

PHÂN LẬP, ĐÁNH GIÁ VÀ TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY ĐỒNG THỜI LIGNIN VÀ CELLULOSE

Nguyễn Ngô Yến Ngọc¹, Lương Bảo Uyên², Bùi Minh Trí^{1*}

¹Trường Đại học Nông lâm tp. Hồ Chí Minh, *bui minhtri@gmail.com

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT: Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tìm ra những chủng nấm có hoạt tính phân hủy lignin từ các nguồn phế thải nông nghiệp, sử dụng tối đa nguồn cellulose để sản xuất nhiên liệu sinh học. Các chủng nấm phân lập đã được khảo sát khả năng phân hủy lignin và cellulose dựa trên tốc độ lan tơ và đường kính vòng phân giải trên môi trường cơ chất lignin và CMC, sau đó, tiếp tục được tuyển chọn trên cơ sở xác định các hoạt tính enzyme bao gồm hoạt tính lignin peroxidase (LiP), Mangan peroxidase (MnP) và Cellulase. Nghiên cứu này cũng tiến hành khảo sát nhằm xác định loại môi trường và thời gian nuôi cấy cho phép tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp các enzyme phân giải lignin và cellulose. Nghiên cứu này đã xác định được 4 chủng: #5; #14; P201 và đặc biệt chủng #10 có hoạt tính vượt trội so với các chủng còn lại đã phân lập được cũng như chủng đối chứng. Chủng #10 có hoạt tính LiP đạt 163,391 UI/L; hoạt tính MnP đạt 0,838 UI/L và hoạt tính Cellulase đạt 1098,914 UI/L. Môi trường avicel được nhận định là môi trường thích hợp cho sự biểu hiện của hệ enzyme cellulase và môi trường PGB thích hợp cho sự biểu hiện đối với hệ enzyme ligninase. Hoạt tính LiP đạt tối đa vào ngày thứ 5 (223,587 UI/L) và hoạt tính MnP đạt tối đa vào ngày thứ 3 (0,935 UI/L) trên môi trường PGB. Đối với hệ enzyme cellulase đạt cao nhất vào ngày 3 với giá trị 2340,148 UI/L trên môi trường avicel.

Từ khóa: *Phanerochaete chrysosporium*, cellulase, laccase, lignin, lignocelluloses, lignin peroxidase, mangan peroxidase.

MỞ ĐẦU

Dân số tăng nhanh, nguồn nhiên liệu đáp ứng cho sử dụng và sản xuất ngày càng cạn kiệt, vì vậy, cần tìm ra một nguồn nhiên liệu sạch và bền vững. Trong khi đó, lignocelluloses là nguồn nhiên liệu sẵn có trong phế thải nông nghiệp như rơm rạ, bã mía, mùn cưa, mặt dừa [3]. Chúng có tiềm năng rất lớn cho sản xuất nhiên liệu sinh học nhưng lại chưa được sử dụng triệt để. Chuyển hóa và sử dụng được nguồn nguyên liệu lignocelluloses này là một vấn đề mà công nghệ sinh học đang tập trung nghiên cứu và nếu thành công sẽ có thể giải quyết được các vấn đề về nguồn nhiên liệu [5].

Lignin là một hợp chất tự nhiên, là thành phần có cấu trúc phức tạp, đa dạng và rất khó bị phân hủy. Xử lý bằng biện pháp hóa học và sử dụng hóa chất đã được tiến hành, song hiệu quả còn hạn chế do chi phí cao và thường gây ra những tác hại xấu về mặt môi trường [3]. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phát hiện các chủng nấm có hoạt tính phân hủy lignin và cellulose tốt, làm cơ sở cho việc xây

dựng phương pháp tách lignin ra khỏi nguồn phế thải dựa trên các biện pháp sinh học để có thể tận dụng được nguồn phế thải nông nghiệp và tối ưu quy trình tiền xử lý nguyên liệu trong quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

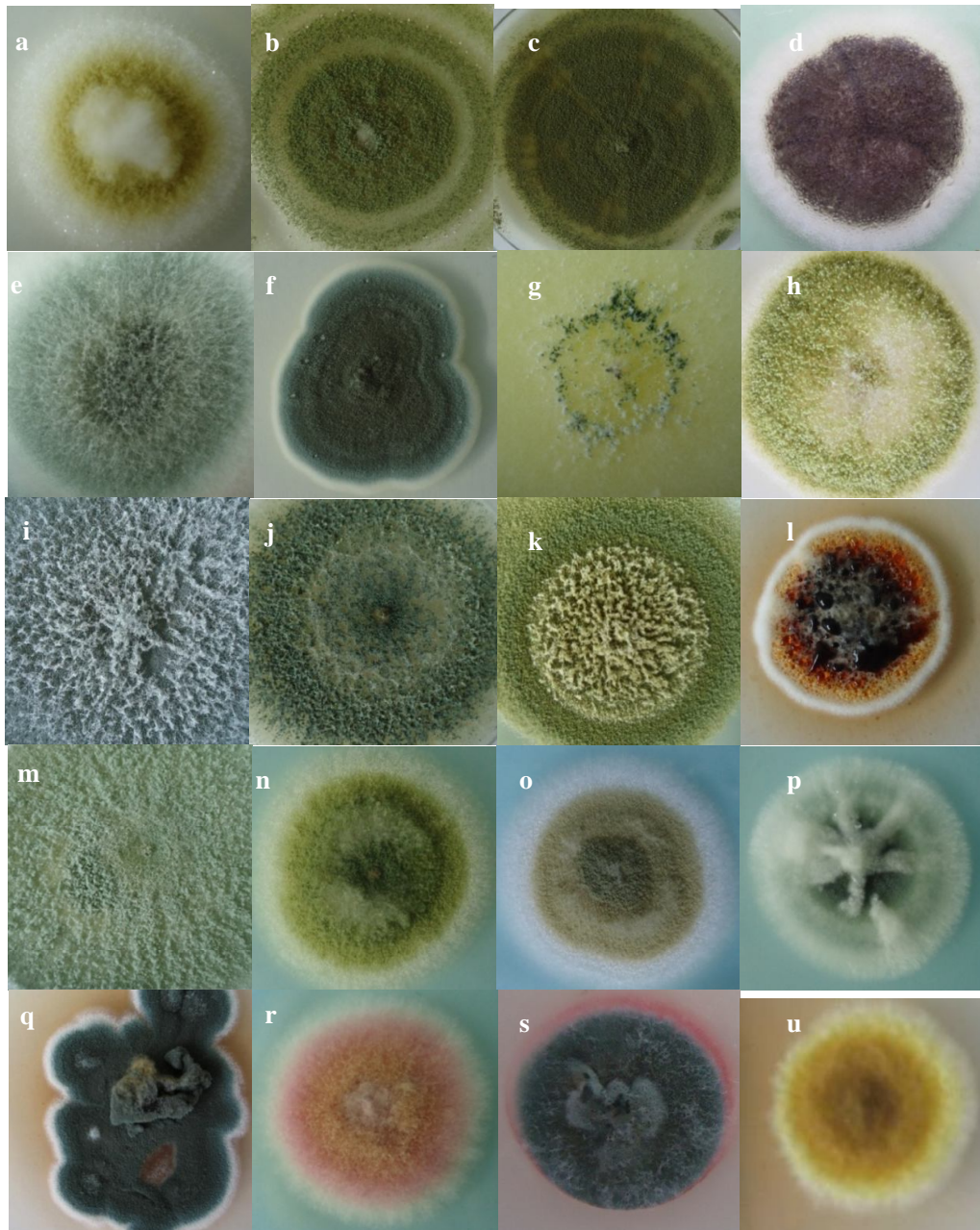
Nguồn mẫu

Mẫu nấm được thu nhận từ các đoạn gỗ mục, tơ nấm, mẫu nấm lớn ở khu dự trữ sinh quyển Cần Giờ; Bidoup, Đà Lạt; Nam Cát Tiên, Đồng Nai; trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh và Tiền Giang.

Xác định đường kính tơ nấm và đường kính vòng phân giải

Mẫu được phân lập và làm thuần trên môi trường PGA có bổ sung kháng sinh. Các chủng nấm được cấy trên môi trường thạch có nguồn carbon duy nhất là lignin/CMC. Khả năng phân hủy lignin/CMC của các chủng được so sánh dựa vào độ lan của tơ nấm và đường kính vòng phân giải trên môi trường cơ chất lignin/CMC. Tốc độ

lan tơ của các chủng được đánh giá trong thời gian 7 ngày. Đường kính vòng phân giải được xác định sau 4 ngày nuôi cấy lác trong môi trường lỏng PGB.



Hình 1. Hình thái 21 chủng nấm khi nuôi cấy trong đĩa petri trên môi trường PGA

a. Chủng 1; b. Chủng 2; c. Chủng 8; d. Chủng 9; e. Chủng 11; f. Chủng 16; g. Chủng 20; h. Chủng 24; i. Chủng 28; j. Chủng 29; k. Chủng 30; l. Chủng 31; m. Chủng 35; n. Chủng 41; o. Chủng 42; p. Chủng 44; q. Chủng 46; r. Chủng 54; s. Chủng BD; u. Chủng TG3.

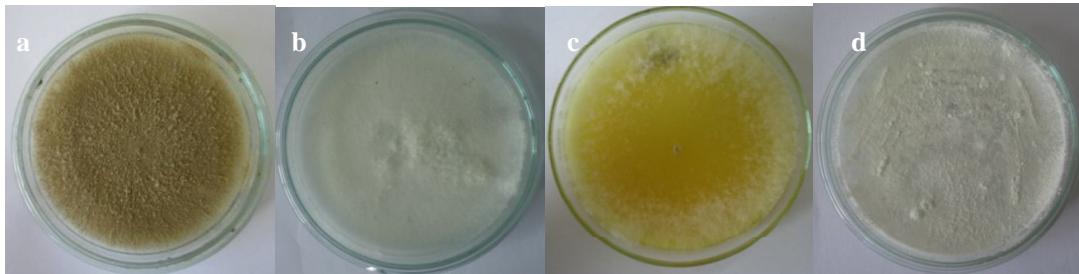
Xác định hoạt tính enzyme

Hoạt tính lignin peroxidase được xác định dựa vào sự oxi hóa xanh methylene làm giảm hấp thụ ở bước sóng 664 nm với hằng số tắt là $74 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Hoạt tính mangan peroxidase được xác định dựa vào sự oxi hóa phenol red làm gia tăng hấp thụ ở bước sóng 610 nm với hằng số tắt là $22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Hoạt tính cellulase được xác định dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử và thuốc thử DNS. Để xác định hoạt tính của hệ enzyme cellulase, cần sử dụng CMC như cơ chất, ủ dịch chiết enzyme với CMC trong 30 phút ở nhiệt độ 50°C .

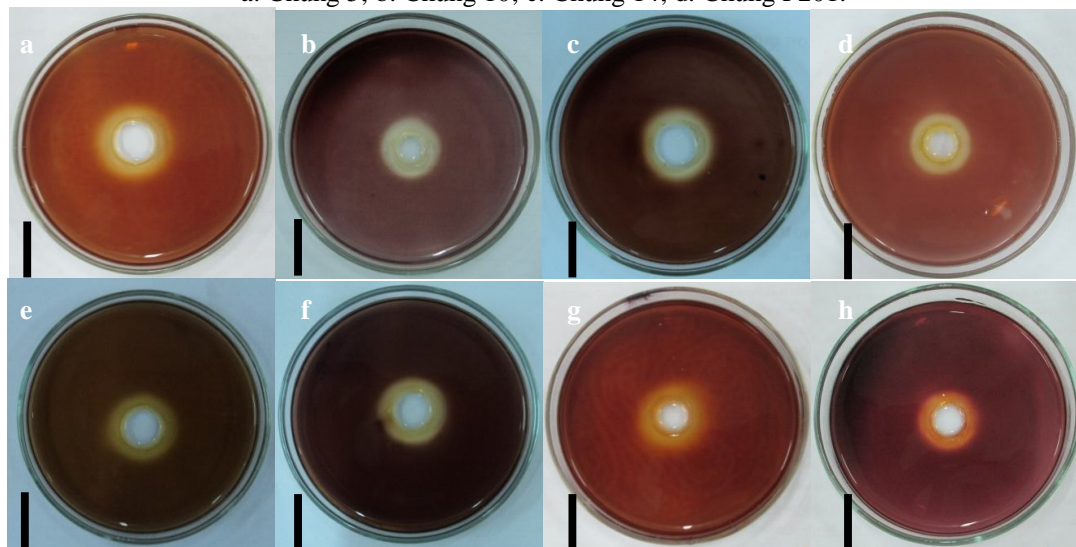
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái các chủng phân lập

Quan sát các chủng nấm phân lập được, đa số các khuẩn lạc đều khô, dạng hình tròn. Màu sắc của các chủng nấm đa dạng, phần lớn là trắng và xanh, tuy nhiên, vẫn có một số nấm có màu sắc đặc trưng như chủng 9 (nâu đen); chủng 31 (cam); chủng 54 (màu hồng); chủng BD (xanh rêu) và chủng TG3 (màu vàng cam). Phần lớn bào tử dạng hạt, nhỏ và nhuyền; một số khác lại hình thành thành từng mảng tơ nấm. Ở một số chủng như chủng 31, chủng 54 và chủng TG3, sắc tố đã hòa tan trong môi trường làm thay đổi màu của môi trường (ngả sang màu vàng hoặc nâu). Riêng về chủng TG3, chủng nấm này gây mùi khó chịu khi bị phân hủy.



Hình 2. Hình thái 4 chủng nấm có hoạt tính cao
a. Chủng 5; b. Chủng 10; c. Chủng 14; d. Chủng P201.



Hình 3. Vòng phân giải của 4 chủng 10, 5, 14 và P201

a. Chủng 10 trên môi trường lignin: 1,2 cm; b. chủng 10 trên môi trường CMC: 1,0cm; c. chủng 5 trên môi trường lignin: 1,1cm; d. chủng 5 trên môi trường CMC: 0,9 cm; e. chủng 14 trên môi trường lignin: 0,9 cm; f. chủng 14 trên môi trường CMC: 0,9 cm; g. chủng P201 trên môi trường lignin: 1,2 cm; h. chủng P201 trên môi trường CMC: 0,8 cm. Giá trị thanh ngang: 1 cm.

Kết quả định tính khả năng phân hủy lignin và cellulose

Sự lan tơ của các chủng nấm trên hai loại môi trường lignin và CMC

Đa số các chủng nấm có tốc độ lan tơ trên môi trường CMC nhanh hơn so với trên môi trường lignin (bảng 1). Các chủng 5, 10, 11, 14, 29, 35 và P201 có tốc độ lan tơ nhanh trên cả hai môi trường chọn lọc đang được tiến hành

khảo sát, cụ thể trên 0,90 cm/ngày trên môi trường lignin và trên 1 cm/ngày trên môi trường CMC.

Vòng phân giải của các chủng nấm trên môi trường cơ chất lignin và CMC

Đa số các chủng đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme phân hủy lignin và cellulose nhưng không đồng đều giữa các chủng (bảng 2).

Bảng 1. Tốc độ lan tơ trung bình của các chủng trên môi trường lignin và CMC (cm/ngày)

Chủng	Môi trường lignin	Môi trường CMC	Chủng	Môi trường lignin	Môi trường CMC
1	0,61	0,68	30	0,36	0,90
2	0,59	0,66	31	0,74	0,83
5	0,90	1,15	35	1,31	1,16
8	0,67	1,01	41	0,68	1,27
9	0,55	0,75	42	0,81	0,91
10	1,26	1,23	44	0,73	0,83
11	1,33	1,33	46	0,38	0,42
14	0,98	1,18	54	0,71	0,88
16	0,26	0,38	BD	0,29	0,53
20	1,25	0,96	NCT	0,89	1,08
24	0,67	1,23	P201	1,33	1,15
28	1,04	0,72	TG3	0,19	0,32
29	1,31	1,08			

Trên môi trường cơ chất lignin, đa số các chủng đều có hoạt tính, chỉ có chủng 8, 42, 46 và TG3 không có hoạt tính khi tiến hành định tính vào thời điểm ngày thứ tư. Các chủng được tuyển chọn có hoạt tính cao dựa theo thứ tự là chủng 5, 10, P201, 14, 1 và 20. Các chủng này có giá trị vòng phân giải dao động ở khoảng 0,675-1,075 cm. Trên môi trường cơ chất CMC, ngoại trừ chủng 46 và TG3 không có hoạt tính khi tiến hành định tính vào thời điểm ngày thứ tư, các chủng còn lại đều cho thấy có hoạt tính trên môi trường cơ chất CMC. Các chủng có hoạt tính cao được tuyển chọn theo thứ tự là chủng 10, 11, P201, 14, 5, 20, 30 và 1. Xét về khả năng phân hủy trên cả 2 môi trường cơ chất, trong các chủng được lựa chọn trên mỗi môi trường nhận thấy có sự tương đồng 4 chủng được đánh giá cao là chủng 5, 10, 14 và P201. Về hoạt tính riêng của mỗi chủng, chủng 10 được đánh giá có hoạt tính cao trên cả hai môi

trường ở tỷ lệ tương đương nhau 1,075 cm/môi trường lignin và 1,1 cm/môi trường CMC. Đối với chủng 5, chủng này có hoạt tính khá cao, tương đương chủng 10 với giá trị 1,075 cm/môi trường lignin nhưng trên môi trường CMC chỉ đạt 0,85 cm. Chủng 14 lại có hoạt tính tương đương trên cả hai môi trường, 0,8 cm/môi trường lignin và 0,85 cm/môi trường CMC. Chủng P201, chủng này có hoạt tính trên tương đối cao trên cả hai môi trường cơ chất, trên môi trường lignin đạt 0,975 cm và trên môi trường CMC đạt 0,9 cm, chỉ đứng sau chủng 10 (1,1 cm).

Chủng 1 và chủng 20 có hoạt tính cao trên cả hai môi trường, nhưng nhìn chung giá trị vẫn còn thấp so với các chủng 5, chủng 10, chủng 14 và chủng P201. Ngoài ra, chủng 11 có giá trị khá cao trên môi trường CMC (1.000 cm) nhưng giá trị trên môi trường lignin lại khá thấp.

Bảng 2. Vòng phân giải của 25 chủng nấm trên môi trường lignin và CMC

Chủng	Đường kính vòng phân giải của các chủng nấm + SE (cm)	
	Môi trường lignin	Môi trường CMC
1	0,675 ^{cd} ± 0,10	0,775 ^{cd} ± 0,05
2	0,625 ^{cde} ± 0,05	0,675 ^{def} ± 0,10
5	1,075 ^a ± 0,05	0,850 ^c ± 0,06
8	0,000 ^g ± 0,000	0,325 ⁱ ± 0,05
9	0,475 ^{def} ± 0,21	0,500 ^{gh} ± 0,12
10	1,075 ^a ± 0,15	1,100 ^a ± 0,12
11	0,300 ^f ± 0,20	1,000 ^{ab} ± 0,00
14	0,800 ^{bc} ± 0,08	0,850 ^c ± 0,06
16	0,525 ^{de} ± 0,05	0,600 ^{efg} ± 0,08
20	0,675 ^{cd} ± 0,05	0,800 ^{cd} ± 0,08
24	0,525 ^{de} ± 0,05	0,350 ⁱ ± 0,06
28	0,475 ^{def} ± 0,05	0,575 ^{efg} ± 0,15
29	0,650 ^{cde} ± 0,06	0,700 ^{de} ± 0,00
30	0,425 ^{ef} ± 0,26	0,775 ^{cd} ± 0,10
31	0,475 ^{def} ± 0,05	0,500 ^{gh} ± 0,00
35	0,625 ^{cde} ± 0,22	0,550 ^{fg} ± 0,06
41	0,600 ^{cde} ± 0,00	0,625 ^{efg} ± 0,05
42	0,000 ^g ± 0,00	0,375 ^{hi} ± 0,05
44	0,625 ^{cde} ± 0,05	0,625 ^{efg} ± 0,10
46	0,000 ^g ± 0,00	0,000 ^j ± 0,00
54	0,650 ^{cde} ± 0,06	0,700 ^{de} ± 0,08
BD	0,625 ^{cde} ± 0,24	0,525 ^g ± 0,13
NCT	0,625 ^{cde} ± 0,05	0,575 ^{efg} ± 0,10
P201	0,975 ^{ab} ± 0,21	0,900 ^{bc} ± 0,10
TG3	0,000 ^g ± 0,00	0,000 ^j ± 0,00
CV %	22,43	12,89

CV: Hệ số biến thiên. Trong cùng một cột và cùng yếu tố ảnh hưởng, các giá trị trung bình có chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,01$).

Từ những nhận định trên, các chủng: 5, 10, 14 và chủng P201 được tuyển chọn để tiếp tục thí nghiệm xác định hoạt tính enzyme.

Hoạt tính enzyme của các chủng 5, 10, 14 và P201

Khi tiến hành xác định hoạt tính LiP, chủng 10 với giá trị vượt trội 163,391 UI/L được đánh giá là chủng có hoạt tính cao nhất trong 4 chủng đã tuyển chọn (bảng 3). Hoạt tính của chủng này gấp 6,3 lần giá trị của chủng 14 (25,799 UI/L), gấp 1,8 lần giá trị của chủng 5 (89,681 UI/L) và gấp 1,7 lần giá trị hoạt tính LiP của chủng P201 (94,595 UI/L). Chủng 5 và P201 có giá trị gần như tương đương ở ngày thứ tư, chủng 14 có hoạt tính LiP yếu nhất trong các chủng khảo sát.

Kết quả ở bảng 3 còn cho thấy, chủng 10 có hoạt tính MnP cao nhất với giá trị 0,838 UI/L. Giá trị hoạt tính MnP của chủng 10 cao gấp 1,3 lần chủng 14 (0,656 UI/L), gấp 3,7 lần của chủng 5 (0,227 UI/L) và gấp 2,3 lần so với chủng P201 (0,364 UI/L). Chủng 14 có hoạt tính MnP gần gấp 2 lần chủng P201 ở ngày thứ tư. Chủng 5 có hoạt tính MnP yếu hơn các chủng còn lại (0,277 UI/L).

Đối với hệ enzyme cellulase, kết quả trên còn cho thấy, chủng 10 với giá trị 1098,914 UI/L là giá trị cao nhất trong 4 chủng khảo sát. So với các chủng khác, hoạt tính cellulase của chủng 10 cao gấp 1,89 lần chủng 5 và 1,97 lần chủng 14 và gấp 1,53 lần chủng P201 khi xác định hoạt tính tại ngày thứ tư; chủng 5 và 14 có

hoạt tính gần tương đương nhau: 582,864 UI/L đối với chủng 5 và 558,420 UI/L đối với chủng 14, chủng P201 có hoạt tính đạt 715,951 UI/L và chỉ đứng sau chủng 10.

Bảng 3. Hoạt tính enzyme của các chủng 5, 10, 14 và P201 sau 4 ngày nuôi lác (UI/L)

Chủng	Hoạt tính trung bình + SE (UI/L)		
	Hoạt tính LiP	MnP	Cellulase
5	89,681 ^b ± 5,63	0,227 ^b ± 0,02	582,864 ^c ± 57,23
10	163,391 ^a ± 13,95	0,838 ^a ± 0,05	1098,914 ^a ± 20,51
14	25,799 ^c ± 7,37	0,656 ^{ab} ± 0,09	558,420 ^c ± 38,51
P201	94,595 ^b ± 11,26	0,364 ^b ± 0,01	715,951 ^b ± 40,19
CV (%)	10,81	10,45	5,58

Ghi chú: như bảng 2.

Khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp enzyme phân giải lignin và cellulose

Bảng 4. Hoạt tính LiP trong thí nghiệm khảo sát thời gian và môi trường tối ưu

Ngày	Hoạt tính LiP trung bình + SE (UI/L)	
	Môi trường PGB	Môi trường avicel
1	27,027 ^f ± 2,13	18,428 ^e ± 3,7
2	84,767 ^c ± 3,69	45,455 ^d ± 8,51
3	108,108 ^d ± 7,67	93,366 ^c ± 10,64
4	163,391 ^c ± 13,95	131,450 ^b ± 12,94
5	223,587 ^a ± 9,28	158,477 ^a ± 9,75
6	187,961 ^b ± 9,75	122,850 ^b ± 5,63
CV %	6,56	9,55

Ghi chú: như bảng 2.

Dựa theo kết quả ở bảng 4, trên cả hai môi trường khảo sát, hoạt tính enzyme đều đạt cao nhất vào ngày thứ 5, đạt 223,587 UI/L đối với môi trường PGB và 158,477 UI/L đối với môi trường avicel. Kết quả bảng 4 còn cho thấy hoạt tính ở môi trường PGB ở tất cả các ngày khảo sát đều đạt giá trị cao hơn so với môi trường

avicel. Trên môi trường PGB, hoạt tính đạt cao nhất ở ngày thứ năm và bắt đầu giảm ở ngày thứ sáu. Trên môi trường avicel cũng tương tự, hoạt tính enzyme đạt cao nhất ở ngày thứ 5 và kém hơn hoạt tính trên môi trường PGB cũng tại thời điểm ngày thứ năm là 65,110 UI/L.

Bảng 5. Hoạt tính MnP trong thí nghiệm khảo sát thời gian và môi trường tối ưu

Ngày	Hoạt tính MnP trung bình + SE (UI/L)	
	Môi trường PGB	Môi trường avicel
1	0,571 ^{ab} ± 0,03	0,390 ^a ± 0,02
2	0,643 ^{ab} ± 0,04	0,474 ^a ± 0,03
3	0,935 ^a ± 0,11	0,299 ^{ab} ± 0,04
4	0,299 ^b ± 0,03	0,136 ^b ± 0,02
5	0,253 ^b ± 0,03	0,110 ^b ± 0,01
6	0,208 ^b ± 0,02	0,071 ^b ± 0,02
CV %	10,88	10,37

Ghi chú: như bảng 2.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, trên môi trường PGB, hoạt tính MnP đạt cao nhất tại ngày thứ ba

là 0,935 UI/L, hoạt tính đã đạt mức cao từ ngày 1 (0,571 UI/L) và tăng nhanh từ ngày thứ hai đến

ngày thứ ba (tăng 0,292 UI/L) và sau đó giảm mạnh từ ngày thứ ba đến ngày thứ tư (giảm 0,636 UI/L), tiếp tục giảm chậm lại ở các ngày tiếp theo. Trên môi trường avicel, hoạt tính enzyme lại đạt cao nhất tại ngày thứ hai: 0,474 UI/L. Sau ngày này, hoạt tính bắt đầu giảm và giảm nhanh nhất từ ngày thứ hai đến ngày thứ tư, trung bình mỗi ngày giảm 0,169 UI/L và sau đó bắt

đầu giảm chậm lại từ ngày thứ tư.

Ở môi trường PGB, hoạt tính enzyme đều cao hơn so với trên môi trường avicel ở tất cả các ngày. Giá trị hoạt tính cao nhất tại ngày thứ ba trên môi trường PGB cao gấp 1,97 lần so với hoạt tính cao nhất tại ngày thứ hai trên môi trường avicel.

Bảng 6. Hoạt tính cellulase trong thí nghiệm khảo sát thời gian và môi trường tối ưu

Ngày	Hoạt tính cellulase trung bình + SE (UI/L)	
	Môi trường PGB	Môi trường avicel
1	707,802 ^d ± 61,16	686,074 ^c ± 96,07
2	884,346 ^c ± 24,89	865,333 ^b ± 50,88
3	979,407 ^b ± 21,56	2340,148 ^a ± 14,11
4	1063,605 ^a ± 26,19	533,975 ^{cd} ± 65,86
5	292,247 ^e ± 24,89	406,321 ^d ± 52,39
6	129,284 ^f ± 20,51	218,914 ^c ± 9,41
CV (%)	4,89	6,72

Ghi chú: như bảng 2.

Trên môi trường PGB, hoạt tính tăng từ ngày thứ 1 và đạt cao nhất ở ngày thứ 4 (1063,605 UI/L), sau đó bắt đầu giảm (bảng 6).

Trên môi trường avicel, hoạt tính cao nhất đạt 2340,148 UI/L tại ngày thứ ba cao gấp 2,2 lần hoạt tính cao nhất đạt tại ngày thứ 4 trên môi trường PGB. Hoạt tính trên cả hai môi trường gần như bằng nhau tại thời điểm đo ở ngày thứ 1 và ngày thứ hai, nhưng đến ngày thứ ba, hoạt tính tăng nhanh so với ngày thứ hai, và sau đó lại giảm mạnh từ ngày thứ ba đến ngày thứ tư. Sau ngày thứ tư hoạt tính giảm chậm lại, tuy nhiên, ở ngày thứ năm và thứ sáu hoạt tính vẫn cao hơn so với môi trường PGB. Do đó, riêng đối với hoạt tính enzyme cellulase, hoạt tính trên môi trường avicel cao hơn nhiều so với trên môi trường PGB.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phân lập và thu nhận được 25 chủng nấm, trong đó có chủng 5, chủng 10, chủng 14 và chủng P201 đã thể hiện được kết quả rõ rệt. Hoạt tính LiP đạt giá trị cao nhất vào ngày thứ năm trên môi trường PGB, hoạt tính enzyme MnP đạt giá trị cực đại tại ngày ba trên môi trường PGB. Đối với hệ enzyme cellulase, hoạt tính enzyme cao hơn ở môi trường PGB và đạt cao nhất vào ngày ba. Môi

trường avicel thích hợp hơn cho việc thể hiện hoạt tính cellulase trong khi đó môi trường PGB thích hợp hơn cho sự thể hiện hoạt tính ligninase.

Cần nghiên cứu sâu hơn mối tương tác giữa các hoạt tính enzyme LiP, MnP và cellulase, cũng như khảo sát mối tương tác giữa hoạt tính enzyme với đường kính vòng phân giải và sự lan tỏa của nấm để hiểu rõ sự ảnh hưởng của hệ enzyme đến sự phát triển cũng như sự phân giải lignin của các chủng nấm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arora D. S., Paramjit K. G., 2001. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 602-605.
2. Chang A., 2006. Diarylpropane peroxidase, in *springer handbook of enzymes*, scchomburg dietmar and ida schomburg, editors. Springer: Heidenberg, 309-314.
3. Dashtban M., Schraft H., Qin W., 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *Int. J. Biol. Sci.*, 5: 578-595.
4. Deguchi T., Matsubara M., Nishida T., 2002. NADH oxidation by manganese

- peroxidase with or without α -Hydroxy acid. Japan society for bioscience. *Biotechnol. Agrochem.*, 66: 717-721.
5. Howard R. L., Abotsi E., Jansen R., Haward S., 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J. Biotechnol.*, 2: 602-619.
 6. Iwahara K., Hirata M., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M., 2000. Free-radical polymerization of acrylamide by manganese peroxidase produced by the white-rot basidiomycete *Bjerkandera adusta*. *Biotechnology Letters*, 22: 1355-1361.
 7. Paloman H., Tjerneld F., Zacchi G., Tenkannen M., 2004. Adsorption of *Trichoderma reesei* CHB I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.*, 107: 65-72.
 8. Saumita B., Sandeep M., Ramkrishna S., 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 4: 77-93.
 9. Singhal V., Rathore V. S., 2001. Effects of Zn^{2+} and Cu^{2+} on growth, lignin degradation and lignolytic enzymes in *Phanerochaete chrysosporium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 235-247.
 10. Singh D., Shulin C., 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 399-417.

ISOLATING, EVALUATING AND OPTIMIZING LIGNOCELLULOSIC DECOMPOSITION OF VARIOUS MICROBIAL STRAINS

Nguyen Ngo Yen Ngoc¹, Luong Bao Uyen², Bui Minh Tri¹

¹Nong Lam University, Ho Chi Minh city

²University of sciences, Ho Chi Minh city

SUMMARY

This research was conducted in order to find out active strains those can well decompose and remove lignin from agricultural waste sources for the production of biofuels by biological pathways. Fifty fungal strains were isolated and assessed degree of lignin and cellulose degradation based on speed and diameter of round-resolution on lignin and CMC medium. The experiment was expected to select highly active strains in biomass degradation ability. The selected strains were determined enzymatic activities including Lignin peroxidase, Manganese peroxidase and Cellulase. We also tested factors those could affect the biosynthesis of lignin and cellulose enzymes, it was indicated that the 4 strains: strains 5, 10, 14 and P201 were superior as compared with other strains. Based on enzyme assay, the strain 10 shown up to 163.391 UI/L 0.838 UI/L and 1098.914 UI/L for LiP, MnP and cellulase activities, respectively, this strain was considered to be the most active on both ligninase and cellulase systems. The obtained results also showed that avicel medium was suitable for the biosynthesis of cellulase enzyme; While, PGB medium was suitable for biosynthesis enzyme ligninase system. LiP activity was highest on the fifth day in PGB medium; with a value of 223.587 UI/L. MnP activity reached maximal value on the third day in PGB medium with a value of 0.935 UI/L. For cellulase enzyme systems, enzymatic activity on avicel medium was higher on PGB medium and achieved the highest value on the third day with a value of 2340.148 IU/L.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*, cellulase, laccase, lignin peroxidase, lignocelluloses, manganese peroxidase.

Ngày nhận bài: 15-7-2013