

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM MỐC SINH TỔNG HỢP ENZYME LACCASE TỪ GỖ MỤC

Trịnh Thu Thủy^{1*}, Nguyễn Văn Giang¹, Nguyễn Ngọc Bằng², Phạm Thu Trang¹

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

²*Khoa Chăn nuôi và Nuôi trồng thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: ttthuy@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 28.01.2015

Ngày chấp nhận: 09.10.2015

TÓM TẮT

Laccase là một enzyme nằm trong hệ enzyme lignolytic có khả năng oxy hóa mạnh diphenol và các hợp chất có liên quan, do đó thường được ứng dụng rộng rãi trong xử lý phụ phẩm nông nghiệp và nguồn nước thải ô nhiễm. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có hoạt tính laccase từ các mẫu gỗ mục trong tự nhiên. Nhiều mẫu gỗ mục ở các địa phương khác nhau được thu thập và từ các mẫu gỗ mục này, các chủng nấm mốc phân lập, nuôi cấy và làm thuần. Sau đó các phương pháp sàng lọc định tính và xác định hoạt độ enzyme laccase (U/ml) được áp dụng để chọn ra những chủng nấm mốc có hoạt độ laccase cao nhất phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả nghiên cứu đã phân lập, nuôi cấy và mô tả được đặc điểm hình thái (khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử) của 5 chủng nấm mốc có kí hiệu là BN1, BN2-1, BN2-2, DA3-1 và BV1 có hoạt độ enzyme laccase (kí hiệu là E) dao động từ 1.480 - 24.720 U/ml. Trong các chủng này, chủng BV1 là chủng có E cao nhất (24.720 U/ml) và có tỷ lệ hoạt lực enzyme trên khối lượng khô sau 5 ngày nuôi cấy (E/mg) cao nhất (54,04 U/mg). Chủng BV1 sơ bộ được xếp vào chi *Meruliporia* sp.

Từ khóa: Chủng nấm mốc, enzyme laccase, hoạt độ, phân lập, syringaldazine.

Isolation and Screening of Wood Decaying Fungi Producing Laccase

ABSTRACT

Laccase enzyme is a multicopper enzyme of the lignolytic enzyme system which has capability to oxidize diphenol and related compounds. It is widely used in processing of agricultural by-products and in water treatment. This study was conducted to isolate and screen fungal strains which have laccase activity from the natural decaying wood samples. Samples of decayed woods were collected from different locations and the fungi were isolated, cultured and purified. Test for presence of laccase and enzyme activity were used to screen laccase-producing fungi strains with the high laccase activity. Five fungal strains, designated as BN1, BN2-1, BN2-2, DA3-1 and BV1 were isolated, cultured and morphologically described (colonies, mycelium and spores). These strains showed high laccase activity with BV1 expressing highest activity (247.20 U/ml) and highest rate of enzyme activity per dry weight after 5 days of culture (E/m, 54.04 U/mg). BV1 strain was tentatively classified as a species of the genus *Meruliporia*.

Keywords: Enzyme activity, wood-decaying fungi, laccase.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc sử dụng enzyme trong sản xuất và đời sống ngày càng được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và thực tế cho thấy chế phẩm enzyme đang được sử dụng phổ biến ở nhiều nước đã mang lại lợi ích kinh tế khá lớn, đặc biệt là các

enzyme có khả năng phân hủy các hợp chất thơm đa vòng. Điển hình trong số đó là enzyme laccase.

Laccase, một enzyme nằm trong hệ enzyme lignolytic và là một polyphenol oxydase, do đó có khả năng oxy hóa diphenol và các hợp chất có liên quan. Ưu điểm vượt trội của laccase là có tính oxy hóa mạnh và sử dụng oxy phân tử làm

chất nhận điện tử, vì vậy ó thể nghiên cứu để đưa enzyme này vào ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp, trong xử lý phụ phẩm nông nghiệp và nguồn nước thải ô nhiễm. Laccase còn được biết đến như một enzyme thân thiện với môi trường do trong phản ứng laccase chỉ cần lấy oxy từ không khí và sản phẩm phụ duy nhất tạo thành sau phản ứng là nước (Sergio, 2006).

Laccase có thể được thu từ các nguồn khác nhau như nấm mốc, thực vật, vi khuẩn, côn trùng nhưng phổ biến nhất là nấm mốc. Hiện nay nhiều chủng nấm sợi đã được phát hiện cho thấy khả năng tổng hợp laccase rất tốt như: *Trametes versicolor* (Bourbonnais et al., 1995), *Melanocarpus albomyces* (Laura and Kiiskinen, 2005), *Trametes modesta* (Nyanhongo et al., 2002). Hơn nữa, nấm mốc có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh nên thuận lợi rất nhiều cho việc sản xuất laccase ở quy mô lớn phục vụ trong công nghiệp và đời sống.

Trong những năm gần đây, laccase được ứng dụng trên nhiều lĩnh vực khác nhau như tẩy trắng bột giấy, tẩy màu thuốc nhuộm vải, chế biến thực phẩm thông qua việc đưa vào các quy trình xử lý sinh học (Kunamneni et al., 2007). Ngoài ra, Laccase còn được sử dụng trong tổng hợp chất hữu cơ, xử lý các nguồn nước thải bị ô nhiễm bằng việc loại bỏ các hợp chất phenol; xử lý phụ phẩm nông nghiệp để tạo nguyên liệu cho các quá trình khác. Phổ ứng dụng của laccase được mở rộng bằng việc kết hợp laccase với các mediator (chất trung gian) làm chúng có khả năng oxy hóa những hợp chất không có bản chất phenol (non-phenol).

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có nguồn gốc từ gỗ mục trong tự nhiên có hoạt tính laccase, nhằm tạo ra một lượng lớn enzyme laccase dùng để xử lý hợp chất lignin từ các phụ phẩm của ngành nông nghiệp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Các mẫu gỗ mục được thu thập từ 5 địa điểm khác nhau: Đông Anh (4 mẫu), Yên Thường (4 mẫu), Thanh Hóa (2 mẫu), Bắc Ninh

(2 mẫu), Ba Vì (2 mẫu). Các mẫu gỗ được tiến hành phân lập ngay hoặc bảo quản trong tủ lạnh 4°C để tiến hành phân lập sau.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập, làm thuần và giữ giống

Phân lập sử dụng theo phương pháp pha loãng (Nguyễn Lân Dũng và cs., 2000) với môi trường PDA có bổ sung chloramphenicol (0,2%).

Sau đó làm thuần bằng cách tiếp tục cấy truyền các tản nấm trên bề mặt môi trường PDA có bổ sung chloramphenicol từ 2 - 3 lần.

Các chủng nấm mốc sau khi đã làm thuần được cấy trên môi trường giữ giống SNA theo phương pháp giữ giống trên thạch nghiêng (Nguyễn Lân Dũng, 1983).

2.2.2. Nghiên cứu đặc điểm hình thái của nấm mốc

Tiến hành quan sát trực tiếp chủng nấm mốc trên môi trường PDA bằng mắt thường và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

2.2.3. Thử định tính sự có mặt của laccase

Axit tanic là cơ chất được sử dụng để thử định tính về khả năng tổng hợp các loại enzyme phân giải lignin của các chủng nấm mốc đã phân lập được. Cấy các chủng nấm mốc thành từng điểm trên bề mặt môi trường PDA có bổ sung axit tanic (0,5%), nuôi ở 30°C trong thời gian từ 6 - 8 ngày. Quan sát sự phát triển của nấm và sự thay đổi màu sắc của khu vực môi trường nuôi xung quanh khuẩn lạc. Nếu môi trường quanh khuẩn lạc chuyển sang màu nâu hoặc nâu đen chứng tỏ có sự phân hủy axit tanic do enzyme (Harkin and John, 1973).

Các chủng sau khi đã thử và có kết quả dương tính trên cơ chất là axit tanic sẽ được chọn để tiếp tục thử với syringaldazine. Nhỏ trực tiếp dung dịch syringaldazine 1mM lên khuẩn lạc của các chủng nuôi đã chọn, ủ trong bóng tối từ 5 - 10 phút rồi tiến hành quan sát. Nếu dung dịch syringaldazine sau khi ủ chuyển từ màu vàng sang màu hồng chứng tỏ chủng nấm mốc đó có hoạt tính laccase (Faure et al., 1994).

2.2.4. Xác định hoạt độ laccase

Các chủng cho kết quả dương tính với cơ chất syringaldazine tiếp tục được chọn để xác định hoạt độ enzyme laccase. Tiến hành nuôi lacc 200 vòng/phút ở điều kiện 30°C trong môi trường sinh tổng hợp laccase, pH = 5 đối với các chủng đã chọn. Sau 5 ngày nuôi, tiến hành thu toàn bộ dịch nuôi đưa đi ly tâm 4.000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C rồi tách riêng phần dịch và phần sinh khối tế bào. Phần dịch sau ly tâm được thu để tiến hành đo OD ở bước sóng 530nm, từ đó tính hoạt độ enzyme laccase của từng chủng dựa theo phương pháp của Ride (1980).

Phần sinh khối tế bào được làm khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 80°C trong 15 giờ rồi cân trọng lượng khô (m).

Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme trong một phút tại pH = 6,5, nhiệt độ môi trường 30°C chuyển hóa được 1 μmol syringaldazine ($\epsilon = 65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Đánh giá khả năng tổng hợp enzyme để chọn chủng có hoạt tính laccase cao dựa trên 2 chỉ số:

- E càng cao thì khả năng sinh enzyme càng nhiều.
- Tỷ lệ E/m lớn cho thấy khả năng tổng hợp enzyme cao.

2.2.5. Xây dựng đường cong sinh trưởng của chủng nấm mốc phân lập được

Chủng giống nấm mốc được nuôi lacc trong môi trường Basal, pH = 5, điều kiện nhiệt độ 30°C. Mỗi ngày tiến hành thu toàn bộ dịch nuôi của 1 bình đem ly tâm, giữ lại phần sinh khối tế

bào rồi sấy khô, xác định trọng lượng khô của chủng nấm mốc trong 7 ngày nuôi (Nguyễn Lân Dũng và cs., 2000).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, làm thuần tạo bộ sưu tập các chủng nấm mốc

Các chủng nấm mốc được phân lập từ mẫu gỗ mục. Dựa trên việc quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hệ sợi, các chủng nấm mốc được tập hợp thành bộ sưu tập gồm 37 chủng (Bảng 1).

Bộ sưu tập này sẽ được dùng để thử khả năng sinh tổng hợp laccase trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Sàng lọc các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp laccase

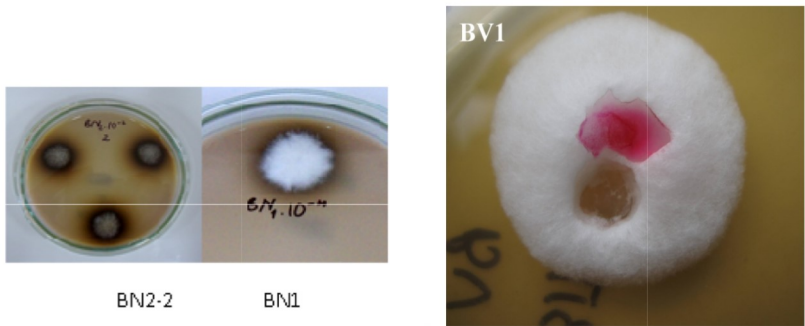
Để sàng lọc các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp laccase chúng tôi tiến hành thử định tính khả năng sinh laccase trên cơ chất là axit tanic và syringaldazine.

Kết quả thử hoạt tính cho thấy:

Với cơ chất axit tanic 0,5% thu được 12 chủng có vùng xung quanh khuẩn lạc chuyển từ màu trắng đục sang màu nâu đen. Các chủng này được cho là có khả năng sinh tổng hợp hệ enzyme lignolytic vì khi các enzyme trong hệ lignolytic được tổng hợp sẽ oxy hóa axit tanic làm xuất hiện các vùng thâm màu xung quanh khuẩn lạc (Harkin and John, 1973). Do đó, 12 chủng này được lựa chọn để tiếp tục sàng lọc hoạt tính laccase với cơ chất đặc hiệu syringaldazine.

Bảng 1. Tổng hợp số lượng các chủng nấm mốc phân lập từ các mẫu gỗ mục

Địa điểm lấy mẫu	Ký hiệu	Số lượng mẫu	Số chủng PL được
Đồng Anh	ĐA	4	15
Yên Thường	YT	4	7
Thanh Hóa	TH	2	5
Bắc Ninh	BN	2	5
Ba Vì	BV	2	5
Tổng		14	37



Hình 1. Thử định tính các chủng nấm mốc với cơ chất axit tanic và syringaldazine
Ghi chú: BN2-2, BN1: cơ chất axit tanic; BV1: cơ chất syringaldazine

Tiếp tục dùng syringaldazine để thử với 12 chủng dương tính với cơ chất acid tanic ở trên, chúng tôi chọn ra được 5 chủng cho kết quả dương với syringaldazine, biểu hiện cụ thể là khi nhỏ trực tiếp dung dịch syringaldazine lên khuẩn lạc rồi ủ 5 - 10 phút trong bóng tối quan sát thấy cơ chất từ màu vàng chuyển sang màu hồng hoặc đỏ (Faure et al., 1994). Các chủng nấm mốc có hoạt tính laccase được ký hiệu lần lượt là: BN1, BN2-1, BN2-2, ĐA3-1, BV1.

3.3. Đánh giá khả năng tổng hợp laccase của 5 chủng phân lập được

Nấm chủng nấm mốc có hoạt tính laccase được nuôi trong môi trường Basal lỏng để xác định hoạt độ enzyme. Phần sinh khối tế bào được sấy ở 80°C trong 15 giờ đến khối lượng không đổi và cân xác định khối lượng khô (m), kết quả thu được thể hiện ở bảng 2.

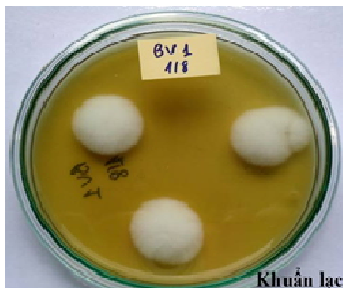
Qua số liệu ở bảng 2 ta thấy cả 5 chủng được lựa chọn đều có hoạt tính laccase dao động từ 1.480 U/ml đến 24.720 U/ml, trong đó chủng BV1 có khả năng tổng hợp laccase cao nhất đạt 24.720 U/ml sau 5 ngày nuôi cấy và lượng sinh khối thu được là 457,4 mg. Điều này được thể hiện ở khả năng sinh tổng hợp một lượng lớn enzyme laccase đồng thời có tỷ lệ E/m lớn nhất đạt 54,04 U/mg sinh khối. Từ kết quả đánh giá thu được, chúng tôi chọn chủng BV1 để tiến hành tiếp các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Sơ bộ định tên chủng BV1

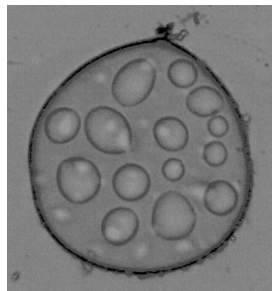
Tiến hành theo dõi quá trình sinh trưởng phát triển của chủng BV1 trên các môi trường khác nhau, kết hợp quan sát đặc điểm sợi nấm và sự hình thành bào tử của chủng BV1 dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần và 1.000 lần, thu được một số kết quả như sau:

Bảng 2. Hoạt độ enzyme laccase, trọng lượng khô và tỉ lệ hoạt độ enzyme trên sinh khối của 5 chủng nấm mốc

Chủng nấm mốc	E (U/ml)	m (mg)	E/m (U/mg)
BN1	1.602	143,8	11,14
BN2-1	12.760	893,8	14,28
BN2-2	1.480	337,9	4,38
ĐA3-1	1.571	346,7	4,53
BV1	24.720	457,4	54,04



Hình 2. Khuẩn lạc của chủng BV1



Hình 3. Bọc bào tử và bào tử chủng BV1

Đặc điểm khuẩn lạc: Khuẩn lạc trắng bóng, khuẩn ty khí sinh phát triển cao, tạo khuẩn lạc hình bán cầu, khuẩn ty cơ chất vàng nhạt, đường kính khuẩn lạc sau 4 ngày nuôi đạt 2,0cm.

Sinh trưởng trên môi trường lỏng: Sợi nấm cuộn lại tạo thành các khối tròn, xù xì có màu trắng, kích thước lớn, dịch nuôi trong.

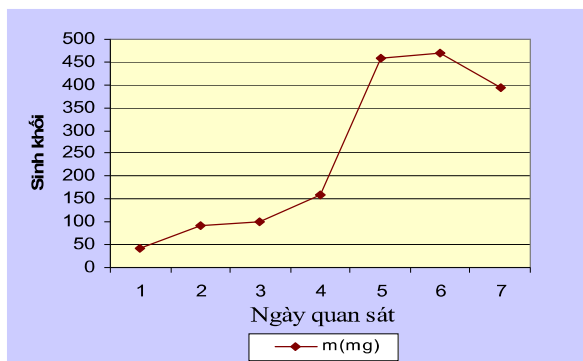
Quan sát dưới kính hiển vi quang học: Bọc bào tử hình quả chanh, có thể dính ở đầu cành hoặc bám ở nhiều vị trí khác nhau trên cành bào tử. Bào tử nhỏ, tròn, màng ngoài trơn. Sợi nấm không có vách ngăn.

Từ các kết quả thu được, dựa trên khóa phân loại nấm mốc của Katsuhiko (2002), sơ bộ xếp chủng BV1 thuộc chi *Meruliporia* sp.

3.5. Xây dựng đường cong sinh trưởng của chủng BV1

Theo dõi động thái phát triển của chủng BV1 trên môi trường sinh tổng hợp laccase Basal lỏng, lắc 200 vòng/phút, kết quả được thể hiện ở hình 4.

Dựa vào đồ thị đường cong sinh trưởng có thể thấy được chủng BV1 sinh trưởng khá tốt ở nhiệt độ 30°C, pH = 5. Pha tiềm phát (pha lag) kéo dài trong 3 ngày đầu nuôi cấy. Pha tăng trưởng bắt đầu từ ngày thứ 4 và chỉ kéo dài trong 1 ngày. Lúc này quá trình sinh trưởng của chủng BV1 tăng rất mạnh, trọng lượng khô tăng gần gấp 3 so với ngày hôm trước. Tuy nhiên, sang đến ngày thứ 5 thì chủng bắt đầu tăng trưởng chậm lại và bước vào pha cân bằng, sinh



Hình 4. Đường cong sinh trưởng của chủng nấm mốc BV1

khối tăng ít và đạt cao nhất vào ngày nuôi thứ 6 với hàm lượng 470,6mg. Pha ổn định của chủng BV1 chỉ kéo dài trong 1 ngày, sang đến ngày thứ 7, kết thúc pha ổn định, sinh trưởng của chủng giảm mạnh và bước vào pha suy vong. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với lý thuyết về sinh trưởng của vi sinh vật (Lương Đức Phẩm, 2004).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ 14 mẫu gỗ mục thu thập được ở 5 địa điểm (Ba Vì, Đông Anh - Hà Nội, Yên Thường - Hà Nội, Thanh Hóa, Bắc Ninh) chúng tôi đã phân lập được một bộ sưu tập gồm 37 chủng nấm mốc với đặc điểm hình thái khác nhau. Trong số 37 chủng nấm mốc đã sàng lọc được 5 chủng nấm mốc có hoạt tính laccase và kí hiệu là BN1, BN2-1, BN2-2, ĐA3-1 và BV1. Cả 5 chủng đã được đánh giá được đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc điểm hệ sợi và bào tử nấm. Trong số 5 chủng này đã tuyển chọn được chủng BV1 có khả năng sinh tổng hợp laccase cao thể hiện ở cả hoạt độ tổng số thu được và tỉ lệ hoạt độ trên sinh khối cao. Căn cứ vào đặc điểm hình thái, sơ bộ định tên chủng BV1 thuộc chi *Meruliporia* sp.

4.2. Đề nghị

Để khẳng định chắc chắn cần tiến hành thêm các phương pháp sinh học phân tử để định tên. Đề tài là khởi đầu cho những nghiên cứu tiếp theo về đặc tính của enzyme và khai thác khả năng ứng dụng của laccase đối với một nguồn cơ chất cụ thể.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn dự án Việt - Bỉ đã cấp kinh phí thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bourbonnais R., Paice M., Reid I., Lanthier P., Yaguchi M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1876.
- Faure D., Bouillant M.L., Bally R. (1994). Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T TnS Mutants Affecte in Melanization and Laccase Activity. *Appl. Environ. Microb.*, 60: 3413 - 3415.
- Harkin J.M., John R. (1973). Syringaldezine, an effective reagent for detecting Laccase and Peroxidase in fungi. *Experientia*, 29(4): 381 - 387.
- Katsuhiko Ando (2002). Identification of Fungi Imperfecti, NITE Biological Resource Center National Institute of Technology and Evaluation.
- Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M. (2007). Fungal laccase - a versatile enzyme for biotechnological applications. *Mendez-Vilas A. (Ed.)*, p. 233 - 245.
- Laura-Leena Kiiskinen (2005). Characteration and heterologous production of novel laccase from *Melanocarpus albomyces*. Doctoral thesis, Helsinki University of Technology (Espoo, Finland).
- Lương Đức Phẩm (2004). Công nghệ vi sinh. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Nguyễn Lân Dũng (dịch 1983). Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học và Trung học Hà Nội.
- Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyền và Phạm Văn Ty (2000). Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Giáo dục.
- Nyanhongo G.S., Gomes J., Gubitz G., Zvaunya R., Read J.S. và Steiner W. (2002). Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology*, 84: 259.
- Nguyễn Thị Phương Mai, Lê Quang Hòa, Tô Kim Anh (2010). Phân lập *Phomopsis* sp. sinh tổng hợp laccase. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48(3): 51-58.
- Ride (1980). The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiological plant pathology*, 16: 187 - 196.
- Sergio Riva (2006). Laccase: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5): 219 - 226.