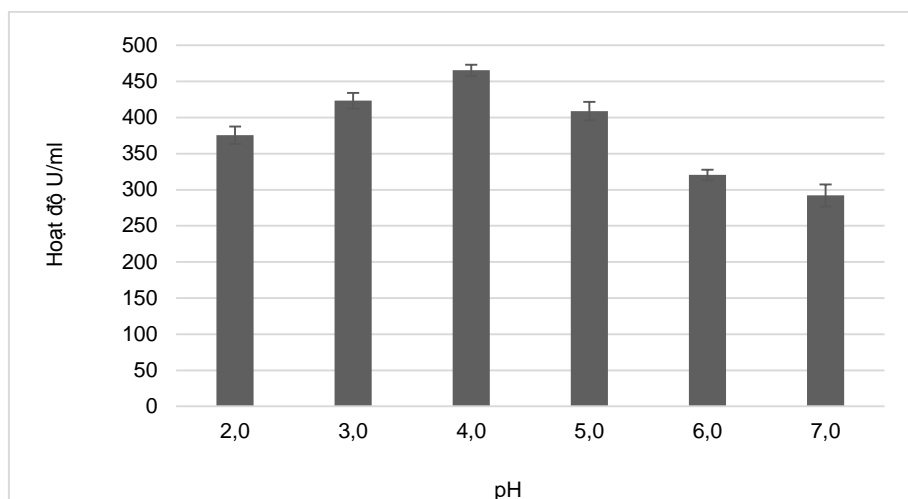
Hình 5 cho thấy ở các nhiệt độ thấp, trong khoảng 20-30°C enzyme lignin peroxidase khá



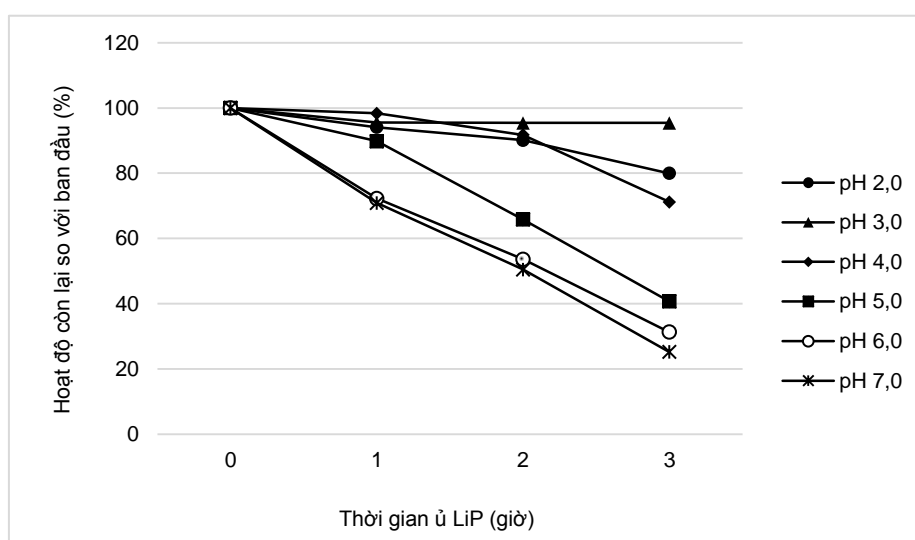
Hình 4. Nhiệt độ tối ưu của LiP



Hình 5. Độ bền nhiệt của LiP



Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ LiP



Hình 7. Độ bền pH của LiP

bên, hoạt độ enzyme này duy trì ở mức 90% sau 120 phút. Cụ thể ở 20°C hoạt độ LiP giảm từ 100% xuống còn 94,17% ứng với 210,16 U/ml sau 120 phút, còn ở 30°C hoạt độ LiP giảm từ 100% xuống 89,1% sau 120 phút. Ở các nhiệt độ cao hơn trong khoảng 40-70°C hoạt độ enzyme giảm mạnh sau 90 phút. Cụ thể, ở 70°C sau 120 phút hoạt độ enzyme chỉ còn 20,37% so với mốc 30 phút. Do đó có thể kết luận lignin peroxidase từ chủng TL4 bền nhiệt ở khoảng 20°C vì sau mốc thời gian 120 phút hoạt độ LiP giảm nhẹ còn ở mức 90%. Trong khi đó LiP của chủng nấm sợi *Aspergillus* spp. hoạt động ổn định trong khoảng nhiệt độ 10°C đến 50°C trong 2 giờ và ở

60°C hoạt độ của *Aspergillus* spp. chỉ còn 25% sau hai giờ. Lignin peroxidase từ *P. chrysosporium* hoạt động không ổn định ở nhiệt độ trên 35°C (Aitken & Irvine, 1989). Ở nhiệt độ 20°C sau 120 phút hoạt độ enzyme còn 89,1% so với hoạt độ ở 30 phút.

3.3.3. pH tối ưu

Kết quả khảo sát hoạt độ của LiP thu nhận từ chủng TL4 khi ủ ở các pH đệm khác nhau được thể hiện qua hình 6.

Enzyme LiP do chủng TL4 sinh ra có hoạt động xúc tác phản ứng mạnh trong khoảng pH axit từ 2,0 đến 5,0, cao nhất ở pH 4 (hoạt độ LiP

465,37 U/ml). Trong các khoảng pH từ 6,0 đến 7,0, hoạt độ enzyme giảm xuống còn 312,23 U/ml (pH 6,0) và 285,89 U/ml (pH 7,0). Như vậy, có thể kết luận rằng LiP từ chủng TL4 có pH tối ưu là pH 4,0 và đây là enzyme hoạt động tốt ở pH axit. Một số công bố về pH tối ưu của LiP cũng trong khoảng axit được biết đến là pH tối ưu của chủng *Aspergillus* sp. pH 2,5 (Fakoussa & Hofrichter, 1999); chủng *P. chrysosporium* BKM -F- 1767 với pH tối ưu là 3,0 (Tien *et al.*, 1986) và pH tối ưu của chủng *Cunninghamella elegans* là 6.0 (Kirkpatrick & Palmer, 1989) hay công bố của Sahadevan *et al.* (2016) về pH thích hợp cho LiP trong khoảng rộng từ 4 đến 11.

3.3.4. Độ bền pH

Hình 7 cho thấy, pH tối ưu của LiP thu từ chủng nấm mốc TL4 là 4,0; tuy nhiên enzyme này bền ở pH 2,0 và pH 3,0 hơn pH 4,0. Cụ thể là sau 3 giờ ở pH 2,0 hoạt độ của LiP vẫn còn 78,97% so ban đầu. Ở pH 3,0 hoạt độ enzyme sau 3 giờ còn 97,87%. Trong khi đó ở pH tối ưu sau 3 giờ hoạt tính còn lại 72,14%. Khi độ pH tăng, độ bền theo thời gian của enzyme giảm. Cụ thể ở pH 7 hoạt độ enzyme chỉ còn 27,96% so với ở thời điểm ban đầu. Như vậy, có thể kết luận lignin peroxidase hoạt động bền nhất ở pH 3,0. Trong khi đó LiP thu từ chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. bền ở khoảng pH 2,0-6,0 và hoạt động không ổn định ở pH 7,0 (Fakoussa & Hofrichter, 1999).

4. KẾT LUẬN

Chủng nấm mốc TL4 sinh tổng hợp enzym LiP cho hoạt độ cao nhất trong môi trường Basal sau 7 ngày nuôi cấy. Enzyme LiP có nhiệt độ và pH tối ưu lần lượt là 30°C và 4; LiP hoạt động ổn định ở 20-30°C trong 2 giờ, bền ở pH 2-4 (sau 3 giờ hoạt độ vẫn còn hơn 70%). Chủng nấm mục trắng TL4 có tiềm năng cao trong việc thu nhận enzyme LiP để xử lý môi trường hoặc tiền xử lý các phụ phẩm nông nghiệp có sinh khối lớn.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã cấp kinh phí để

tài (mã số T2016-12-48) để thực hiện một phần nội dung của nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bholay A.D., Borkhataria B.V., Jadhav P.U., Palekar K.S., Dhalkari M.V, P.M. Nalawade P.M. (2012). Bacterial Lignin Peroxidase: A Tool for Biobleaching and Biodegradation of Industrial Effluents. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 2(1): 58-64.
- Chai C.C. (2008). Enhanced production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. Master thesis, University Sains Malaysia.
- Đặng Thị Cẩm Hà (2009). Nghiên cứu và xác định enzyme lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) và laccase từ vi sinh vật phân hủy các hợp chất hữu cơ bền vững (POPs) và các hợp chất vòng thơm ô nhiễm khác. Đề tài cấp Viện KH&CNVN.
- Fakoussa, R.M. and Hofrichter M. (1999). Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 25-40.
- Gomes E., Aguiar A.P., Carvalho C.C., Bonfa M.R., da Silva R., Boscolo M. (2009). Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 31-39.
- Glumoff T., Lumoff., Harvey P.J., Leisoa S.A. (1990). Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, Molecular and kinetic characterization of isozymes. *Eur. J. Biochem*, 187: 515-520.
- Hariharan S. and Nambisan P. (2013). Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf. *Bio Resources*, 8(1): 250-270.
- https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p6782enz.pdf
- Johansson T., Nyman P.O. (1993). Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys*, 300: 49-56.
- Lesage L., Delattre M., Haon M., Thibault J.F. (1996). A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review

- combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Biotechnology*, 50(2): 107-113.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Mikiashvili N., Wasser S.P., Nevo E., Elisashvili V. (2011). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *Curr Opin Biotech*, 20: 348-357.
- Phí Quyết Tiến, Vũ Văn Lợi, Phan Thị Hồng Thảo, Phạm Thị Bích Hợp (2011). Tách dòng và biểu hiện lignin peroxidase H8 của chủng *Phanerochaete chrysosporium* trong *Pichia pastoris*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 9(2): 223-231.
- Sahadevan L.D.M., Misra S.C., Thankamani V. (2016). Characterization of lignin-degrading enzymes (LDEs) from a dimorphic novel fungus and identification of products of enzymatic breakdown of lignin. *Springerlink.com*, 3 *Biotech* 6: 5
- Tien M., Kirk T.K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl AcadSci USA*, 81: 2280-2284.
- Trịnh Thị Thu Thủy, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Ngọc Bằng, Phạm Thu Trang (2015). Phân lập tuyển chọn các chủng nấm mốc sinh tổng hợp enzyme laccase từ gỗ mục. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7: 173-178.
- Võ Thị Ngọc Cẩm, Đỗ Thị Xuân và cs. (2015). Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm bản địa phân hủy một số vật liệu hữu cơ từ nền đất thâm canh lúa tại xã Phong Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 36: 1-11.