

## SÀNG LỌC CHỦNG NẤM CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LACCASE VÀ PHÂN HỦY CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ ĐA VÒNG THƠM, LOẠI MÀU THUỘC NHUỘM

Hoàng Thị Nhung, Nguyễn Quang Huy, Đinh Thị Thu Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Laccase là nhóm enzyme nhân rộng, được phân bố rộng rãi ở thực vật bậc cao và nấm. Laccase có khả năng phân hủy nhiều loại phenol khác nhau và đóng vai trò quan trọng trong công nghệ sinh học ứng dụng. Năm hiện nay đang rất được quan tâm vì nhóm vi sinh vật này có rất nhiều loài có khả năng sinh tổng hợp laccase. Chúng được phân lập từ rất nhiều nguồn khác nhau như từ môi trường nước, đất, gỗ mục. Trong đó, nấm sợi sinh laccase cũng đã được phát hiện nhưng chưa nhiều. Để tìm hiểu khả năng sinh laccase và khả năng loại bỏ các chất hữu cơ đa vòng thơm và thuốc nhuộm của nấm sợi từ các môi trường sinh thái khác nhau trong đó có rừng nguyên sinh, nghiên cứu này đã được thực hiện Từ rừng Quốc gia Cúc Phương, chủng nấm sợi FCP3 đã được phân lập trên môi trường Vis với hoạt tính ban đầu là 11,7 U/l. Chủng FCP3 có khả năng sinh laccase cao trong điều kiện pH 5,5, chất cảm ứng là CuSO<sub>4</sub>, nguồn carbon glucose, nguồn nitrogen là hỗn hợp KNO<sub>3</sub> và NaNO<sub>3</sub>. Tế bào sống và dịch enzyme thô của chủng FCP3 có khả năng loại bỏ được pyrene với hiệu suất 33% và 41%, anthracene với hiệu suất 41% và 54% (nồng độ ban đầu mỗi chất là 100 mg/l). Ngoài ra, dịch enzyme thô của chủng FCP3 cũng có khả năng loại màu một số thuốc nhuộm như NY3: 92%, RBBR: 86%, NY5: 64%, NY1: 60%, NY7: 6%. Bằng phương pháp phân loại truyền thống kết hợp với xác định một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA, chủng nấm FCP3 được xếp vào ngành nấm nang *Ascomycetes*, chi *Trichoderma* và có tên là *Trichoderma* sp. FCP3.

**Từ khóa:** laccase, PAH, phân hủy sinh học, thuốc nhuộm, *Trichoderma*

### MỞ ĐẦU

Các hợp chất hữu cơ đa vòng thơm (PAH) là nhóm hợp chất gây ô nhiễm nguy hiểm đối với môi trường và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người. Chúng là sản phẩm của quá trình đốt cháy không hoàn toàn của một số nhiên liệu và các hoạt động sống khác của con người. Các PAH có cấu trúc từ 3 vòng thơm trở lên và có khả năng hòa tan giới hạn trong nước nên chúng rất khó bị phân hủy trong môi trường (Fetzer JC, 2000). Bên cạnh đó, cùng với sự phát triển của các ngành công nghiệp dệt, nhuộm, thuốc da... thì một lượng lớn nước thải có độ màu cao cũng được thải ra môi trường (Rosli M, 2006). Các nguồn nước thải này có chứa các độc tố gây ung thư và nếu không được xử lý tốt, chúng sẽ gây ô nhiễm tới nguồn nước mặt và nước ngầm (Sen và Demirel, 2003). Một trong số các phương pháp xử lý các PAH và loại màu thuốc nhuộm có hiệu quả là phương pháp phân hủy sinh học. Nấm là đối tượng thường được sử dụng trong phương pháp phân hủy sinh học do đặc điểm cấu tạo hệ sợi và khả năng sinh các enzyme ngoại bào. Các enzyme ngoại bào, đặc biệt là laccase do nấm sinh ra có tính đặc hiệu cơ chất thấp nên chúng có

khả năng phân hủy được rất nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau, do đó chúng được ứng dụng cao trong các ngành công nghiệp (Dessai *et al.*, 2011). Cho đến nay, các nghiên cứu về phân hủy sinh học các hợp chất hữu cơ khó phân hủy và thuốc nhuộm chủ yếu tập trung vào nấm đảm như *Phanerochaete chrysosporium* (Cameron *et al.*, 2000), *Trametes versicolor* (Cheong *et al.*, 2006), *Pseudotrametes gibbosa* (Gao *et al.*, 2010). Các nghiên cứu về phân hủy PAH, loại màu thuốc nhuộm trên nấm sợi chưa nhiều và chủ yếu tập trung vào khả năng sinh tổng hợp laccase của chúng

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào laccase của nấm được phân lập từ rừng (Đặng Thị Thu *et al.*, 2009) và khả năng phân hủy PAH, loại màu thuốc nhuộm của nấm sợi được phân lập từ đất nhiễm dioxin đã được công bố (Nguyễn Nguyễn Quang *et al.*, 2010). Báo cáo này trình bày các kết quả về khả năng sinh tổng hợp laccase, phân hủy PAH và loại màu thuốc nhuộm của chủng nấm sợi FCP3 được phân lập từ rừng Quốc gia Cúc Phương.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Sáu chủng nấm sợi FCP1, FCP2, FCP3, FCP4, FCP5, FCP6 được lấy từ bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Việt Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Hai PAH được sử dụng là anthracene và pyrene có bước sóng hấp thụ cực đại ( $\lambda_{max}$ ) lần lượt là 205 và 217 nm.

Các chất màu được sử dụng thuộc nhóm màu azo bao gồm NY1 ( $\lambda_{max}$  520 nm), NY7 ( $\lambda_{max}$  499 nm) và anthraquinone bao gồm NY3 ( $\lambda_{max}$  595 nm), NY5 ( $\lambda_{max}$  600 nm), RBBR- Remazol Brilliant Blue R ( $\lambda_{max}$  595 nm).

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường Vis (*Viswanath et al.*, 2008).

### Sàng lọc chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp laccase

Sáu chủng nấm FCP1, FCP2, FCP3, FCP4, FCP5, FCP6 được nuôi lắc đồng thời trên môi trường Vis ở 200 vòng/phút, nhiệt độ 30°C. Hoạt tính laccase của các chủng nấm được xác định sau 4 ngày nuôi cấy

### Phương pháp xác định hoạt tính enzyme laccase

Hoạt tính laccase được xác định dựa trên sự oxy hóa ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) của enzyme laccase tạo thành hợp chất hấp thụ ở bước sóng 420 nm ( $\lambda_{420} = 36.000 M^{-1}.cm^{-1}$ ) ở điều kiện thí nghiệm (*Eggert et al.*, 1996) Hỗn hợp phản ứng (1 ml) gồm 600  $\mu$ l đệm natri axetat pH3, 200  $\mu$ l ABTS (2,5 mM) và 200  $\mu$ l dịch enzyme. Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1  $\mu$ M sản phẩm từ ABTS trong thời gian 1 phút, ở điều kiện thí nghiệm.

### Phân loại chủng nấm

Chủng nấm có khả năng sinh laccase cao được phân loại theo phương pháp truyền thống dựa vào khóa phân loại đến lớp của Samson (1984) và phương pháp xác định trình tự gen mã hóa 18S rRNA với các chủng nấm đã được công bố trên Genbank. Cặp mồi EF4F: 5'-GGAAGGG(G/A)TGTATTTATTAG-3' và Fung5R 5'-GTAAAGTCCTGGTCC - 3' được sử dụng để khuếch đại đoạn gen mã hóa 18S rRNA từ DNA tổng số của chủng nấm nghiên cứu. Sản phẩm DNA sau khi được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR được làm sạch bằng kit QIAGEN Sản phẩm PCR sau

khí tinh sạch được xác định trình tự trực tiếp bằng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Data Collection V1.0 và Sequencing Analysts. Sử dụng các phần mềm Clustal X, NJ tree và Bioedit để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng nấm nghiên cứu.

### Nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh tổng hợp laccase của chủng nấm FCP3

Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy như pH, chất cảm ứng, nguồn carbon và nguồn nitrogen đến khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng FCP3 đã được tiến hành.

### Đánh giá khả năng phân hủy PAH của tế bào nấm và dịch enzyme thô của chủng FCP3

Sau 6 ngày nuôi cấy trên môi trường Vis có chứa anthracene và pyrene với nồng độ 100 mg/l, dịch nuôi cấy nấm sợi FCP3 (20 ml) được chiết bằng 180 ml cồn tuyệt đối sau đó lọc, thu dịch lọc để phân tích nồng độ PAH có trong dịch. Khả năng loại bỏ PAH của chủng nấm sợi được xác định theo phương pháp đo quang phổ hấp thụ UV-VIS.

Để đánh giá khả năng phân hủy PAH của dịch enzyme thô, hỗn hợp phản ứng bao gồm 8 ml dịch enzyme thô (hoạt tính 1200 U/l) + 12 ml đệm axetat (20 mM, pH 3) + anthracene hoặc pyrene (nồng độ cuối là 100 mg/l) được chuẩn bị. Mẫu đối chứng không chứa dịch enzyme mà thay thế bằng môi trường nuôi cấy. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 30°C trong 24 giờ.

### Đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch enzyme thô

Dịch enzyme thô có hoạt tính 1200 U/l được sử dụng trong thí nghiệm này. Thể tích phản ứng là 5 ml gồm: đệm axetat (20 mM, pH 3) + thuốc nhuộm + 2 ml dịch enzyme thô. Nồng độ của các màu azo là 100 mg/l, các màu anthraquinone là 200 mg/l. Sự giảm màu của hỗn hợp phản ứng được phân tích theo thời gian và được đo tại  $\lambda_{max}$  của mỗi màu. Sự loại màu được xác định bằng phản ứng hấp thụ của chất khử bằng công thức của Khelifi và đồng tác giả (2009).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Sàng lọc chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp laccase

Sáu chủng nấm FCP1, FCP2, FCP3, FCP4, FCP5, FCP6 đều có khả năng tạo màu nâu đỏ trên

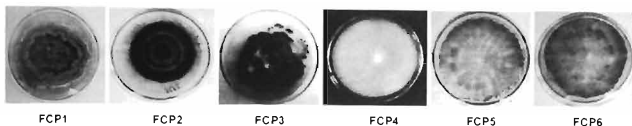
môi trường Vis có chứa guaiacol sau 6 ngày nuôi cấy (Hình 1). Điều đó chứng tỏ chúng có khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào thuộc nhóm peroxidase (MnP, LiP) hoặc oxidoreductase (laccase).

Để sàng lọc chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp laccase, sáu chủng nấm trên được nuôi cấy ở 30 °C, 200 vòng/phút trên môi trường Vis. Sau 4 ngày, khả năng sinh laccase của các chủng này đã được xác định. Hoạt tính laccase của 6 chủng nấm được trình bày ở bảng 1.

Từ bảng 1 ta thấy, 3 trong số 6 chủng nghiên cứu có khả năng sinh tổng hợp laccase trên môi trường Vis, trong đó chủng FCP3 có hoạt tính

laccase đạt 11,7 U/l cao hơn so với 2 chủng còn lại. Vì vậy, chủng FCP3 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hiện nay, khả năng sinh tổng hợp laccase trên đối tượng nấm sợi như *Trichoderma viride* (Verma *et al.*, 2007), *Penicillium yochrochloron* MTCC 517 (Shedbalkar *et al.*, 2008) đã được ghi nhận. Gao và đồng tác giả (2010) đã chứng minh khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng nấm *P. gibbosu* phân lập từ rừng ở phía Bắc Trung Quốc, Ở Việt Nam, Đăng Thị Thu và đồng tác giả (2009) cũng đã phân lập chủng nấm mốc RCP02\_5 từ rừng Cúc Phương có hoạt tính 112,9 U/ml khi sử dụng cơ chất là syringaldazine theo phương pháp của Harkin (1973).



Hình 1. Sinh trưởng của các chủng nấm trên môi trường Vis chứa guaiacol.

Bảng 1. Hoạt tính laccase của các chủng nấm trên môi trường Vis.

Chủng nấm	FCP1	FCP2	FCP3	FCP4	FCP5	FCP6
Hoạt tính laccase (U/l)	8,7		11,7		4,3	

### Phân loại và định tên chủng nấm FCP3

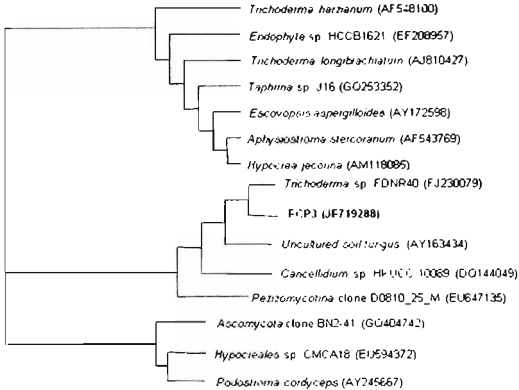
Chủng FCP3 có khuẩn lạc mọc lan rộng, khuẩn ty khí sinh dạng sợi màu trắng, bào tử màu xanh đậm. Dưới kính hiển vi quang học, sợi nấm có dạng sợi phân nhánh, bào tử đính. Dựa vào khóa phân loại của Samson RA (1984), chủng FCP3 có thể được xếp vào ngành nấm nang *Ascomycetes*, chi *Trichoderma*. Để làm rõ các kết quả phân loại truyền thống, một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA của chủng FCP3 đã được xác định với kích thước 514 nucleotit và có mức độ tương đồng 99% với các chủng *Trichoderma* sp. 407/LP2, *Trichoderma* sp. 857/LP1, *Trichoderma* sp. FDN40 và *Cancellidium* sp. HKUCC 10089. Trình tự gen mã hóa 18S rRNA của chủng FCP3 đã được đăng ký trên Genbank với mã số JF719288. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của chủng FCP3 với một số chủng vi nấm đã được xây dựng và được trình bày ở hình 2.

Từ hình 2 ta thấy FCP3 rất gần gũi với chủng nấm *Trichoderma* sp. FDNR40, tiếp đó là *Uncultured soilfungus*, *Cancellidium* sp. HKUCC 10089, *Pezzizomycotina* clone D0810\_25\_M. Trong đó, chủng nấm *Trichoderma* sp. FDNR40 phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Đà Nẵng đang trong quá trình xử lý khử độc bằng bioreactor hiệu khí đã được chứng minh là có hoạt tính laccase là 1,27 U/l (Đăng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2010). Các chủng nấm còn lại chưa được công bố về khả năng sinh tổng hợp laccase. Tuy nhiên, theo một số nghiên cứu đã được công bố, nhiều chủng nấm thuộc chi *Trichoderma* có khả năng sinh tổng hợp laccase và phân hủy PAH Dhoub và đồng tác giả (2010) đã phát hiện được chủng *T. autroviride* CTM 10476 có hoạt tính laccase tới 9005 U/l. Trong khi đó, Kiiskinen và đồng tác giả (2004) đã phân lập 3 chủng *Trichoderma* khác là *T. autroviride* LLP16, *T.*

*autroviride* LLP21 và *T. harzianum* LLP19 có khả năng sinh laccase với hoạt tính khác nhau. Chúng nấm sợi *T. harzianum* WL1 đã được nghiên cứu và ứng dụng trong việc loại màu thuốc nhuộm như Rhodamine 6G, Erioglaucine và màu xanh Trypan (Sadhasivam *et al.*, 2008). Các minh chứng trình bày ở trên cho thấy một số đại diện của chi *Trichoderma*

phân lập từ các nguồn khác nhau đã được khẳng định có khả năng sinh tổng hợp laccase.

Như vậy, dựa vào một số đặc điểm hình thái và một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA, chủng FCP3 có thể được xếp vào chi *Trichoderma* và được đặt tên là *Trichoderma* sp. FCP3.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của chủng nấm sợi FCP3.

## Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng FCP3

### Ảnh hưởng của pH

Khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng nấm FCP3 trên môi trường Vis có pH từ 5 đến 8 đã được khảo sát. Hoạt tính laccase của chủng này đã được xác định sau 4 ngày nuôi cấy (Hình 3).

Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng nấm FCP3 có khả năng sinh trưởng tốt trong khoảng pH từ 5 đến 7,5 nhưng hoạt tính laccase của chủng FCP3 đạt cực đại là 22,2 U/l ở pH 5,5 (Hình 3).

Theo một số nghiên cứu, nấm sợi có khả năng sinh trưởng và sinh enzyme laccase tốt trong môi trường axit yếu như chủng *T. harzianum* WL1 sinh trưởng và sinh enzyme tốt ở pH 4,5 (Sadhasivam *et al.*, 2009), chủng *Aspergillus* sp. FDN20 sinh trưởng

và sinh enzyme tốt ở pH 6, chủng *Aspergillus terreus* FDN41 sinh trưởng và sinh enzyme tốt ở pH 6,5 (Hoàng Thị Mỹ Hạnh *et al.*, 2004) và chủng *Aspergillus* sp. FNA1 sinh trưởng và sinh enzyme tốt ở pH 5 (Đào Thị Ngọc Ánh, Đặng Thị Cẩm Hà, 2009).

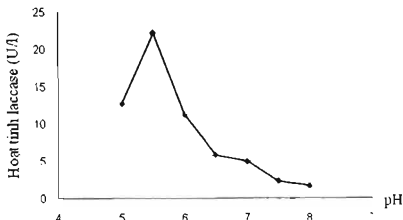
Như vậy, pH 5,5 là pH thích hợp cho FCP3 sinh tổng hợp laccase trên môi trường Vis và pH này được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

### Ảnh hưởng của chất cảm ứng

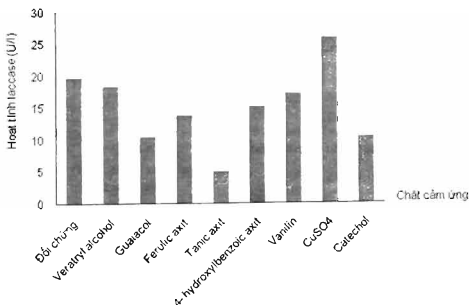
Các chất cảm ứng ảnh hưởng quan trọng đến khả năng sinh tổng hợp laccase của vi sinh vật. Các nguồn chất cảm ứng này bao gồm các amino axit, các hợp chất thơm, các chất chiết từ thực vật và Cu<sup>2+</sup> (Dessai *et al.*, 2011). Nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số chất cảm ứng lên khả năng sinh

tổng hợp laccase của chủng FCP3, các chất cảm ứng đã được bổ sung vào môi trường bao gồm: veratryl alcohol, guaiacol, ferrulic axit, tannic axit, 4-hydroxybenzoic axit, vanilin,  $\text{CuSO}_4$  và catechol

với nồng độ 1 mM. Mẫu đối chứng là mẫu không bổ sung chất cảm ứng. Ảnh hưởng của các chất cảm ứng đến hoạt tính laccase của chủng FCP3 được trình bày ở hình 4.



Hình 3. Khả năng sinh laccase của chủng FCP3 ở các pH khác nhau



Hình 4. Khả năng sinh laccase của chủng FCP3 trên một số chất cảm ứng

Từ hình 3 ta thấy hầu hết các chất cảm ứng đều làm giảm khả năng sinh laccase của FCP3, đặc biệt là axit tannic, hoạt tính laccase của chủng FCP3 trong điều kiện này chỉ đạt 5 U/l. Chỉ có  $\text{CuSO}_4$  làm tăng khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng FCP3 lên 32% so với mẫu đối chứng không bổ sung chất cảm ứng.

Theo nghiên cứu của Xiao và đồng tác giả (2007), chủng nấm *T. harzianum* WLI có hoạt tính laccase đạt 4.36 U/ml khi bổ sung 1 mM  $\text{CuSO}_4$  vào môi trường nuôi cấy. Trong khi đó hoạt tính laccase của *Trametes* sp AH28-2 đạt cực đại 504 U/l với chất cảm ứng O-toluidine và đạt 287 U/l với chất cảm ứng là guaiacol (nồng độ của mỗi chất cảm ứng

là 1 mM). Hoạt tính laccase của chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. FNA1 đạt 11,04 U/l với chất cảm ứng  $\text{CuSO}_4$  1 mM trong khi chỉ có 2,8 U/l với veratryl alcohol nồng độ 1% (Đào Thị Ngọc Ánh, Đặng Thị Cẩm Hà, 2009)

#### Ảnh hưởng của nguồn carbon

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự sinh tổng hợp laccase, chủng nấm FCP3 được nuôi cấy trên môi trường có các nguồn carbon khác nhau với hàm lượng 10 g/l. Khả năng sinh laccase của chủng FCP3 trên một số nguồn carbon như glucose, malt, maltose, sacchrose, tinh bột đã được xác định sau 4 ngày nuôi cấy. Hoạt tính laccase của chủng FCP3 trên một số nguồn carbon khác nhau liệt kê ở trên được trình bày ở hình 5.

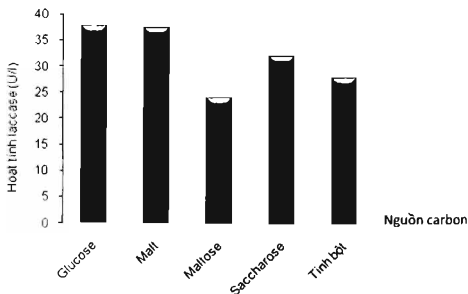
Từ hình 5 ta thấy chủng FCP3 có hoạt tính laccase từ 24,8 đến 37,9 U/l, trong đó trên nguồn glucose đạt 37,9 U/l và cao malt đạt 37,5 U/l. Tuy hoạt tính laccase của chủng FCP3 trên hai nguồn carbon này tương đương nhau nhưng do giá thành của glucose rẻ hơn nên glucose được lựa chọn là nguồn carbon cho các nghiên cứu tiếp theo. Đây là một trong các tiêu chí lựa chọn khi sử dụng vi sinh vật và enzyme của nó để xử lý loại màu thuốc nhuộm hay phân hủy PAH.

Theo một số nghiên cứu đã công bố, glucose là một trong các nguồn carbon thích hợp cho sinh tổng hợp laccase ở nấm (Levasseur *et al.*, 2010). Hoạt tính laccase của nấm *Pleurotus sajor-caju* đạt 37 U/ml trên môi trường chứa glucose, cao hơn

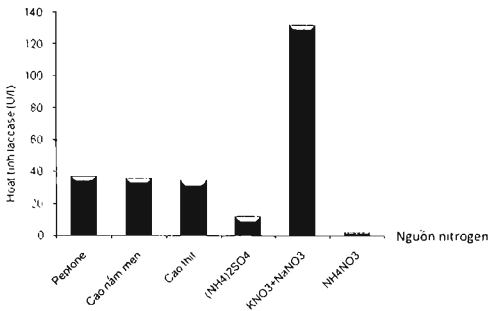
nhều so với hoạt tính của nó trên môi trường chứa lactose (3 U/ml). Hai nấm sợi *T. viride* và *T. longibrachiatum* đều có khả năng sinh laccase tốt trên cả 3 nguồn carbon là glucose, saccharose và CM-cellulose (Levasseur *et al.*, 2010). Trong khi đó, một số chủng lại sinh tổng hợp laccase tốt ở các nguồn carbon khác như chủng *Aspergillus* sp. FNA1 thích hợp với nguồn saccharose để tổng hợp laccase với hoạt tính 22 U/l (Đào Thị Ngọc Ánh, Đặng Thị Cẩm Hà, 2009) còn chủng *Aspergillus* sp. FBH11 thích hợp với nguồn cao malt với hoạt tính laccase đạt 1496 U/l (Nguyễn Nguyễn Quang *et al.*, 2010). Những minh chứng ở trên cho thấy rằng, mỗi chủng vi sinh vật đều có khả năng sinh laccase cao trên một nguồn carbon nhất định. Trong nghiên cứu này, glucose vừa giúp chủng FCP3 sinh tổng hợp laccase cao vừa có giá thành thấp hơn so với một số nguồn carbon khác, do đó glucose có thể được sử dụng khi ứng dụng chủng nấm này vào sinh tổng hợp laccase ở quy mô lớn hơn

#### Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Ngoài carbon thì nitrogen cũng đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp laccase. Chính vì vậy, nghiên cứu khả năng sinh laccase của chủng nấm FCP3 trên một số nguồn nitrogen khác nhau đã được tiến hành. Nguồn nitrogen peptone, cao nấm men, cao thịt,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , hỗn hợp  $\text{KNO}_3$  và  $\text{NaNO}_3$  (tỷ lệ 7:3) với nồng độ 3 g/l đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Hoạt tính laccase của chủng FCP3 phân tích sau 4 ngày nuôi cấy và kết quả được trình bày ở hình 6.



Hình 5. Khả năng sinh laccase của FCP3 trên một số nguồn carbon khác nhau



Hình 6. Khả năng sinh laccase của chủng FCP3 trên các nguồn nitrogen khác nhau

Từ hình 6 ta thấy khả năng sinh laccase của chủng FCP3 đạt mức cao nhất 132 U/l trên hỗn hợp KNO<sub>3</sub> và NaNO<sub>3</sub>. Hoạt tính laccase trên hỗn hợp này cao gấp 3,5 lần so với peptone (37,4 U/l). Chủng FCP3 hầu như không sinh enzyme trên môi trường chứa NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Kết quả này tương tự như công bố của Nguyễn Nguyễn Quang (2010) về chủng nấm *Aspergillus* sp. FBH11, chủng này cũng sinh tổng hợp laccase tốt nhất (1459 U/l) trên hỗn hợp KNO<sub>3</sub> và NaNO<sub>3</sub> với tỷ lệ 7:3. Trong khi đó, hoạt tính laccase của các chủng *T. reesei* và *T. viride* đạt lần lượt là 200 và 2000 U/l khi nguồn nitrogen được sử dụng là (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> với nồng độ 0,5 g/l (Gochev et al., 2007).

Như vậy, chủng FCP3 có hoạt tính laccase cao nhất trên môi trường có chứa hỗn KNO<sub>3</sub> và NaNO<sub>3</sub> với tỷ lệ 7:3. Do đó, môi trường này được sử dụng cho nghiên cứu khả năng phân hủy PAH và loại màu thuốc nhuộm.

#### Khả năng phân hủy PAH của tế bào nấm và dịch enzyme thô của chủng FCP3

Pyrene và anthracene với nồng độ ban đầu là 100 mg/l được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy PAH của tế bào và dịch enzyme thô sinh tổng hợp bởi chủng FCP3. Khả năng phân hủy PAH của tế bào nấm FCP3 được phân tích sau 6 ngày nuôi cấy. Enzyme laccase có hoạt tính 1200 U/l đã được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy PAH sau 24 giờ ở 30°C. Hiệu suất phân hủy pyrene và anthracene

bởi tế bào và dịch enzyme thô của chủng FCP3 được trình bày ở bảng 2

Bảng 2. Khả năng phân hủy pyrene và anthracene của tế bào nấm và dịch enzyme thô của chủng FCP3

Tác nhân phân hủy	Hiệu suất phân hủy (%)	
	Pyrene	Anthracene
Tế bào sống FCP3 (sau 6 ngày nuôi cấy)	33,33	40,71
Dịch enzyme thô của FCP3 (1200 U/l)	41,03	54,17

Kết quả từ bảng 2 cho thấy, tế bào sống và dịch enzyme thô của FCP3 đều có khả năng phân hủy pyrene và anthracene với hiệu suất từ 33 đến 55%. Tuy nhiên, việc thu dịch enzyme thô tốn nhiều thời gian và chi phí nên việc sử dụng tế bào sống cố định lên vật liệu mang có thể trở thành một lựa chọn có tính khả thi hơn. Gao và đồng tác giả (2010) đã nghiên cứu khả năng phân hủy PAH của nấm *Pseudotrametes gibbosa* phân lập từ rừng ở phía Bắc Trung Quốc cho thấy vi sinh vật này có khả năng phân hủy 43,43% anthracene và 24,26% pyrene trong khi đó nấm *Pleurotus ostreatus* có khả năng phân hủy 30,12% anthracene và 18,67% pyrene với nồng độ ban đầu của mỗi chất là 5 mg/l.

Các nghiên cứu ở Việt Nam về khả năng phân

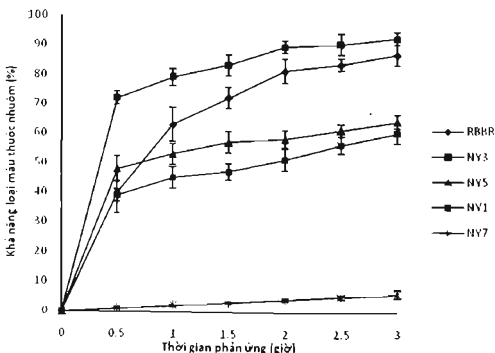
hủy PAH của một số chủng vi sinh vật phân lập từ đất xử lý tẩy độc đất nhiễm chất độc hóa học đã cho thấy chúng nấm sợi *Aspergillus* FDN22 nuôi lắc ở 200 vòng/phút trên môi trường có bổ sung 0,05% glucose ở 30°C có khả năng loại bỏ được 88% fluoranthene, 90,16% phenanthrene; 91,27% anthracene với nồng độ ban đầu tương ứng là 36, 400 và 50 mg/l so với mẫu đối chứng không có vi sinh vật (Nguyễn Thanh Thủy et al., 2006). Chủng XKDNR1 có khả năng phân hủy 31,32% anthracene và 40% fluoranthracene với nồng độ mỗi chất ban đầu 50 mg/l sau 10 ngày nuôi cấy (Nguyễn Bá Hữu et al., 2010). Như vậy, chủng nấm sợi FCP3 có khả năng phân hủy pyrene và anthracene tốt hơn so với các chủng đã kể trên. Do đó chủng FCP3 có tiềm năng ứng dụng vào quy trình xử lý PAH và thuốc nhuộm.

#### Khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch enzyme thô sinh ra từ chủng FCP3

Thuốc nhuộm được sử dụng để đánh giá khả năng loại màu bởi dịch enzyme thô của FCP3 bao gồm: NY1, NY3, NY5, NY7 và RBBR. Khả năng loại màu của dịch enzyme thô được đo trong 3 giờ. Hiệu suất loại màu thuốc nhuộm của dịch enzyme thô được trình bày ở hình 7.

Từ hình 7 ta thấy, dịch enzyme thô của chủng FCP3 có khả năng loại bỏ 91,9% NY3 và 86,4% RBBR nhưng chỉ loại bỏ được 6% màu NY7. NY1 và NY5 cũng bị loại bỏ lần lượt là 60 và 63,9%.

Theo nghiên cứu của Shedbalkar và đồng tác giả (2008), loài nấm sợi *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 loại bỏ được 93% màu xanh cotton (50 mg/l) trong vòng 2,5 giờ dưới điều kiện tĩnh tại pH 6,5 và nhiệt độ 25°C. Các nấm *T. viride* và *T. lurizianum* loại từ 40-50 % màu của mật rỉ đường (Scyris et al., 2009). Laccase từ loài *Trametes versicolor* CCT-4521 được cố định trên vật liệu hấp phụ IRA-400 làm tăng khả năng làm phai màu thuốc nhuộm RBBR 70% so với các vật liệu thông thường trong thời gian 30 phút (Patricio et al., 2003). Chủng nấm trắng *Trametes* sp. S001 loại màu thuốc nhuộm azo và RBBR lên tới 97 - 99% sau 7 ngày nuôi cấy (Yang et al., 2009). Laccase thô từ loài nấm trắng *Pleurotus pastoris* GS115 với hoạt tính ban đầu 600 U/l có khả năng loại bỏ RBBR từ 30% đến 100% khi có mặt  $Cu^{2+}$  trong môi trường phản ứng sau khoảng 30 phút (Hu et al., 2007). Chủng FBH11 phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học/dioxin của sân bay Biên Hòa có khả năng loại bỏ 85,34% màu NY1 sau 72 giờ, 77,98% màu NY5 sau 96 giờ với hoạt tính ban đầu 100 mg/l (Nguyễn Nguyễn Quang, Đặng Thị Cẩm Hà, 2009).



Hình 7. Khả năng loại màu một số thuốc nhuộm của dịch enzyme thô của chủng FCP3 theo thời gian



## KẾT LUẬN

Chung nấm FCP3 được phân lập từ rừng Quốc gia Cúc Phương có khả năng sinh tổng hợp laccase với hoạt tính ban đầu là 11,7 U/l. Chung này có khả năng sinh tổng hợp laccase cao ở pH 5,5. Trong môi trường có 1 mM CuSO<sub>4</sub>; 10 g/l glucose; 3 g/l hỗn hợp KNO<sub>3</sub> và NaNO<sub>3</sub> (tỷ lệ 7:3). Chung nấm sợi FCP3 có khả năng phân hủy 33,33% pyrene và 40,71% anthracene sau 6 ngày nuôi cấy. Laccase thô của FCP3 có khả năng phân hủy 41,03% pyrene và 54,17% anthracene sau 24 giờ ở 30°C và loại được 91,94% màu NY3; 86,44% màu của RBBR. 63,93% màu NY5; 60,01% màu NY1 và chỉ 6% màu NY7. Bảng phương pháp phân loại truyền thống kết hợp với một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA, chung nấm sợi FCP3 được xếp vào chi *Trichoderma* với tên là *Trichoderma* sp FCP3

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài: "Nghiên cứu công nghệ sản xuất enzyme ngoại bào laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase (MnP, LiP) từ vi sinh vật phục vụ xử lý các chất ô nhiễm đa vòng thơm".

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cameron MD, Timofeevskii S, Aust D (2000) Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics *Appl Microbiol Biotechnol* 54(6): 751-758.

Cheong S, YeoS, Song HG, Choi HT (2006) Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor* *Microlbiol Res* 161(4): 316-320.

Dessai SS, Nityanand C (2011) Microbial laccases and their applications: a review. *Asia J Biotechnol* 3: 98-124

Dhouib A, Chakroun H, Mechichi T, Martinez MJ, Sayadi S (2010) Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*. Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochem* 45(4) 507-513.

Đào Thị Ngọc Ánh, Đặng Thị Cẩm Hà (2009) Khả năng phân hủy DDT của chung nấm sợi FNA1 phân lập từ đất nhiễm hỗn hợp thuốc trừ sâu tại Nghệ An *Tap chi Khoa học và Công nghệ Thái Nguyên* 57(9):46-51.

Đặng Thị Cẩm Hà, Trần Thị Như Hòa, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Nguyễn Quang, Đàm Thúy Hằng, Nguyễn Quang Huy (2010) Phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và sinh tổng hợp peroxidase, laccase của chủng vi khuẩn BDNR10 và chung nấm sợi FDNR40 *Tap chi Dục học* 8-13.

Đặng Thị Thu, Tô Thị Kim Anh , Lê Quang Hòa, Lê Hồng Nga (2009) Nghiên cứu phân lập, sàng lọc, tuyển chọn nấm mốc sinh tổng hợp laccase từ rừng tự nhiên Việt Nam *Báo cáo Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc: Công nghệ sinh học phục vụ nông - lâm nghiệp, thủy sản, công nghiệp, y - dược và bảo vệ môi trường*, Thái Nguyên, 26-27/11/2009. 376-380

Eggert C, Temp U, Eriksson E (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase *Appl Environ Microbiol* 60(2) 1151-1158.

Fetzer JC (2000) The chemistry and analysis of the large polycyclic aromatic hydrocarbons *Polycyclic Aromatic Compd* 27(2): 143-149

Gao D, Jiang H, Du L, Chen J (2010) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibbosa* isolated from the boreal forest in Northeast China. *Appl J Biotechnol* 9(4): 6888-6893.

Gochev VK, Krastanov AI, Bulg J (2007) Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. *Bulg J Agri Sci* 13: 171-176

Harkin JM, Obst JR (1973) Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia* 29(4): 381-508

Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thanh Thủy, Ngô Xuân Quý, Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2004) Khả năng phân hủy 2,4- D và dibenzofuran của chung nấm sợi FDN20 *Tap chi Công nghệ Sinh học* 2(4):517-528.

Hu MR, Chao YP, Zhang GQ, Xue JQ, Qian S (2007) Laccase-mediator system in the decolorization of diVerent types of recalcitrant dyes *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(1): 45-51.

Kheliif E, Ayed L, Bouallagui H, Touhami Y, Hamdi M (2009) Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alluceus* strain 121C. *J Hazard Mater* 163(2-3): 1056-1062

Kiiskinen LL, Ratto M, Kruus K (2004) Screening for novel laccase-producing microbes *J Appl Microbiol* 97(3): 640-646.

Lavasueur A, Saloheimo M, Navarro D, Andberg M, Pontarotti P, Kruus K, Record E (2010) Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the Ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and producing *Trichoderma*. *Bulg J Agri Sci* 13: 171- 176

Nguyễn Bá Hữu, Lê Thị Thu Hằng, Nguyễn Nguyễn Quang, Nguyễn Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2010) Phân hủy các hợp chất vòng thơm và sinh enzyme laccase của chung xạ khuẩn XKDNR1 *Tap chi Khoa học và Công nghệ* 48.

Nguyễn Nguyễn Quang, Nguyễn Thị Lệ, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2010) Phân hủy sinh học các hợp chất vòng thơm và thuốc nhuộm của chủng nấm sợi FB111 phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/đioxin tại điểm nóng Biên Hòa. *Hội nghị Khoa học Kỹ thuật 35 năm thành lập Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, Hà Nội, 2010; 392-398

Nguyễn Thanh Thụy, Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2006) Nghiên cứu phân loại và khả năng phân hủy chất độc của chủng nấm sợi FDN22 phân lập từ đất xử lý nhiễm chất độc hóa học. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(1), 125-132.

Patrieto PZ, Cláudia MP, Elaine RLT, Sandra GM, Maria AR, Rosana CM, Nelson D (2003) Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Appl Catal B Environm* 42(2) 131-144

Roslil M (2006) Development of biological treatment system for reduction of COD from textile wastewater. *Master Dissertation*, University Technology Malaysia

Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K (2009) Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* W.L. laccase. *W J Microbiol Biotechnol* 25(10): 1733-1741.

Sen S, Demirel GN (2003) Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. *Water Res* 37: 1868-1878

Seys I, Subastoglu T (2009) Screening of different fungi for decolorization of molasses. *Braz J Microbiol* 40(6): 651: 1517-8382

Shedbalkar U, Dhanve R, Jadhav J (2008) Biodegradation

of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *J Hazard Mater* 157: 472-479.

Tychanowicz GK, Souza DF, Souza CGM, Kadowaki MK, Peralta RM (2006) Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Braz Arch Bio Technol* 49(5): 699-704

Van Elsas JD, Duarte GF, Keijer-Wolter A, Smit E (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 43(2): 133-151

Verna M, Brar SK, Tyagi RD, Sahai V, Prévost D, Valéro J R, Surampalli RY (2007) Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: Rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzym Microbiol Technol* 6(7): 764-771

Viswanath B, Chandra MS, Kumar KP, Reddy BR (2008) Production and purification of laccase from *Stereum ostrea* and its ability to decolorize textile dyes. *Dyn Bioche Process Biotechnol Mol Biol* 2: 19-25

Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shil Y, Xiao YZ, Wu J, Hong YZ, Wang YP (2007) Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme genes from *Trametes* spp. AH 28-2 and analyses of their differential expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 493-501

Yang XQ, Zhao XX, Liu CY, Zheng Y, Qian SJ (2009) Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochem* 44(10) 1185-1189.

## SCREENING FUNGI FOR LACCASE SYNTHESIS AND DEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON AND DECOLOURIZATION

Hoàng Thị Nhung, Nguyễn Quang Huy, Đinh Thị Thu Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà\*

*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Laccases are multicopper oxidoreductases that catalyze the oxidation of various substituted phenolic compounds. Laccases are widely distributed in higher plants and fungi. The ability of the laccases to act on a wide range of substrates has made them very important in many of the biotechnological applications. Fungi are now gained more and more attention because of their high potential for laccase synthesis. They were isolated from many different sources such as water, soil and wood. To estimate synthesis of laccase and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dye decolorization of fungi on different environments including forest, this study was conducted. In this study, FCP3 fungal strain from Cuc Phuong National Forest was screened for laccase synthesis with initial activity 11,7 U/l in the Vis medium. FCP3 strain gave the highest laccase in the medium with pH 5.5; 1 mM CuSO<sub>4</sub> as an inducer, 10 g/l glucose as a carbon source and 3 g/l mixture of KNO<sub>3</sub> and NaNO<sub>2</sub> as nitrogen sources. The degradation of anthracene and pyrene induced by FCP3 live cells were 33 and 41%, respectively and crude enzyme extracted from FCP3 were 41% and 54%, respectively (initial

\* Author for correspondence Tel: +84-4-38360892, Fax: +84-4-38363144, E-mail: dangcha80@yahoo.com

concentration of each PAH was 100 mg/l). Moreover, the crude enzyme extracted from FCP3 was able to decolour a variety of textile dyes: 92% NY3, 86% RBBR, 64% NY5, 60% NY1 and 6% NY7. Based on traditional method and determination of partial sequence of 18S rRNA gene, FCP3 strain was classified in genus *Trichoderma* and named *Trichoderma* sp FCP3.

**Keywords:** biodegradation, dyes, laccase, PAH, *Trichoderma*