

Nghiên cứu tăng khả năng sinh tổng hợp manganese peroxidase (MnP) ở nấm *Phanerochaete chrysosporium* và bước đầu ứng dụng để phân hủy glyphosate

Nguyễn Minh Quang*, Lê Hoài Diễm Phương, Lương Bảo Uyên

Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG HCM,
227 Nguyễn Văn Cừ, Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Hệ enzyme phân hủy lignin bao gồm các enzyme manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP), laccase (Lac) có khả năng phân hủy hợp chất phức tạp khó phân hủy, là lignin. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã cho thấy hệ enzyme phân hủy lignin có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ độc hại như các loại thuốc trừ sâu, các hợp chất phenolic, thuốc trừ cỏ glyphosate,... Trong đó MnP từ chủng nấm mục trắng *Phanerochaete chrysosporium* được xem là có khả năng phân hủy glyphosate. Mục tiêu của nghiên cứu này là tăng hiệu quả phân hủy glyphosate qua việc khảo sát các yếu tố tác động gồm nồng độ glucose, ammonium tartrate và thời gian nuôi cấy để tăng khả năng sinh tổng hợp MnP từ nấm *Phanerochaete chrysosporium*. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy hoạt tính MnP sinh tổng hợp đạt 49,75UI/L ở điều kiện môi trường PGB chứa 0,2% glucose, 5g/L ammonium tartrate và thời gian nuôi 9 ngày. Ngoài ra nghiên cứu cũng đã chứng minh được khả năng phân hủy glyphosate của MnP là cao hơn LiP và Lac.

Từ khóa: *Phanerochaete chrysosporium*, phân hủy glyphosate, manganese peroxidase (MnP).

1. Giới thiệu

Theo như nhiều nghiên cứu trước đây, hệ enzyme phân hủy lignin từ nấm mục trắng có khả năng xử lý các tác nhân gây ô nhiễm môi trường rất tốt. *Phanerochaete chrysosporium* là loài nấm thuộc họ Phanerochaetaceae. Chúng có khả năng sinh tổng hợp các enzyme thuộc hệ enzyme phân hủy lignin trong đó có lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) và laccase (Lac).

Glyphosate là chất diệt cỏ được sử dụng rộng rãi trong canh tác nông nghiệp. Glyphosate cũng là độc tố đối với cá, một số loài giun đất, động vật không xương sống trong nước và nhiều loại động vật trên cạn [1]. Ở người, glyphosate ảnh hưởng đến vi khuẩn đường ruột qua con đường shikimic acid, là một chất độc đối với hệ thần kinh, gan, thận và là chất gây ung thư [1, 2].

Nghiên cứu của Pilar Castillo đã chứng minh được khả năng phân hủy glyphosate của 2 enzyme thuộc hệ enzyme phân hủy lignin là Lac và MnP. Trong đó, MnP có khả năng phân hủy 100% glyphosate trong 24 giờ ở điều kiện *in-vitro* [3].

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1649691949.

Email: nmquang93@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4566>

P. chrysosporium có thể phát triển sợi nấm trong môi trường lỏng và tổng hợp MnP. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là tăng hiệu quả phân hủy glyphosate qua việc tăng khả năng sinh tổng hợp MnP từ *P. chrysosporium*.

2. Vật liệu phương pháp

2.1. Chúng vi sinh

Chủng nấm mục trắng *P. chrysosporium* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ enzyme, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh.

2.2. Enzyme thương mại

Lignin peroxidase (EC 1.11.1.14), manganese peroxidase (EC 1.11.1.13) từ *P. chrysosporium* và laccase (EC 1.10.3.2) từ *Trametes versicolor* được mua từ Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.3. Glyphosate

Thuốc diệt cỏ không chọn lọc Glyphosan 480 SL- sản phẩm của Công ty Cổ phần Bảo vệ Thực vật An Giang.

2.4. Môi trường nuôi cấy

Môi trường PGA (Potato Glucose Agar) gồm các thành phần: dịch khoai tây đun sôi (từ 200g khoai tây), 20g glucose và 20g agar hòa trong 1L nước cất. Môi trường PGB (Potato Glucose Broth) chứa cùng các thành phần như PGA ngoại trừ agar. Tất cả các môi trường được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

2.5. Thiết lập thí nghiệm

2.5.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Chủng nấm 7 ngày tuổi trên môi trường thạch nghiêng PGA được chuyển sang môi trường PGB. Chúng được nuôi cấy lắc ở nhiệt độ phòng (khoảng 30°C) và được khảo sát hoạt tính MnP sau 5, 7, 9, 11, 13, 15 ngày.

2.5.2. Ảnh hưởng của nồng độ glucose

Nấm được nuôi cấy trong môi trường PGB có bổ sung nồng độ glucose khác nhau (1, 2, 3, 4, 5 %) theo thời gian được xác định ở mục 2.3.1, hoạt tính MnP được xác định để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ glucose.

2.5.3. Ảnh hưởng của nồng độ ammonium tartrate

Nấm được nuôi cấy trong môi trường PGB với nồng độ glucose theo kết quả của khảo sát 2.3.2 và bổ sung ammonium tartrate với các nồng độ khác nhau (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 g/L). Sau khoảng thời gian nuôi cấy thích hợp, hoạt tính MnP được xác định để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ ammonium tartrate.

2.6. Xác định hoạt tính MnP

Hỗn hợp phản ứng chứa 0,1ml sodim lactate 0,25M, 0,05 ml MnSO₄ 2mM, 0,2 ml albumin 0,5%, 0,1ml phenol red 0,1%, 0,5ml dịch enzyme và 0,05 ml H₂O₂ 2mM pha trong đệm sodium phosphate 0,2M (pH 8). Hỗn hợp được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút và kết thúc phản ứng với 0,04ml NaOH 2N. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 610nm và được biểu thị theo đơn vị UI/L. Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzyme cần để oxi hóa 1 mol cơ chất trong 1 phút [4].

2.7. Khảo sát khả năng phân hủy glyphosate của hệ enzyme phân hủy lignin

Phản ứng phân hủy glyphosate được thực hiện ở điều kiện in vitro. Hỗn hợp phản ứng có tổng thể tích 1mL chứa trong ống eppendorf bao gồm các thành phần như trong Bảng 1. Phản ứng được ủ lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau 24 giờ, sử dụng methanol để dừng phản ứng.

Hàm lượng glyphosate được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí 2 lần khối phổ (GC-MS/MS) thực hiện bởi Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TP.HCM theo Martins-Júnior và cộng sự [5].

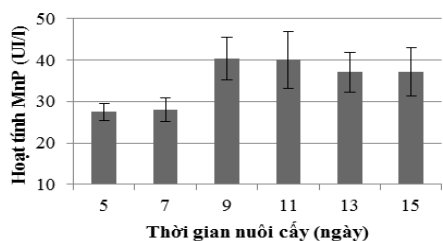
Bảng 1. Thành phần phản ứng phân hủy glyphosate

Mẫu	Enzyme (0.15UI/mL)	Glyphosate (mg/L)	Đệm acetate pH 4.5
R0	-	10	0,1M
R1	MnP thương mại	10	0,1M
R2	LiP thương mại	10	0,1M
R3	Lac thương mại	10	0,1M
R4	MnP từ <i>P. chrysosporium</i> .	10	0,1M
R5	Lac từ <i>Pleurotus sp.</i>	10	0,1M

3. Kết quả và biện luận

3.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Theo như Xiong Xiaoping và cộng sự, chủng *P. chrysosporium* bắt đầu sinh tổng hợp MnP sau 4 ngày nuôi cấy. Do đó, tiến hành khảo sát khoảng thời gian kéo dài từ 5 đến 15 ngày [6]. Kết quả được trình bày ở Hình.1.



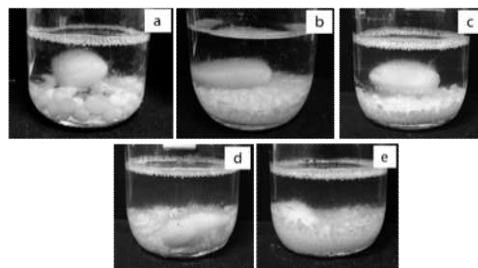
Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sinh tổng hợp MnP của chủng *P. chrysosporium*.

Kết quả cho thấy chủng nấm bắt đầu sinh tổng hợp MnP sau 5 ngày nuôi cấy (24.47UI/L) và đạt cực đại sau 9 ngày (40.42UI/L). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Xiong Xiaoping và cộng sự, hoạt tính MnP của *P. chrysosporium* cao nhất sau 7 - 8 ngày nuôi cấy và giảm ngay sau những ngày nuôi cấy tiếp theo [6].

Do đó, 9 ngày là thời gian được chọn cho các khảo sát tiếp theo.

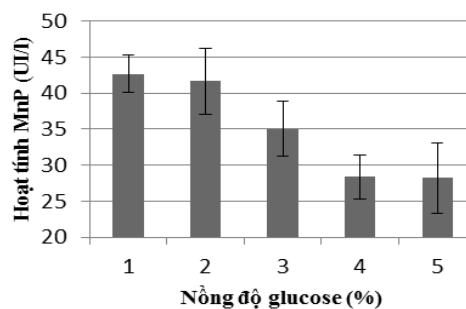
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ glucose

Trong sự sinh trưởng của vi sinh vật, glucose là nguồn carbon thường được chọn để bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Do đó, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự sinh tổng hợp MnP của chủng nấm với dải nồng độ kéo dài từ 1%, 2%, 3%, 4% đến 5%.



Hình 2 Ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự sinh trưởng của chủng *P. chrysosporium*.

Ghi chú: Nồng độ D-glucose: a (1%), b (2%), c (3%), d (4%), e (5%).



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự sinh tổng hợp MnP của chủng *P. chrysosporium*.

Enzyme được thu nhận sau 9 ngày nuôi cấy và phân tích hoạt tính MnP. Kết quả được thể hiện ở hình 3.

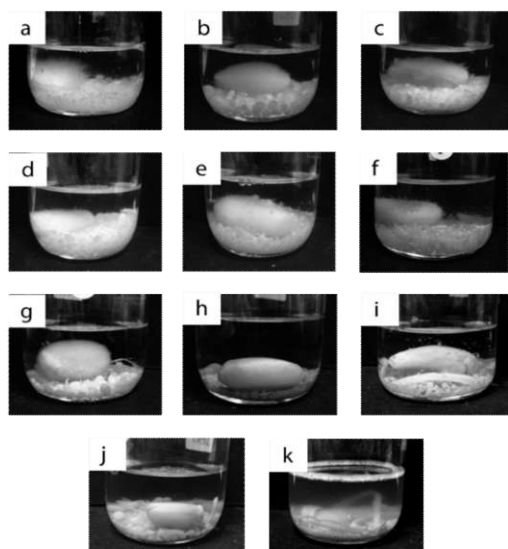
Kết quả hình 3 cho thấy nồng độ glucose 1% và 2% cho hoạt tính MnP cao nhất, lần lượt là 42.67 và 41.68 UI/l. Khi nồng độ glucose càng tăng (lớn hơn 3%) thì hoạt tính MnP càng giảm, ở nồng độ 3%, hoạt tính MnP giảm 17.9%, ở 4% và 5% lần lượt giảm 33.6% và 33.9% so với ở nồng độ 1%.

Theo kết quả của khảo sát này, nồng độ glucose thích hợp cho sự sinh tổng hợp MnP

của chủng *P. chrysosporium* là 1-2%. Tuy nhiên, nếu sử dụng nồng độ glucose 1%, nguồn glucose sẽ gần cạn kiệt ở cuối pha phát triển. Như vậy sẽ làm rút ngắn thời gian tồn tại của pha cân bằng, dẫn tới làm giảm mạnh khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng nấm ở giai đoạn này. Trong khi đó, ở nồng độ glucose 2%, khi bước qua pha cân bằng, lượng glucose trong môi trường vẫn còn đủ để chủng nấm sinh tổng hợp MnP mà không làm ảnh hưởng đến sự khuếch tán của oxy vào trong môi trường [6].

Như vậy, nồng độ glucose 2% là nồng độ thích hợp nhất cho sự sinh tổng hợp MnP của chủng *P. chrysosporium*, và được chọn để tiến hành các khảo sát tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ ammonium tartrate



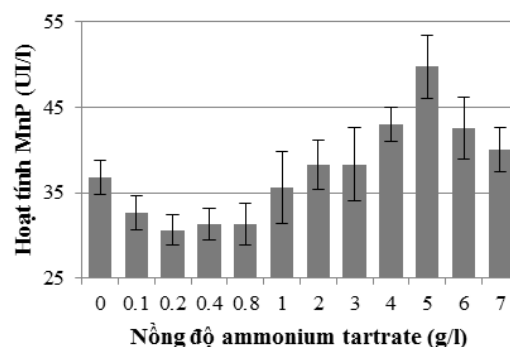
Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ ammonium tartrate lên sự sinh trưởng của chủng *P. Chrysosporium*.

Ghi chú: Nồng độ ammonium tartrate: a (0g/L), b (0,1g/L), c (0,2g/L), d (0,4g/L), e (0,8g/L), f (1g/L), g (2g/L), h (4g/L), i (5g/L), j (6g/L), k (7g/L).

Theo những nghiên cứu trước, nguồn nitrogen có khả năng làm tăng khả năng sinh tổng hợp hệ enzyme lignin của các chủng nấm đảm [7, 8]. Theo Tien và Kirk, khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng đều sử dụng nguồn nitrogen là ammonium tartrate. Vì vậy, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ammonium tartrate (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 2, 4,

5, 6 và 7 g/L) trong môi trường nuôi cấy với 2% glucose. Mẫu được thu sau 9 ngày nuôi để phân tích hoạt tính MnP.

Khi nồng độ ammonium tartrate tăng từ 1 đến 7g/L, sinh khối nấm bắt đầu giảm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Qian và cộng sự [9]. Ảnh hưởng của ammonium tartrate lên quá trình sinh tổng hợp MnP được thể hiện trong Hình 5.



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ ammonium tartrate lên sự sinh tổng hợp MnP của chủng *P. chrysosporium*.

Kết quả từ hình 5 cho thấy xu hướng tăng lên của hoạt tính MnP khi nồng độ ammonium tartrate tăng từ 0,2 đến 5g/L, hoạt tính đạt giá trị cao nhất ở nồng độ ammonium tartrate 5g/L là 49,75 UI/L (tăng 26% so với mẫu đối chứng). Ở nồng độ 6 và 7 g/L, hoạt tính MnP có dấu hiệu suy giảm. Kết quả của khảo sát này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó của Y Qian và cộng sự [9]. Như vậy, nồng độ ammonium tartrate tốt nhất cho sự sinh tổng hợp MnP của chủng *P. chrysosporium* trong nghiên cứu này là 5 g/L.

Từ kết quả của các khảo sát trên, trong điều kiện nuôi cấy trên môi trường PGB sử dụng 2% glucose và 5g/L ammonium tartrate, hoạt tính MnP của chủng *P. chrysosporium* đạt 49,75 UI/L tăng 167,3% so với giá trị ban đầu 18,61UI/L.

Đánh giá khả năng phân hủy glyphosate.

Nghiên cứu của Leticia Pizzul và cộng sự đã chứng minh được khả năng phân hủy glyphosate tinh sạch của hệ enzyme phân hủy

lignin. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng glyphosate thương mại để thực hiện khảo sát khả năng phân hủy bởi hệ enzyme phân hủy lignin (enzyme thương mại và enzyme thu từ dịch nuôi cấy).

Bảng 5. Hiệu suất phân hủy glyphosate của MnP, LiP và Lac

Mẫu	Enzyme (0.15UI/ml)	Hiệu suất phân hủy (%)
R0	-	0
R1	MnP thương mại	48,8
R2	LiP thương mại	0
R3	Lac thương mại	50,5
R4	MnP từ <i>P. chrysosporium</i> .	40

Kết quả từ bảng 5 cho thấy Lac và MnP có khả năng phân hủy glyphosate ngay cả khi không có sự hiện diện của các yếu tố hỗ trợ. Đồng thời, kết quả cũng cho thấy LiP không có vai trò trong việc phân hủy glyphosate, kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đây [10].

4. Kết luận

Khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng *P. chrysosporium* bị ảnh hưởng bởi các điều kiện nuôi cấy gồm thời gian nuôi cấy, nồng độ glucose và nồng độ ammonium tartrate. Trong đó, điều kiện sinh tổng hợp MnP của chủng *P. chrysosporium* tốt nhất trong nghiên cứu này là ở 100 mL môi trường PGB với 2% glucose, 5 g/L ammonium tartrate sau 9 ngày nuôi cấy.

Nghiên cứu này đã đánh giá được khả năng phân hủy glyphosate của enzyme thương mại LiP, MnP, Lac dạng tinh sạch và dịch enzyme MnP thô nuôi cấy từ nấm *P. chrysosporium*. Hiệu suất phân hủy glyphosate đạt từ 40- 50% ở điều kiện không có các yếu tố hỗ trợ.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ tài chính cho nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] David Buffin, Topsy Jewell, Health and environmental impacts of glyphosate: The implications of increased use of glyphosate in association with genetically modified crops, Pesticide Action Network UK, UK, 2001.
- [2] Stephanie Seneff, Anthony Samsel, Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases and associated pathologies, Surgical Neurology International (2015) 6.
- [3] Leticia Pizzul, María del Pilar Castillo, John Stenström, Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes, Biodegradation 20 (2009) 751.
- [4] Oliveira, Patrícia Lopes de, et al.- Purification and Partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* AND *Paenibacillus* sp., Brazilian Journal of Microbiology 404 (2009) 818.
- [5] Martins-Júnior, Helio A., et al. "Residue analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry." Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology. InTech, (2011) 495.
- [6] Xiong, Xiaoping, et al. "Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air", Journal of Environmental Sciences 201 (2008) 94.
- [7] Gill, P., & Arora, D., "Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 301(2003) 28.
- [8] Levin, L., Malignani, E., & Ramos, A. M., "Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates", Bioresource technology 10112 (2010) 4554.
- [9] Qian, Y., "Effect of nitrogen concentration in culture mediums on growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium*", Journal of Environmental Sciences 172 (2005) 190.
- [10] Pizzul, L., del Pilar Castillo, M., & Stenström, J., "Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes", Biodegradation 206 (2009) 751.

Enhanced Production of Manganese Peroxidase (MnP) in *Phanerochaete chrysosporium* and its Evaluation for Glyphosate Biodegradation

Nguyen Minh Quang, Le Hoai Diem Phuong, Luong Bao Uyen

*Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh,
227 Nguyen Van Cu, Ho Chi Minh, Vietnam*

Abstract: Ligninolytic enzymes including manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP), laccase (Lac) have ability to degrade lignin and difficult decomposing compounds. Many studies proved that ligninolytic enzymes have ability to degrade glyphosate, in which, MnP produced by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is able to degrade this herbicide. One of the approaches to increase the efficiency of glyphosate degradation is the enhancement of the MnP activity in *P. chrysosporium*. The aim of this study was to increase the efficiency of glyphosate degradation by investigating some factors such as glucose, ammonium tartrate concentration and culture time, which can affect the enhanced MnP biosynthesis in *P. chrysosporium*. The fungus produced higher levels of MnP (up to 49.75 UI/L) when the glucose concentration was 0.2% (w/v), the ammonium tartrate concentration was 5 g/L, and the culture time was 9 days. MnP of *P. chrysosporium* was able to degrade 40% glyphosate after 24h of incubation.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*, glyphosate degradation, manganese peroxidase (MnP).