

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH LIGNIN PEROXIDASE, MANGANESE PEROXIDASE, CELLULASE CỦA CHỦNG *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* KHI BỊ XỬ LÝ BẰNG SHOCK NHIỆT VÀ TIA UV

Lương Bảo Uyên*, Phạm Thị Ánh Hồng

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐH Quốc gia TP Hồ Chí Minh

MỞ ĐẦU

Sau cellulose, lignin là một polymer phong phú trong tự nhiên được thực vật tổng hợp, là nguồn chất thơm lớn trên trái đất. Lignin tạo độ cứng cho tế bào thực vật, giúp cho thực vật tránh được sự xâm nhiễm của vi sinh vật. Việc chuyển hóa nguồn chất hữu cơ này thành các sản phẩm có ích cũng như giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường hiện gặp nhiều khó khăn. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy *Phanerochaete chrysosporium* là loài vi sinh vật được biết và được nghiên cứu nhiều do khả năng phân hủy lignin bằng hệ enzyme của chúng. Với mục đích nâng cao chất lượng chủng vi sinh vật này nhằm thu được enzyme có hoạt tính cao sử dụng trong việc phân hủy chất hữu cơ trong tự nhiên, chúng tôi đã sử dụng 2 tác nhân UV và shock nhiệt để gây đột biến cho *Phanerochaete chrysosporium* và theo dõi sự thay đổi hoạt tính Lignin Peroxidase (LiP), Manganese Peroxidase (MnP) và cellulase theo thời gian chiếu tia UV và nhiệt độ gây shock nhiệt.

Từ khóa: *Lignin Peroxidase (LiP), Manganese Peroxidase (MnP), cellulase, shock nhiệt, tia UV*
NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu:

- Chủng nấm mục trắng *Phanerochaete chrysosporium* được Phòng sinh học phân tử trường Đại học Khoa học tự nhiên phân lập từ thân gỗ mục.

Phương pháp

- Phương pháp định hoạt tính LiP dựa vào sự oxi hóa xanh methylen, làm giảm sự hấp thụ ở bước sóng 664nm.

- Phương pháp định hoạt tính MnP dựa vào sự oxi hóa hợp chất Phenol red, gia tăng hấp thụ ở bước sóng 610nm.

- Phương pháp định hoạt tính Cellulase: sử dụng CMC (carboxymethyl cellulase) như cơ chất, ủ chiết dịch enzyme với CMC trong 1 giờ, pH 4.5. Hệ enzyme cellulase tác dụng lên CMC, phóng thích ra các phân tử đường glucose, dựa vào lượng đường khử ta xác định được hoạt tính enzyme

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính của LiP, MnP và Cellulase theo thời gian nuôi cấy

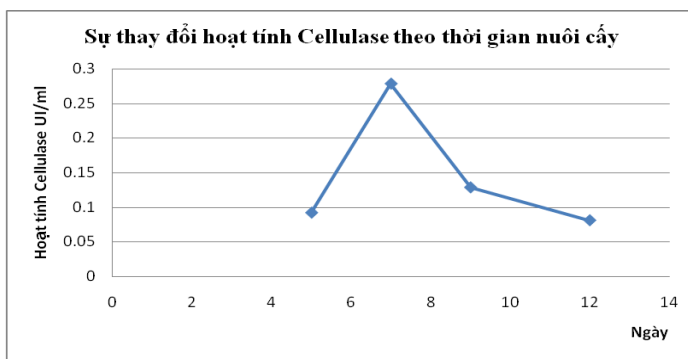
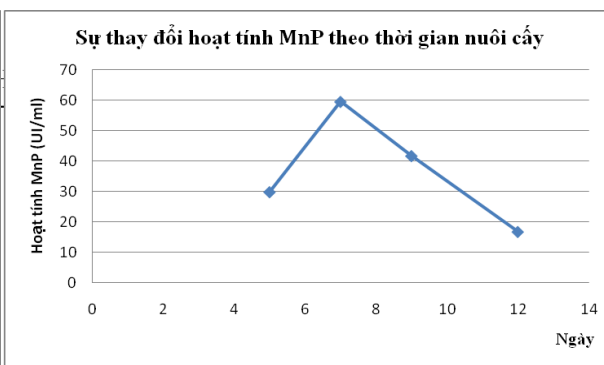
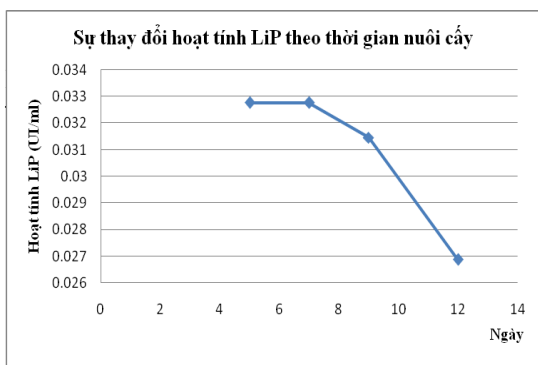
Đặc tính của *Phanerochaete chrysosporium* là một loài vi sinh vật hiếu khí nên chúng tôi nuôi cấy lắc trong môi trường PGB (lông). Trước khi thực hiện các thí nghiệm tạo đột biến cho *Phanerochaete chrysosporium* chúng tôi khảo sát thời gian nuôi cấy lắc để *Phanerochaete chrysosporium* phát triển tốt và cho hoạt tính 3 loại enzyme một cách tối ưu.

- Hoạt tính LiP thay đổi không nhiều trong 12 ngày nuôi cấy lắc. Tuy nhiên hoạt tính của LiP có xu hướng giảm dần khi thời gian nuôi cấy kéo dài. Vậy thu chế phẩm có hoạt tính LiP cao nhất là từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 7.

- Hoạt tính của MnP và Cellulase đạt được mức cao nhất là ngày thứ 7.

Vậy qua kết quả khảo sát hoạt tính của LiP, MnP và Cellulase theo thời gian nuôi cấy lắc *Phanerochaete chrysosporium*, chúng tôi nhận thấy chế phẩm thu được ở ngày thứ 7 sẽ cho hoạt tính của cả 3 loại enzyme ở mức cao nhất. Trong các thí nghiệm sau chúng tôi sử dụng chế phẩm thu được từ việc nuôi cấy lắc *Phanerochaete chrysosporium* trong môi trường PGB trong vòng 7 ngày.

* Tel: ; Email: lbuyen@hcmuns.edu.vn



Shock nhiệt

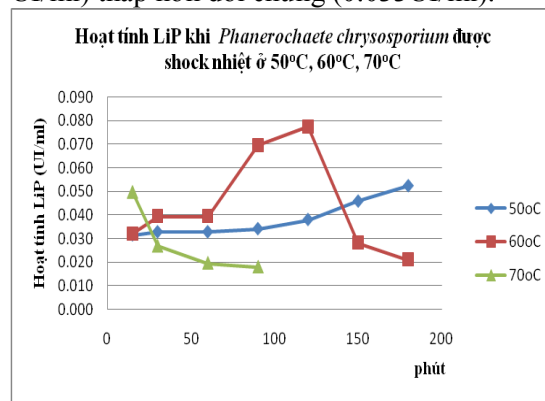
Nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của *Phanerochaete chrysosporium* là 28 – 40°C, nên việc thực hiện shock nhiệt chúng tôi bắt đầu ở 50°C. Và cũng qua khảo sát thì ở nhiệt độ 80°C hoạt tính của 3 loại enzyme đạt được sẽ thấp hơn cả nuôi cấy ở nhiệt độ bình thường ngay trong thời gian là 30 phút nên các thí nghiệm chúng tôi tiến hành trong khoảng nhiệt độ từ 50 – 70°C. Và để nghiên cứu sự thay đổi hoạt tính của 3 enzyme trên ở *Phanerochaete chrysosporium* khi bị shock nhiệt, chúng tôi sử dụng các tơ nấm trên môi trường thạch nghiêng (PGA) cho vào dung dịch agar 0.05% và thực hiện shock nhiệt ở 50°C, 60°C, và 70°C. Sau đó sử dụng các tơ nấm này tiếp tục tăng sinh trong môi trường PGB và nuôi cấy lắc để thu enzyme.

Hoạt tính của Lignin Peroxidase (LiP) khi tạo shock nhiệt cho *Phanerochaete chrysosporium* ở 50°C, 60°C, 70°C

Vì nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của *Phanerochaete chrysosporium* trong khoảng 28°C – 40°C nên ở nhiệt độ 50°C hoạt tính LiP của *Phanerochaete chrysosporium* chưa có sự bức phá cao. Hoạt tính LiP tăng dần nếu tăng thời gian shock nhiệt ở 50°C.

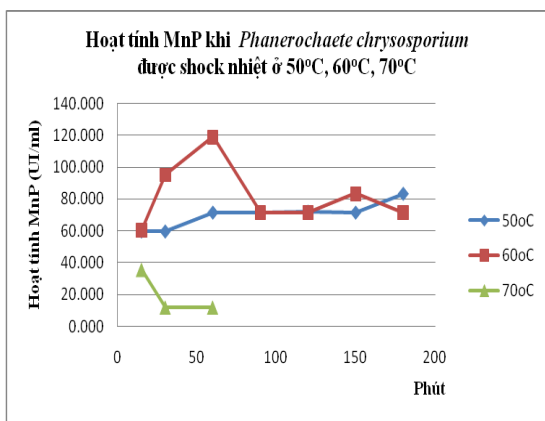
Ở 60°C hoạt tính LiP đạt cực đại ở 120 phút (0.077UI/ml) tăng 2.5 lần so với mẫu không

shock nhiệt (0.033UI/ml). Sau đó giảm dần và đến 180 phút thì hoạt tính đạt được (0.021 UI/ml) thấp hơn đối chứng (0.033UI/ml).



Ở 70°C hoạt tính LiP cao nhất ở thời gian 15 phút là 0.05UI/ml và giảm dần, khi tăng thời gian shock nhiệt đến 90 phút thì hoạt tính của LiP chỉ còn 0.018UI/ml thấp hơn hoạt tính ban đầu nếu không tạo shock nhiệt (0.033UI/ml).

Hoạt tính của Manganese Peroxidase (MnP) khi tạo shock nhiệt cho *Phanerochaete chrysosporium* ở 50°C, 60°C, 70°C



Tương tự như hoạt tính LiP, hoạt tính MnP thay đổi không nhiều khi tạo shock nhiệt ở 50°C.

Ở 60°C, hoạt tính MnP của *Phanerochaete chrysosporium* đạt cực đại ở **60 phút**, tăng gần gấp đôi so với ban đầu khi chưa tạo shock nhiệt (từ 60UI/ml tăng lên khoảng 120UI/ml). Ở nhiệt độ là 70°C thì hoạt tính đạt được rất thấp, 0.46UI/ml ở thời gian là 15 phút và 0.15UI/ml ở thời gian là 60 phút.

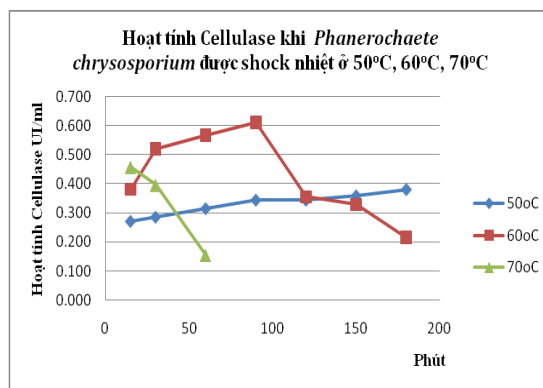
Vậy thời gian tốt nhất tạo shock nhiệt cho *Phanerochaete chrysosporium* để hoạt tính MnP đạt được cao nhất là 60 phút ở 60°C.

Hoạt tính của Cellulase khi tạo shock nhiệt cho *Phanerochaete chrysosporium* ở 50°C, 60°C, 70°C

Đường biểu diễn hoạt tính của Cellulase khi tạo shock nhiệt cho *Phanerochaete chrysosporium* ở 50°C, 60°C, 70°C cho thấy rằng ở nhiệt độ 60°C thời gian shock nhiệt là 90 phút đạt giá trị cao nhất là 0.6UI/ml, cao gấp hai lần so với mẫu không xử lý shock nhiệt (0.28UI/ml).

Shock nhiệt ở 50°C, hoạt tính của cellulase hầu như không có sự thay đổi. Ở 70°C thì hoạt tính của cellulase có chiều hướng đi xuống.

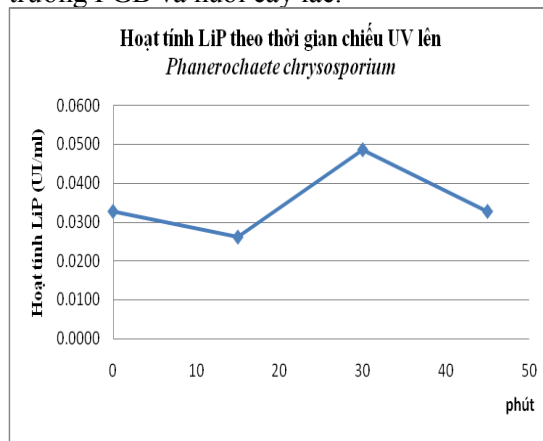
Vậy khi tạo shock nhiệt cho *Phanerochaete chrysosporium* ở nhiệt độ 60°C thì hoạt tính của cả 3 loại enzyme LiP, MnP và cellulase đều có thể tăng lên. Tuy nhiên tùy theo từng loại enzyme thì thời gian tạo shock nhiệt phải khác nhau để thu được hoạt tính cao nhất.



Tia UV

Tác dụng của tia tử ngoại là kiềm hãm sự sao mã, phiên mã của vi sinh vật, vì vậy nó là một tác nhân gây đột biến tạo giống mới. George M.Savage 1949 đã dùng năng lượng tia UV và tia X để làm tăng khả năng tạo kháng sinh của chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus*. Do đó trong đề tài này chúng tôi đã tiến hành khảo sát hoạt tính LiP, MnP và cellulase của *Phanerochaete chrysosporium* khi được xử lý bằng tia UV.

Để thực hiện khảo sát này chúng tôi cho một lượng vi sinh vật vào đĩa petri đã được khử trùng và đặt dưới nguồn sáng đèn UV (đèn UV trong tủ cấy vô trùng hiệu BASSII, bước sóng 253 – 257, công suất gần 1kw), tại vị trí cách đèn chiếu 45cm, chiếu trong những khoảng thời gian xác định (15, 30, 45 phút). Sau đó cho lượng vi sinh vật này vào môi trường PGB và nuôi cấy lắc.

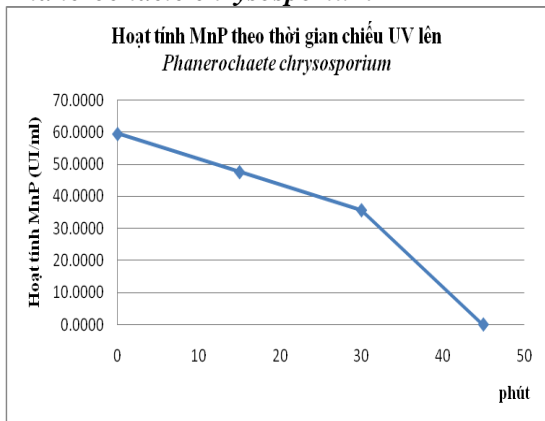


Hoạt tính LiP theo thời gian chiếu UV lên *Phanerochaete chrysosporium*

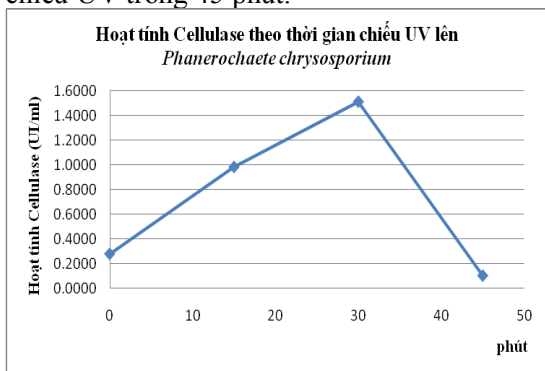
Qua đồ thị trên ta nhận thấy rằng tia UV có ảnh hưởng đến hoạt tính LiP của *Phanerochaete chrysosporium*.

Nếu *Phanerochaete chrysosporium* chịu tác động của tia UV trong 30 phút thì hoạt tính LiP đạt được cao nhất là 0.0485UI/ml so với hoạt tính ban đầu là 0.0328UI/ml.

Hoạt tính MnP theo thời gian chiếu UV lên *Phanerochaete chrysosporium*



Hoạt tính MnP có xu hướng giảm dần và bằng 0 khi *Phanerochaete chrysosporium* được chiếu UV trong 45 phút.



Hoạt tính Cellulase theo thời gian chiếu UV lên *Phanerochaete chrysosporium*

Theo đồ thị trên, trong 3 enzyme thì cellulase là enzyme chịu ảnh hưởng tốt từ việc chiếu UV. Hoạt tính tăng tốt nhất khi *Phanerochaete chrysosporium* được chiếu UV trong thời gian là 30 phút, hoạt tính đạt 1.51UI/ml, tăng khoảng 5 lần so với ban đầu là (0.28UI/ml). Nhưng nếu thời gian chiếu UV tăng lên đến 45 phút thì hoạt tính cellulase giảm xuống gần bằng 0 (0.1025UI/ml).

Vậy nếu *Phanerochaete chrysosporium* chịu tác động của tia UV thì chỉ có hoạt tính của LiP và cellulase tăng còn MnP sẽ giảm và bằng 0 nếu chiếu tia UV trong vòng 45 phút.

79

KẾT LUẬN

Từ kết quả của một số nghiên cứu ban đầu được trình bày ở trên chúng tôi đi đến các kết luận sau:

- Thu chế phẩm nuôi cấy lacc *Phanerochaete chrysosporium* trong môi trường PGB ở ngày thứ 7 sẽ thu được hoạt tính LiP, MnP và cellulase cao nhất.

- Khi xử lý *Phanerochaete chrysosporium* bằng shock nhiệt và tia UV thì nhận thấy:

- Shock nhiệt có tác dụng nâng cao hoạt tính của 3 enzyme LiP, MnP và cellulase

- ✓ Hoạt tính LiP tăng gấp đôi so với ban đầu (tăng từ 0.04UI/ml thành 0.077UI/ml) khi shock nhiệt ở 60°C trong thời gian 120 phút.

- ✓ Hoạt tính MnP tăng gấp đôi so với ban đầu (từ 60UI/ml tăng lên khoảng 120UI/ml) khi shock nhiệt ở 60°C trong thời gian 60 phút.

- ✓ Hoạt tính Cellulase cũng tăng gấp đôi (từ 0.28UI/ml tăng thành 0.6UI/ml) khi shock nhiệt ở 60°C trong thời gian 90 phút.

- Tia UV có tác dụng làm tăng hoạt tính của cellulase, không có tác động rõ rệt với hoạt tính LiP và làm giảm hoạt tính của MnP

- ✓ Hoạt tính cellulase đạt 1.51UI/ml (gấp 5 lần so với ban đầu là 0.28UI/ml) dưới tác động của tia UV trong 30 phút.

- ✓ Hoạt tính LiP đạt được 0.0485UI/ml (ban đầu là 0.0328UI/ml) dưới tác động của tia UV trong 30 phút.

- ✓ Hoạt tính MnP của *Phanerochaete chrysosporium* có xu hướng giảm dần và bằng 0 dưới tác động của tia UV trong 45 phút.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Hồ Xuân Các (1994), *Hóa học gỗ và công nghệ chế biến hóa học gỗ*, Đại học Nông Lâm, trang 14 – 15.
- [2]. Nguyễn Đức Lượng và các tác giả (2003), *Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2- Thí nghiệm vi sinh vật học*, Nxb Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- [3]. Lương Đức Phẩm – Hồ Xưởng (1998), *Vi sinh vật tổng hợp*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội,
- [4]. Denise Bello Magalhaes, Maria Eleonora Andrade de Carvalho, Elba Bon, Julio Silva

Araujo Neto, Selrgio Hellio Kling “*Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate*”, Biotechnology Techniques, Volume 10 No.4 (April 1996).

[5]. Julie A.Brown, Dan Li, Margaret Alic and Michael H.Gold “*Heat Shock Induction of Manganese Peroxidase Gene Transcription in Phanerochaete chrysosporium*”, Applied and Environmental Microbiology, Dec 1993, P.4295 – 4299.

[6]. K.E.Harnmel,1997: “*Fungal degradation of lignin*”, insitute for Microbial and Biochemical Technology,USA.

[7]. Katia M.G.Machado; dacio R.Matheus; Vera L.R.Bononi, “*Lyninolytic enzyme production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi*”, 2005

[8]. Michael H.Gold, Margaret Alic, “*Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*”, Microbiological Review, Sept.1993, P.605-622, Vol.57

SUMMARY

STUDYING ACTIVITY OF LIGNIN PEROXIDASE, MANGANESE PEROXIDASE AND CELLULASE OF *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* TREATED BY HEAT SHOCK AND UV RAY

Luong Bao Uyen², Pham Thi Anh Hong

University of Science – VNU. HCM

Heat shock and UV rays are 2 physical factors which can cause mutation at microorganism. It means that these factors can affect enzyme synthetics and transformations in *Phanerochaete chrysosporium*. Results from experiments figure out if heat shocking at 60⁰C will increase enzyme activity of LiP, MnP and cellulase. Activity of these 3 enzymes will be achieved at peak depend on duration of heat shocking. In the meanwhile if it is treated by UV rays on *Phanerochaete chrysosporium*, the enzyme's activity be decreased follows duration of treatment and inactivated when using UV rays for 45 minutes, LiP and cellulase activity increase under the impact of UV rays (in comparing with original status) while cellulase activity increase 5 times in compare with original status, LiP activity increase unremarkably under the treatment.

Key words: *Lignin Peroxidase (LiP), Manganese Peroxidase (MnP), cellulase, heat shock, UV ray*

² Tel: ; Email:lbuyen@hcmuns.edu.vn