

*Tạp chí Công nghệ Sinh học* **14**(2): 313-325, 2016

## PHÂN LẬP, NGHIÊN CỨU MÔI TRƯỜNG THÍCH HỢP SINH TỔNG HỢP LACCASE CỦA CHỦNG NẤM ĐẼM THU THẬP TỪ VƯỜN QUỐC GIA BIDOUP- NÚI BÀ VÀ KHẢ NĂNG LOẠI MÀU THUỐC NHUỘM CỦA CHỦNG

Trần Thị Thu Hiền, Lê Thị Hiền, Nguyễn Văn Huynh, Đinh Thị Thu Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà

*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Ngày nhận bài: 10.12.2015

Ngày nhận đăng: 15.4.2016

### TÓM TẮT

Chủng nấm FBD154 được phân lập từ vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp laccase với hoạt tính cao. Bằng phương pháp phân loại truyền thống kết hợp với xác định trình tự ITS, chủng nấm FBD154 được xếp vào chi *Polyporus* và được đặt tên là *Polyporus* sp. FBD154. Chủng nấm FBD154 sinh tổng hợp laccase cao 74.925 U/l trên môi trường TSH1 cải tiến với pH= 4 chứa 200g/l dịch chiết khoai tây, 1 g/l casein, 1 g/l cám gạo, 5 g/l bột đậu tương, 10 g/l mannose, g/l NH<sub>4</sub>Cl 3, 0,3 mM CuSO<sub>4</sub>. Dịch enzyme thô của chủng *Polyporus* sp. FBD154 có khả năng loại màu một số thuốc nhuộm tổng hợp và thương mại. Sau 30 phút, laccase thô từ *Polyporus* sp. FBD154 đã loại được một số màu tổng hợp có nồng độ 100 mg/l với hiệu suất lần lượt là 60% màu acid đỏ 266 (NY1); 18% màu acid đỏ 299 (NY7); 52% màu acid xanh 281 (NY5); 83% màu Remazol Brilliant Blue R (RBBR) khi không có mặt của chất gắn kết. Đối với màu thương mại, hiệu suất loại màu đạt lần lượt là 62% màu megafix black CLS (CLS) và 72% màu everzol red LF2B (LF-2B) với nồng độ màu ban đầu là 100 mg/l khi không có mặt của chất gắn kết. Hiệu suất loại màu của laccase thô sinh tổng hợp bởi *Polyporus* sp. FBD154 với sự có mặt của 200  $\mu$ M chất gắn kết lần lượt là 90% màu RBBR với CGK là violuric acid (VIO) sau 30 phút; 80% màu NY5 khi có mặt CGK là hydroxybenzotriazole (HBT) sau 24 giờ; 87% màu NY1 với CGK là acetosyringone (Ace) sau 5 phút; 92% màu NY7, 91% màu LF-2B và 73% màu CLS với CGK là syringaldehyde (Syr) sau 5 phút. Từ các minh chứng thu được cho thấy laccase sinh tổng hợp bởi chủng nấm đẫm *Polyporus* sp. FBD154 có tiềm năng cao cho ứng dụng trong xử lý nước thải nhà máy dệt nhuộm nói riêng và khử độc các chất hữu cơ đa vòng thơm nói chung.

**Từ khóa:** Chất cảm ứng, chất gắn kết, laccase, loại màu, *Polyporus*

### MỞ ĐẦU

Laccase (*p*-benzenediol: oxygen oxidoreductase, E.C.1.10.3.2) thuộc nhóm enzyme oxy hóa khử. Trong phân tử có chứa 4 nguyên tử đồng có khả năng oxy hóa cơ chất sử dụng phân tử oxy làm chất nhận điện tử. Khác với phần lớn các enzyme khác, laccase có phổ cơ chất rất đa dạng, bao gồm diphenol, polyphenol, các dẫn xuất phenol, diamine, amine thơm, benzenethiol, PCB, dioxin và cả các hợp chất vô cơ như iot. Các loại laccase tách chiết từ các nguồn khác nhau thì khác nhau về khối lượng phân tử, tính chất glycosyl hóa và tính chất động học. Trong những năm gần đây, laccase đặc biệt được quan tâm bởi các enzyme này có những ứng dụng hữu ích trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau, trong xử lý khử độc bằng công nghệ phân hủy sinh học, dệt nhuộm, tổng hợp hữu cơ, thực phẩm, dược phẩm v.v..(Rubia *et al.*,2002).

Việt Nam là một trong những nước mà tình trạng ô nhiễm môi trường đang trở nên báo động, trong đó có tình trạng ô nhiễm bởi nguồn thuốc nhuộm không được xử lý. Nước thải màu từ các nhà máy được xử lý chủ yếu bằng các phương pháp hóa học và vật lý như hấp phụ, keo tụ tạo bông, trao đổi ion, oxy hóa và điện hóa. Tuy nhiên, những phương pháp này có một số hạn chế như tạo ra bùn thải, chi phí cao và sử dụng một lượng lớn hóa chất (Mechichi *et al.*, 2006). Do đó, xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học có vai trò quan trọng do giá thành rẻ, xử lý triệt để, không tạo sản phẩm thứ cấp v.v. Hướng ứng dụng enzyme ngoại bào như laccase, mangan peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) có khả năng xúc tác các phản ứng oxy hóa khử được xem là biện pháp hiệu quả và có tiềm năng ứng dụng cao (Nguyễn Nguyên Quang, Đặng Thị Cẩm Hà, 2010).

Trong nghiên cứu này, việc phân lập, phân loại, xác định thành phần môi trường thích hợp nhằm tăng khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp laccase của

chủng FBD154 đã được thực hiện. Bên cạnh đó, nghiên cứu cơ bản định hướng ứng dụng laccase của chủng FBD154 trong loại màu thuốc nhuộm hoạt tính đã được xác định với hiệu suất loại màu khác nhau khi có và không bổ sung chất gắn kết.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Mẫu nấm tươi thu thập từ rừng Quốc gia Bidoup- Núi Bà thuộc tỉnh Lâm Đồng được giữ trong túi vô trùng và mang về phòng thí nghiệm.

Chất gắn kết sử dụng là violuric acid (VIO), hydroxybenzotriazole (HBT), sinapic acid (Si), acetoncysing (Ace), syringaldehyde (Syr) đều của hãng Sigma-Aldrich. Một số màu tổng hợp (tinh khiết) cũng có nguồn gốc từ Sigma-Aldrich gồm: nhóm anthraquinone (RBBR, NY5) và nhóm azo (NY1,NY7) với bước sóng hấp thụ cực đại tương ứng 595, 595 và 520, 499 nm. Màu thương mại gồm màu đỏ everol red LF-2B (LF-2B), màu đen dimaren black CLS (CLS) (từ Nhà máy Nhuộm Nam Định) có bước sóng hấp thụ cực đại tương ứng là 550 và 600 nm.

Các môi trường sử dụng cho lên men lỏng bao gồm: PDB (dịch chiết khoai tây 200g/l, glucose 10 g/l), VIS (pepton 3 g/l, glucose 10 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 g/l, ZnSO<sub>4</sub> 0,001 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,0005 g/l, MnSO<sub>4</sub> 0,05 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/l), TSH1 (dịch chiết khoai tây 200g/l, cám gạo 1 g/l, bột đậu tương 5 g/l và glucose 10 g/l),GYMP (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l, glucose 10 g/l, peptone 2 g/l, cao men 2 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/l, cao malt 2 g/l, pH 6), MEG (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/l, NaCl 0,2 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/l, CaCO<sub>3</sub> 0,5 g/l, cao men 4 g/l, cao malt 2 g/l, glucose 4 g/l, pH 6,5), CZAPEK (saccharose 30 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, NaCl 1 g/l, NaNO<sub>3</sub> 2 g/l, KCl 0,5 g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,01 g/l, pH 7), MECHI (cao malt 10 g/l, cao men 4 10 g/l, glucose 4 10 g/l, pH 5,5).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phân lập và phân loại nấm đảm

Mẫu nấm sau khi thu thập từ tự nhiên được mang về phòng thí nghiệm để xử lý bề mặt nhằm loại bỏ bụi bẩn và sự tạp nhiễm của các vi sinh vật có trong tự nhiên và được đặt tên là FBD154. Mẫu nấm đảm được cắt nhỏ với kích thước khoảng 0,5 x 0,5 cm sau đó đặt lên đĩa thạch có chứa sẵn môi

trường PDA bổ sung guaicol để làm chất chỉ thị và các đĩa thạch này được nuôi ở 30°C trong thời gian 2-4 ngày. Chọn các chủng nấm tạo thành màu nâu đỏ trên đĩa thạch tiến hành tách riêng và làm sạch.

DNA tổng số của nấm được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001). Sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA tổng số với cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3') (Whiteet *al.*, 1990). Trình tự các đoạn gen được xử lý bằng phần mềm FinchTV và so sánh với các chủng đã được công bố trên GenBank (NCBI database). Cây phát sinh chủng loại của chủng nấm được xây dựng bằng phần mềm MEGA6.06.

### Phương pháp xác định hoạt tính laccase

Hoạt tính laccase được xác định dựa trên sự oxy hóa ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) của laccase tạo thành hợp chất hấp thụ ở bước sóng 420 nm ( $\lambda_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ở điều kiện thí nghiệm (Eggert *et al.*, 1996). Hỗn hợp phản ứng (1 ml) gồm 600  $\mu\text{l}$  đệm natri acetate pH 3 (20 mM), 200  $\mu\text{l}$  ABTS (2,5 mM) và 200  $\mu\text{l}$  dịch enzyme. Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1  $\mu\text{M}$  sản phẩm từ ABTS trong thời gian 1 phút, ở điều kiện thí nghiệm.

### Nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp laccase

Chủng FBD154 từ môi trường PDA thạch được cấy chuyển vào 100 ml môi trường TSH1, nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Sau 4 ngày, 7% giống (v/v) được bổ sung vào các bình nuôi cấy để nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường như môi trường nuôi cấy, pH, chất cảm ứng, nguồn cacbon và nguồn nitrogen lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng nghiên cứu. Mỗi thí nghiệm được thực hiện ít nhất 2 lần.

### Đánh giá hiệu quả loại màu thuốc nhuộm hoạt tính (tổng hợp và thương mại) bằng laccase thô từ chủng nấm FBD154

Dịch enzyme có nồng độ cuối 1000 U/l được sử dụng để đánh giá khả năng loại màu với sự tham gia của chất gắn kết. Tổng thể tích phản ứng loại màu là 5 ml gồm: đệm natri axetat 20 mM pH 4, thuốc nhuộm (nồng độ 100 mg/l), dịch enzyme thô (nồng độ cuối 1000 U/l) và chất gắn kết (nồng độ cuối 200  $\mu\text{M}$ ). Mẫu đối chứng có màu và đệm natri axetat pH 4. Hiệu quả loại màu thuốc nhuộm được theo dõi và đánh giá khả năng loại màu ở các thời điểm là 5 phút, 30 phút, 1, 2, 3 và 24 giờ. Dịch phản ứng chứa

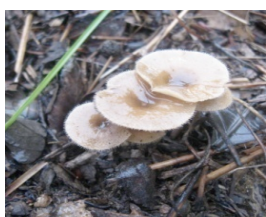
lần lượt các màu được đo tại các bước sóng phù hợp. Khả năng loại màu được xác định bằng phần trăm hấp phụ của chất khử bằng công thức: Phần trăm loại màu = (độ hấp thụ ban đầu - độ hấp thụ cuối)/độ hấp thụ ban đầu x 100%.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập chủng nấm FBD154

Sau khi xử lý bề mặt, mẫu nấm FBD154 đã được

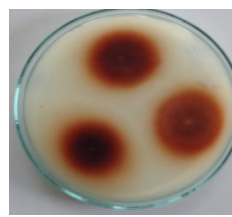
phân lập trên môi trường PDA bổ sung chất chỉ thị guaiacol 0,01%. Sau 4 ngày nuôi cấy sợi nấm phát triển tốt, lan rộng trên bề mặt môi trường, hệ sợi nấm bông xốp có màu trắng, không mịn và tạo vòng nâu đỏ trên môi trường có chứa chất chỉ thị (Hình 1B và 1C). Sau 6 đến 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, hệ sợi nấm bắt đầu chuyển màu nâu đen và 10 ngày xuất hiện quả thể. Kết quả này chứng tỏ chủng này có khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào thuộc nhóm peroxidase (MnP, LiP) hoặc oxidoreductase (laccase). Chủng FBD154 đã được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm thu laccase có hoạt tính cao nhất.



Ảnh tự nhiên (A)



Mặt trước (B)



Mặt sau (C)

**Hình 1.** Hình thái tự nhiên (A) và khuẩn lạc (mặt trước – B và mặt sau – C) của chủng nấm FBD154 được nuôi cấy trên môi trường PDA bổ sung 0,01% guaiacol làm chất chỉ thị.

### Phân loại chủng FBD154

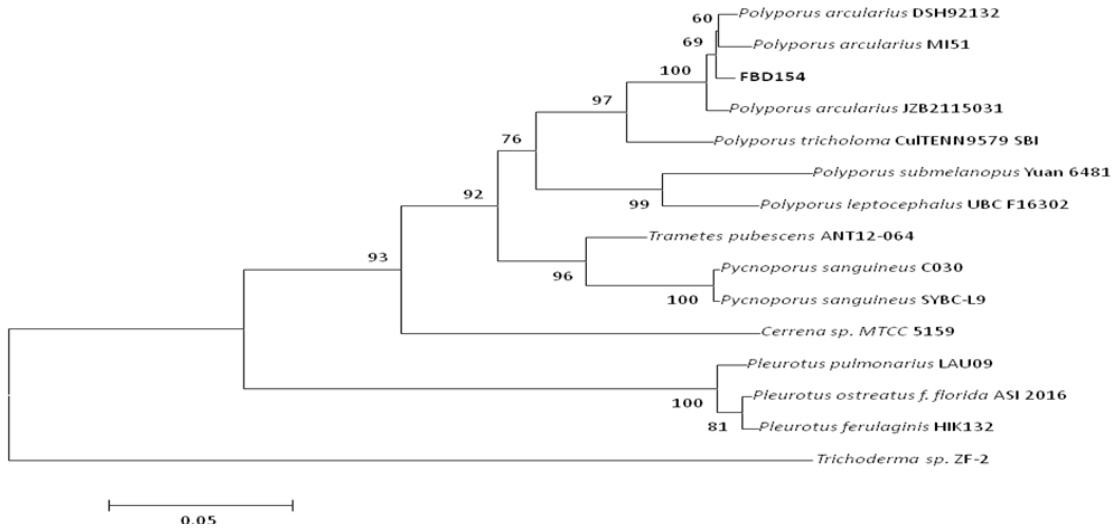
Chủng FBD154 có quả thể nấm dai khi còn tươi và rần hoặc dễ vỡ khi bị khô. Phía trên bề mặt mũ có màu trắng ngà ở giữa chuyển sang nâu nhạt với các lỗ ở mặt dưới có màu kem (Hình 1A). Các lỗ có dạng hình tròn hoặc dạng góc, và các ống thường không dính kèm, chạy dọc theo chiều dài của thân cây nấm. Bào tử trong như pha lê, nhẵn và thành dày. Quan sát dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400 lần, hệ sợi của chủng FBD154 trong suốt, không có vách ngăn, là hệ sợi khí sinh. Dựa vào khóa phân loại của Samson RA (1984) chủng FBD154 có thể được xếp vào ngành *Basidiomycota*, chi *Polyporus*.

Để làm rõ các kết quả phân loại truyền thống, việc xác định và so sánh trình tự vùng ITS (ITS1 - 5,8S - ITS2) của chủng FBD154 với các chủng đại diện tương đồng trên GenBank sử dụng cặp mồi ITS 1 và ITS 4 đã được tiến hành. Trình tự vùng ITS của chủng FBD154 có kích thước là 592 nucleotide. Cây phát sinh chủng loại của chủng nấm FBD154 đã được xây dựng và trình bày ở hình 2.

Trình tự vùng ITS của chủng nấm FBD154 có mức độ tương đồng 99% với các chủng *Polyporus arcularius* DSH92132 (mã số KP283489.1),

*P. arcularius* JZB2115031 (JQ283966.1); 98% với chủng *P. arcularius* MI51 (mã số KC581792.1); và tương đồng thấp hơn (92%) so với chủng *P. tricholoma* CulTENN9579 SBI (AF516554.1). Đại diện của nấm nấm thuộc chi *Polyporus* không chỉ có tiềm năng sinh tổng hợp laccase mà chúng còn có khả năng sinh các enzyme khác như lignin peroxidase, manganese peroxidase, chitinase, xylanase v.v.. Đồng thời, nhiều loài trong chi *Polyporus* cũng có khả năng chuyển hóa hay phân hủy nhiều hợp chất độc hại khác như thuốc nhuộm và các hợp chất PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon). Nấm *P. arcularius* MI51 được phân lập từ Tamil Nadu Ấn Độ có khả năng sinh tổng hợp laccase ở mức trung bình 9.300 U/l sau 21 ngày nuôi cấy trên môi trường muối khoáng cơ bản (Jegatheesan, Eyini, 2014). Ngoài ra *P. arcularius* T438 có khả năng sinh tổng hợp laccase với hoạt tính 2.700 U/L trên môi trường MVM (modified Vogel médium) (Aktas *et al.*, 2001) sau 15 ngày nuôi cấy.

Dựa vào hình thái tự nhiên và trình tự vùng ITS, chủng nấm FBD154 thuộc lớp nấm nấm *Basidiomycetes*, chi *Polyporus* và được đặt tên là *Polyporus* sp. FBD154. Trình tự vùng ITS của chủng này đã được đăng ký trên GenBank với mã số KR 920049.



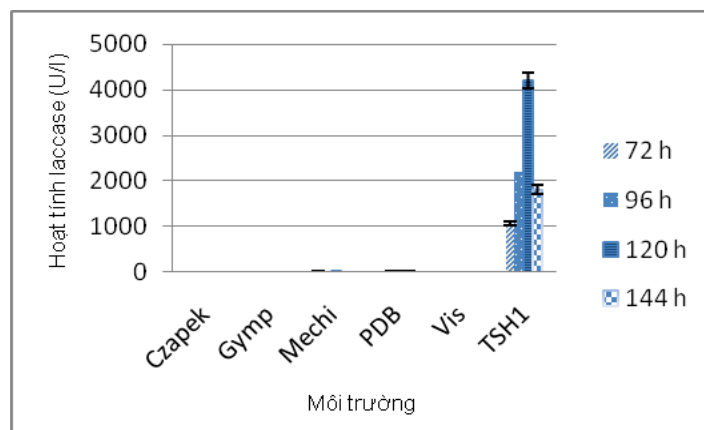
Hình 2. Cây phát sinh chủng loài của chủng FBD154.

### Chọn lọc môi trường và điều kiện nuôi cấy

#### Chọn lọc môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là một trong những yếu tố rất quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp laccase. Môi trường được sử dụng để đánh giá khả năng sinh enzyme của chủng *Polyporus sp.* FBD154 bao gồm TSH1, PDB, Mechi, Vis, Czapek, Gymp. Sau 6 ngày nuôi cấy hoạt tính của chủng FBD154 được thể hiện ở hình 3. Chủng *Polyporus sp.* FBD154 có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường TSH1 và đạt hoạt tính cao nhất là 4.206 U/l sau 5 ngày nuôi cấy cho kết quả rất thấp thậm chí là không có hoạt tính trên những công thức môi trường khác (Hình 3).

Theo một số công bố quốc tế thì chủng *Polyporus brumalisi* brc 05015 có khả năng sinh tổng hợp laccase với hoạt tính 7.720 U/l trên môi trường giàu dinh dưỡng MYPG sau 24 ngày nuôi cấy (Nakade *et al.*, 2010). Loài nấm *Pycnoporus sanguineus* sinh laccase với hoạt tính đạt 5.300 U/l sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường GYP bổ sung 1 mM CuSO<sub>4</sub> (Saratale *et al.*, 2011). Như vậy mỗi chủng nấm khác nhau có khả năng sinh tổng hợp enzyme với hoạt tính khác nhau trên các môi trường thích hợp. Do đó việc lựa chọn thành phần môi trường thích hợp là rất quan trọng để tăng hoạt lực laccase.



Hình 3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh laccase ở chủng *Polyporus sp.* FBD154.

### **Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *Polyporus* sp. FBD154**

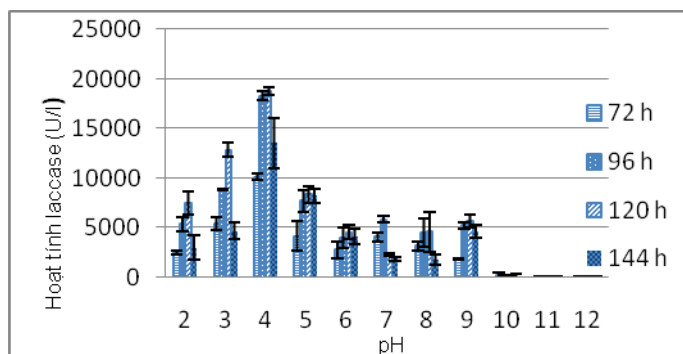
#### **Ảnh hưởng của pH môi trường**

pH môi trường là một trong các yếu tố quan trọng không những ảnh hưởng đến sự sinh trưởng mà còn ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi sinh vật. Trong nghiên cứu này, môi trường TSH1 với giá trị pH từ 2 đến 12 đã được sử dụng.

Chủng *Polyporus* sp. FBD154 có khả năng sinh tổng hợp laccase ở pH rất rộng từ pH 2- pH 9 và sinh trưởng tốt nhất ở môi trường acid đạt hoạt tính cao nhất là 18.727 U/l ở pH 4 (Hình 4). Ở pH 3 và pH 5 chủng nấm này cũng cho hoạt tính khá cao, lần lượt là 12.835 U/l và 8.344 U/l, trong khi đó tại pH từ 10 -12 hoạt tính enzyme đo được rất thấp, chỉ từ 28 đến 74 U/l và tốc độ sinh trưởng của nấm cũng rất kém. Như vậy, pH 4 phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp laccase ở chủng FBD154.

Khác với chủng *Polyporus arcularius* A08 sinh

laccase tối ưu trong môi trường chứa dịch thủy phân cám gạo với pH thích hợp là 5,2-5,7, pH thích hợp cho khả năng sinh laccase của chủng FBD154 lại ở pH 4. Tuy nhiên, hoạt tính laccase của chủng này chỉ đạt 1.480 U/L trên môi trường có pH thích hợp (Wang *et al.*, 2009). Theo nhiều tài liệu đã công bố trong và ngoài nước thì nấm thường sinh trưởng tốt ở pH hơi acid. Loài nấm *Pycnoporu cinnabarinus* sinh tổng hợp laccase với hoạt tính 24.000U/l trong môi trường pH 4 (Eggert *et al.*, 1996). Chủng *Pycnoporu coccineus* Thongkred 013 BCU sinh trưởng và sinh tổng hợp laccase cao ở môi trường pH 5 (Otterbein *et al.*, 2000). Tuy nhiên, một số kết quả nghiên cứu khác cho thấy laccase vẫn được sinh ra ở pH kiềm như trường hợp chủng *Montospora* sp. ở pH là 8,5 (Wang *et al.*, 2006); còn chủng *Pycnoporu scoccineus* MUCL38527 hoạt động ổn định ở pH 8. Đặc tính này phụ thuộc rất nhiều vào nguồn gốc của chủng cho nên chủng FBD154 có thể sinh tổng hợp laccase có hoạt tính cao hơn hẳn so với các chủng nấm đã được công bố.



Hình 4. Ảnh hưởng pH môi trường lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus* sp.FBD154.

### **Ảnh hưởng của các chất cảm ứng lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *Polyporus* sp. FBD154**

Các nghiên cứu tăng khả năng tổng hợp laccase của VSV bằng các chất cảm ứng đã và đang trở thành một trong các biện pháp mang lại hiệu quả cao. Các nguồn này bao gồm các amino acid, các hợp chất thơm, các chất chiết từ thực vật và các kim loại trong đó có  $Cu^{2+}$  (Cavallazzi *et al.*, 2005). Trong nghiên cứu này, các chất cảm ứng khác nhau đang được sử dụng ở nhiều nghiên cứu gần đây bởi các nhà khoa học trên thế giới đã được chọn để bổ sung vào môi trường. Ảnh hưởng của một số chất cảm

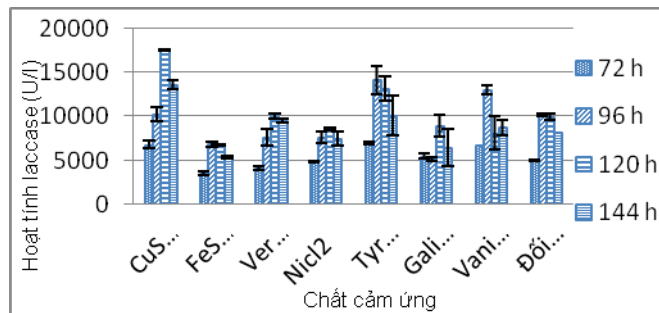
ứng lên khả năng sinh tổng hợp laccase bởi *Polyporus* sp. FBD154 đã được khảo sát và kết quả được trình bày ở hình 5.

Các chất cảm ứng  $FeSO_4$ , veratry alcohol,  $NiCl_2$  và acid galic không có tác dụng cảm ứng khả năng sinh tổng hợp laccase bởi chủng FBD154 sau 120 giờ nuôi cấy hoạt tính laccase chỉ dao động trong khoảng 8.900-10.000 U/l. Trên môi trường có chứa acid galic và veratry alcohol tương đương với mẫu đối chứng. Ion  $Fe^{2+}$  và  $Ni^{2+}$  dường như đã ức chế khả năng sinh tổng hợp laccase, hoạt tính chỉ đo được lần lượt 6.700 và 8.085 U/L ở chủng FBD154. Ngược lại,  $CuSO_4$ , tyrosine và vaniline đều là các chất cảm

ứng phù hợp để sinh tổng hợp laccase cao hơn. Hoạt tính laccase cao nhất trên môi trường chứa  $\text{Cu}^{2+}$  đạt 17.523 U/l sau 120 giờ còn trên tyrosine và vanillin đạt lần lượt 14.102 và 13.005 U/l sau 96 giờ nuôi cấy (Hình 5). Do đó 0,1 mM  $\text{CuSO}_4$  được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Với mỗi loại chất cảm ứng có tác động đến các chủng khác nhau là khác nhau. Theo công bố của Hou và đồng tác giả (2004), khi bổ sung 1 mM

guaiacol đã làm tăng khả năng sinh laccase từ 2-232 lần ở các chủng nấm khác nhau như *Phlebia spp.*, *P. ostreatus*. Tuy nhiên, cũng có những minh chứng về sự ức chế hoạt tính laccase bởi guaiacol ở chủng *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1996). Chủng *P. ostreatus* ATCC MYA-2306 sinh ra các isoenzyme của laccase khi có mặt của 2 mM ferulic acid trong môi trường nuôi cấy (Palmieri *et al.*, 2000).



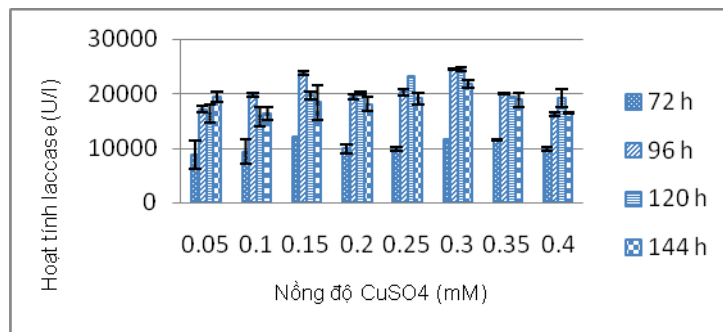
Hình 5. Ảnh hưởng của chất cảm ứng lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus sp.* FBD154

**Ảnh hưởng nồng độ  $\text{CuSO}_4$  môi trường lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus sp.* FBD154**

Do khi khảo sát các chất cảm ứng thì  $\text{CuSO}_4$  có vai trò quan trọng nhất đối với chủng *Polyporus sp.* FBD154 nên việc xác định nồng độ  $\text{CuSO}_4$  chính xác để tạo laccase cao đã được nghiên cứu.

Khi bổ sung  $\text{CuSO}_4$  ở nồng độ 0,05 - 0,4 mM, hoạt tính laccase đều tăng cao dao động trong khoảng 16.000-24.000 U/l. Hoạt tính laccase cao nhất là 24.485 U/l ở nồng độ 0,3 mM  $\text{CuSO}_4$  sau 96 giờ nuôi cấy (Hình 6). Lorenzo và đồng tác (2006) đã nghiên

cứu ảnh hưởng của  $\text{Cu}^{2+}$  lên khả năng sinh laccase của *Trametes versicolor* (CBS100.29) và cho thấy hoạt tính cao nhất tăng 11 lần và đạt 8.000 U/l sau khi bổ sung 3,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  vào môi trường nuôi cấy. Hoạt tính laccase được sinh ra bởi chủng *Polyporus brumalis* ibrc05015 có khả năng sinh tổng hợp laccase đạt 34.600 U/l khi bổ sung 0,25 mM  $\text{CuSO}_4$  vào môi trường sau 29 ngày nuôi cấy (Nakade *et al.*, 2013). Như vậy, mặc dù hoạt tính laccase của chủng FBD154 thấp hơn so với chủng này nhưng thời gian để đạt hoạt tính cao nhất của chủng FBD154 ngắn hơn rất nhiều so với loài *Polyporus brumalis* ibrc05015 trên môi trường chứa nồng độ  $\text{Cu}^{2+}$  thích hợp.



Hình 6. Ảnh hưởng nồng độ  $\text{CuSO}_4$  môi trường lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus sp.* FBD154.



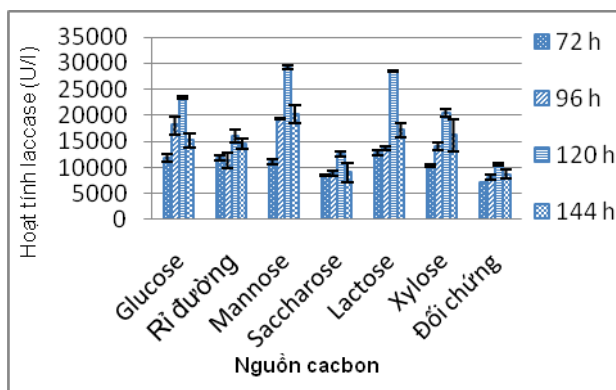
**Ảnh hưởng của các loại đường lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *Polyporus sp. FBD154***

Để đánh giá ảnh hưởng của nguồn cacbon lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng FBD154 thì nguồn cacbon có trong môi trường TSH1 là glucose được thay thế bằng các nguồn cacbon khác như xylose, saccharose, lactose, ri đường, mannose với nồng độ 10 g/l. Laccase với hoạt độ khác nhau sinh tổng hợp bởi chủng nấm FBD154 sau 6 ngày nuôi cấy được thể hiện trong hình 7.

Trong các nguồn cacbon được sử dụng để khảo sát, cho thấy chủng FBD154 sinh tổng hợp với hoạt tính laccase cao nhất là 29.183 U/l khi môi trường chứa mannose, tiếp theo là lactose với hoạt tính đo được là 28.541 U/l và glucose hoạt tính đạt 23.386

U/l. Trong môi trường có nguồn cacbon là xylose, ri đường, saccharose và mẫu đối chứng thì hoạt tính laccase thấp hơn so với các nguồn cacbon nêu trên. Đặc biệt, ở mẫu không bổ sung đường thì hoạt tính laccase thấp hơn hẳn. Do đó các loại đường liệt kê ở trên đã làm tăng hoạt độ laccase tạo ra bởi FBD154. Từ kết quả thu được này cho thấy trên môi trường TSH1 bổ sung đường mannose, chủng FBD154 sinh tổng hợp laccase cao nhất.

Theo một số công bố trên thế giới, hoạt tính laccase của chủng *Polyporus arcularius* A08 tăng đến 1.480 U/l khi bổ sung nguồn carbon hỗn hợp chứa cám gạo và hemicelluloses trong môi trường với tỷ lệ C/N cao (Wang *et al.*, 2009). Chủng *Monotropa sp.* sinh trưởng trên nguồn cacbon là 2g/l maltose đã tạo laccase với hoạt tính 13.550 U/l, tăng 4 lần so với môi trường cơ sở (Wang, *et al.*, 2006).



Hình 7. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus sp. FBD154*

**Ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *Polyporus sp. FBD154***

*Ảnh hưởng của nguồn nitrogen vô cơ*

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus sp. FBD154*, các nguồn nitrogen vô cơ khác nhau đã được bổ sung vào môi trường TSH1 với nồng độ ban đầu là 3 g/l. Hoạt tính enzyme trong dịch nuôi cấy của chủng FBD154 được xác định sau 72, 96, 120 và 144 h (Hình 8).

Chủng FBD154 sinh trưởng và sinh laccase tốt trên cả 2 nguồn nitrogen là NH<sub>4</sub>Cl và (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Trong đó, trên môi trường có nguồn nitrogen là NH<sub>4</sub>Cl, chủng FBD154 sinh hoạt tính laccase cao nhất đạt 65.895 U/l sau 120 h nuôi cấy. Khi môi

trường bổ sung nitrogen vô cơ là NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> thì hoạt tính enzyme đều tăng cao hơn so với mẫu đối chứng và có hoạt tính lần lượt là 47.296 U/l, 56.666 U/l, 35.984 U/l và 40.565 U/l (Hình 8). Kết quả thu được chứng tỏ nguồn nitrogen vô cơ rất thích hợp để sinh tổng hợp laccase cao đối với FBD154.

Chủng *Pleurotus dryinus* IBB 903 sinh tổng hợp laccase và cho hoạt tính 6.025 U/l sau 10 ngày nuôi cấy khi sử dụng nguồn nitrogen là (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> với nồng độ là 10mM (Sathishkumar *et al.*, 2010). Ở Việt Nam, chủng nấm *Trichoderma sp. FCP3* phân lập từ gỗ mục ở rừng Quốc gia Cúc Phương được biết là sinh tổng hợp laccase cao nhất khi bổ sung NaNO<sub>3</sub> và KNO<sub>3</sub> (tỷ lệ 3:7) với nồng độ 3 g/l vào môi trường và có hoạt tính là 132 U/l (Hoàng Thị Nhung *et al.*, 2011).

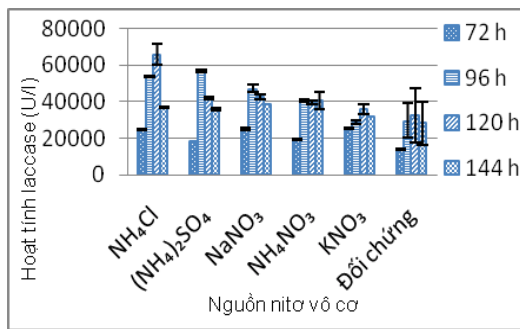
*Ảnh hưởng của nguồn nitrogen hữu cơ bổ sung*

Ngoài bột đậu tương, một số nguồn nitrogen hữu cơ được bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy bao gồm cao malt, cao nấm men, cao thịt, peptone, tripton và casein với nồng độ ban đầu là 1g/l. Hoạt tính laccase trong dịch nuôi cấy của chủng FBD154 được xác định sau 72, 96, 120 và 144 h.

Chủng nấm FBD154 sinh laccase cao nhất sau 96 h nuôi cấy với nguồn nitrogen hữu cơ là casein và hoạt tính enzyme cao nhất là 74.952 U/l, tiếp đó là mẫu đối chứng và cao malt với hoạt tính enzyme lần lượt là 61.489 U/l và 57.637 U/l sau 120 h nuôi cấy (Hình 9). Như vậy, casein là nguồn nitrogen thích hợp cho sự sinh tổng hợp laccase ở chủng FBD154. Đặc tính này khá khác so với các chủng thuộc chi *Polyporus* trong các nghiên cứu đã được công bố. Sản xuất laccase bởi chủng *P.*

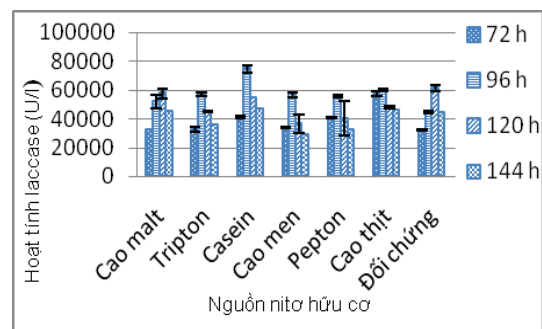
*arcularius* MI51 được tối ưu khi sử dụng các phương pháp mô hình hóa CDD (central composite design) và RSM (response surface methodology) bằng cách nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố và môi trường nuôi cấy lên quá trình sinh tổng hợp laccase của chủng này. Các số liệu thu được đã chỉ ra rằng những thí nghiệm được thiết kế từ CCD làm tăng khả năng sinh tổng hợp laccase gần gấp 3 lần (28.300 U/l) so với đối chứng sau 15 ngày nuôi cấy trong môi trường có hàm lượng nitrogen là 0,5 g/l cao nấm men và 250 µM CuSO<sub>4</sub> (Jegatheesan, Eyini, 2014).

Hoạt tính laccase ban đầu của chủng FBD154 là 4.233 U/l và đã tăng lên 74.925 U/l sau khi chọn lọc được các yếu tố môi trường và nguồn dinh dưỡng phù hợp. Đây là chủng nấm đảm có khả năng sinh tổng hợp laccase có hoạt tính cao so với các công bố quốc tế.



**A**

**Hình 8.** Ảnh hưởng của nguồn nitrogen vô cơ lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus* sp.FBD154.



**B**

**Hình 9.** Ảnh hưởng của nguồn nitrogen hữu cơ lên khả năng sinh laccase của chủng *Polyporus* sp.FBD154

**Khả năng loại màu thuốc nhuộm bằng enzyme thô sinh tổng hợp từ chủng nấm *Polyporus* sp. FBD154**

**Khả năng loại màu nhóm anthraquinone (RBBR, NY5) bởi laccase thô từ chủng *Polyporus* sp. FBD154**

Các màu RBBR, NY5 thuộc nhóm màu Anthraquinone được sử dụng trong nghiên khả năng loại màu bằng laccase thô của chủng FBD154 và hiệu suất loại màu được thể hiện trong hình 10.

Laccase thô thu được từ chủng nấm *Polyporus* sp. FBD154 có khả năng loại màu RBBR cao. Khi không sử dụng chất gắn kết sau 5 phút chỉ có thể loại được 15% nhưng sau 30 phút thì khả năng loại màu

đã đạt tới 82,5%. Trong khi đó với các thí nghiệm bổ sung thêm chất gắn kết là Ace và Sy thì khả năng loại màu cho kết quả lần lượt là 68 và 74% sau 5 phút. Sau 30 phút hiệu suất loại màu ở tất cả các thí nghiệm khi có mặt của CGK đều xác định được 68-91% (Hình 10A).

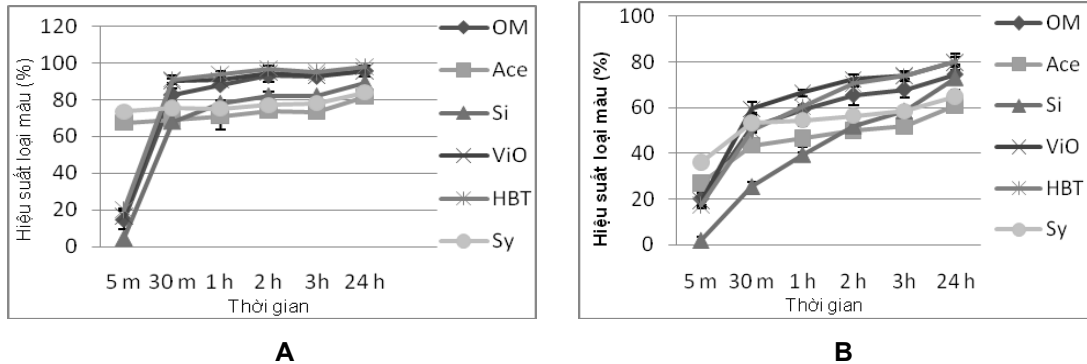
Với màu NY5 khả năng loại màu tương đối đồng đều. Ở thí nghiệm không bổ sung CGK sau 5 phút chỉ có khả năng loại được 20%. Nhưng sau 1 h hiệu suất loại màu đã tăng lên rõ rệt và đến 24 h đã đạt giá trị cực đại là 75%. Bên cạnh đó với những thí nghiệm có CGK thì khả năng loại màu lần lượt là VIO 80%, HBT 80%, Si 73%, Sy 65% và Ace 61% sau 24h theo dõi (Hình 10B). Như vậy, với màu NY5 khi bổ sung thêm CGK là VIO và HBT đã làm tăng hiệu quả loại màu nhưng khi bổ sung các CGK còn



lại thì khả năng loại màu không tăng, thậm chí còn giảm so với mẫu đối chứng.

Chủng nấm *Polyporus pseudobetulinus* có khả năng loại 65% màu Ambifix Blue H3R sau 15 phút và 80% màu Malachite Green sau 24 h (Daâsiet al., 2014). Theo Hou và đồng tác giả (2004) laccase

thô nuôi cấy từ chủng *Pleurotus ostreatus* 32 (30.000 U/l) loại được 66% màu Anthraquinone SN4R. Khi có mặt ATBS (0,16%) hiệu suất loại màu của dịch enzyme tăng lên 90%. Chủng nấm trắng *Trametes* sp. SQ01 phân hủy 97-99% thuốc nhuộm azo và RBBR trong vòng 7 ngày nuôi cấy.

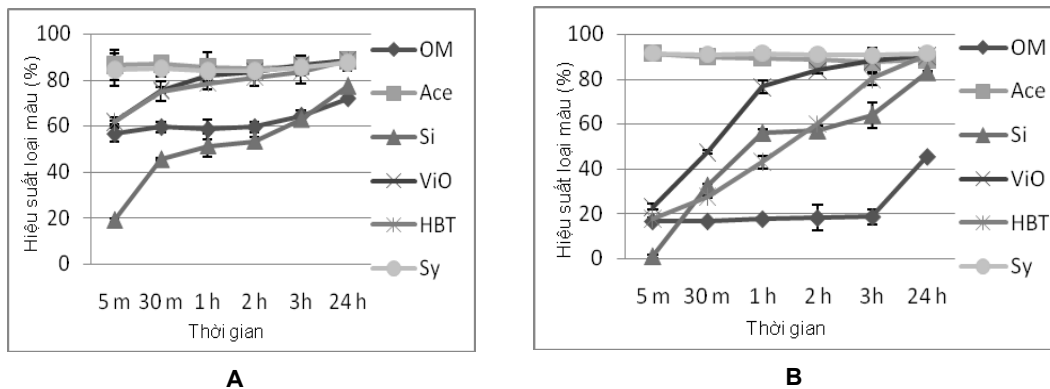


**Hình 10.** Khả năng loại màu thuốc nhuộm RBBR (A); NY5 (B) của dịch enzyme thô của chủng *Polyporus* sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.

**Khả năng loại màu azo (NY1, NY7) bởi laccase thô từ chủng *Polyporus* sp. FBD154**

Các màu thuốc nhuộm hoạt tính NY1, NY7 thuộc nhóm màu Azo, có cấu trúc bền nhất và được sử dụng nhiều trong các ngành công nghiệp nhuộm nhưng lại rất khó bị phân hủy. Vì vậy thí nghiệm sử dụng laccase thô từ chủng FBB154 để loại màu azo được khảo sát.

Với màu NY1 sau 5 phút với tất cả chất gắn kết thì hiệu suất đạt từ 62 đến 87% (trừ CGK là Si đạt 19%) riêng với thí nghiệm không bổ sung thêm CGK hiệu suất loại màu đạt 57%. Riêng với 2 CGK là Ace và Sy hiệu suất loại màu đã thu được cực đại sau 5 phút với hiệu suất lần lượt là 87 và 85%. Hiệu suất loại màu ở thí nghiệm không có CGK và các thí nghiệm có chứa CGK là Si, ViO, HBT lần lượt đạt 72%, 78%, 89%, 89% sau 24h (Hình 11A).



**Hình 11.** Khả năng loại màu thuốc nhuộm NY1 (A); NY7 (B) của enzyme thô của chủng *Polyporus* sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.

**Bảng 1.** So sánh hiệu suất loại màu bởi laccase của chủng nấm FBD154 so với laccase thu được của các chủng nấm khác.

Laccase	Nồng độ màu	Hiệu suất loại màu	Tài liệu tham khảo
<i>Polyporus pseudobetulinus</i>	200 ppm	65% màu Ambifix Blue H3R sau 15 phút và 80% màu Malachite Green sau 24 h.	Songserm <i>et al.</i> , 2012
<i>Coriolopsis polyzona</i>	100 ppm	73,8% màu acid blue 62; 29,9% màu acid black 194; 55,3% màu reactive black và 44,6% màu direct blue 71 khi sử dụng laccase có bổ sung 2,5 mM VIO	Cui <i>et al.</i> , 2009
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS2	25 µM	70% màu Methyl Red và 15% màu Reactive Black 5 sau 4 giờ ở 25°C	Martínez <i>et al.</i> , 2013
<i>Pycnoporus coccineus</i> BRFM 938	40 ppm	26% Poly R-478, 93% RBBR, 100% Bromocresol purple, 92% Reactive black 5, 100% Acid yellow 17 sau 52 giờ khi bổ sung HBT	Uzan <i>et al.</i> , 2010
<i>Lentinus Polychrous</i>	40 ppm	85% Acid Blue 80; 30% Water Blue; 20% Indigo Carmine; ít hơn 10% đối với các màu thuộc nhóm azo (Reactive Black 5, Reactive Orange 16, Reactive Green 19) sau 120 phút.	Ratanapongleka, Phetsom, 2014
<i>Funalia trogii</i>	100 ppm	74,96% Reactive Black 171; 78,14 Reactive Black 5 sau 5 phút ở 30°C	Yeşilada <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma</i> sp. FCP3	100 ppm	92% Acid blue 62; 86% Remazol brilliant blue R; 64% Acid blue 281; 60% Acid red 299; 6% Acid red 266 sau 3 giờ	Hoang Thị Nhung <i>et al.</i> , 2011
<i>Trametes</i> sp. SQ01	1000 ppm	30% Remazol brilliant blue R bị loại bỏ trong 30 phút	Xiao <i>et al.</i> , 2013
<b><i>Polyporus</i> sp.FBD154</b>	100 ppm	90% màu Remazol brilliant blue R với CGK là VIO sau 30 phút; 80% màu Acid blue 281 khi có mặt CGK là HBT sau 24 h; 87% màu Acid red 299 với CGK là Ace sau 5 phút; 92% màu Acid red 266, 91% màu Evezol Red và 73% màu Megafix black CLS với CGK là Sy sau 5 phút với nồng độ CGK là 200 µM	Nghiên cứu này

Đối với màu NY7, enzyme thô của chủng *Polyporus* sp. FBD154 có hiệu suất loại màu khác hẳn so với NY1. Cụ thể sau là 5 phút với các chất gắn kết khác nhau hiệu suất loại màu là 23% VIO, 18% HBT, 92% Ace, 92% Sy. Sau 24 h hiệu suất loại màu thu được từ 84 đến 92% khi có mặt tất cả các chất gắn kết. Trong thí nghiệm không có chất gắn kết, hiệu suất loại màu thuốc nhuộm này thu được chỉ 46% sau 24 h (Hình 11B). Trong trường hợp này CGK đã làm tăng khả năng xúc tác của laccase lên rất nhiều.

Laccase thô của chủng *Pycnoporus sanguineus* CS2 có khả năng loại 70% màu MR (methyl red) mà không sử dụng chất gắn kết (Martínez *et al.*, 2013). Couto và cộng sự (2007) cũng đã công bố laccase từ *Trametes hirsute* loại

khoảng 90% màu acid đỏ 97 chỉ trong 3 phút khi có mặt của 2 mM và 5 mM VIO.

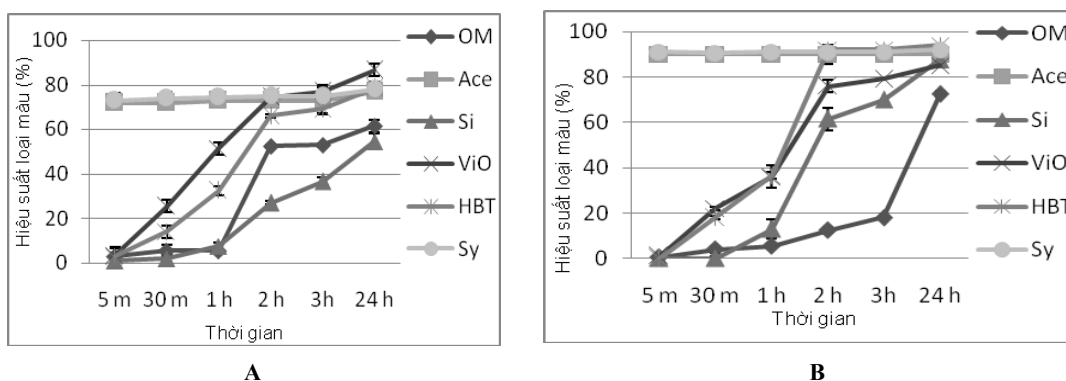
#### **Khả năng loại màu thương mại (CLS và LF-2B) bởi laccase thô của chủng *Polyporus* sp. FBD154**

Khi không bổ sung CGK hiệu suất loại màu CLS tương đối cao 53% sau 3 h và 62% sau 24 h. Laccase thô từ chủng nấm FBD154 khi kết hợp với chất gắn kết có khả năng loại được màu CLS với hiệu suất đạt từ 56% đến 87% sau 24 h. Cũng giống như các màu khác khi có mặt của 2 CGK là Ace và Sy, hiệu suất loại màu tăng lên rõ rệt. Sau 5 phút với chất gắn kết là Ace và Sy đã loại được lần lượt là 72% và 73% các giờ tiếp theo kết quả này thay đổi không đáng kể (Hình 12A).

Với màu LF-2B khi không có mặt của CGK thì

hiệu suất loại màu chỉ đạt 18% sau 3 h nhưng sau 24 h hiệu suất loại màu thuốc nhuộm này đã là 73%. So với màu CLS thì màu LF-2B có hiệu suất loại màu cao hơn khi sử dụng 2 CGK là Ace và Sy. Sau 5 phút cả 2 CGK này đều loại được 90% màu thương mại LF-2B. Ở các thí nghiệm khác hiệu suất loại không cao sau 5 phút, nhưng sau 24 h thì hiệu quả loại màu đã tăng lên rõ rệt và thu được từ 73 đến 94% (Hình 12B).

Cui *et al.*, (2009) cũng đã thông báo laccase từ loài nấm *Corioloopsis polyzona* có khả năng loại được 73,8% màu acid blue 62; 29,9% màu acid black 194; 55,3% màu reactive black và 44,6% màu direct blue 71 với sự có mặt của 2,5 mM VIO. Laccase từ *Trametes versicolor* có tốc độ loại màu thấp (5,67%) với màu reactive black 5 khi có mặt của HBT ở tỷ lệ màu/chất gắn kết 1:5, trong khi chỉ một mình laccase không thể loại được (Bibi *et al.*, 2012).



Hình 12. Khả năng loại màu thuốc nhuộm CLS (A); LF-2B (B) của dịch enzyme thô của chủng *Polyporus* sp. FBD154 khi có và không có mặt các chất gắn kết.

## KẾT LUẬN

Chủng nấm đảm FBD154 phân lập từ vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà thuộc tỉnh Lâm Đồng đã được định danh, thuộc lớp nấm đảm *Basidiomycetes*, chi *Polyporus* và được đặt tên là *Polyporus* sp. FBD154. Chủng *Polyporus* sp. FBD154 có khả năng sinh tổng hợp laccase với hoạt tính ban đầu là 4.233 U/l và tăng lên 74.925 U/l sau 4 ngày trên môi trường phù hợp có chứa dịch chiết 200 g/l khoai tây, 1 g/l casein, 1 g/l cám gạo, 5 g/l bột đậu tương, 10 g/l mannose, 0,3 mM CuSO<sub>4</sub>, 3 g/l NH<sub>4</sub>Cl, pH 4 và tốc độ lắc 200 v/phút, ở 30°C. Hiệu suất loại màu từ laccase thô sinh tổng hợp bởi chủng *Polyporus* sp. FBD154 với sự có mặt của 200 μM chất gắn kết lần lượt là 90% với màu Remazol brilliant blue R (RBBR); 80% màu Acid blue 281; 87% màu Acid red 299 (NY1); 92% màu Acid red 266 (NY7); 91% màu Everzol Red (LF-2B) và 73% màu Megafix black CLS (CLS). Sau 30 phút hiệu suất loại màu của RBBR, NY1, NY5 lần lượt là 83%, 60%, 52% khi không có mặt CGK.

Chủng *Polyporus* sp. FBD154 sinh tổng hợp laccase có hoạt tính cao và có khả năng loại được rất nhiều loại thuốc nhuộm hoạt tính như nhóm azo và

anthraquinone và có thể ứng dụng trong xử lý ô nhiễm môi trường.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Phân lập và chọn lọc vi sinh vật sinh enzyme ngoại bào ở vườn Quốc gia Bidoup- Núi Bà để tạo nguồn nguyên liệu cho phát triển các chế phẩm ứng dụng trong nông nghiệp, lâm nghiệp”, mã số : VAST.NDP.05/14-15 giai đoạn 2014-2015. Cảm ơn phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện cho tôi sử dụng mọi trang thiết bị để hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aktas N, Cicek H, Unal AT, Kibarer G, Kolankaya N, Tanyolac A (2001) Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. *Bioresour Technol* 80 (91): 29-36.
- Bibi I, Bhatti HN (2012) Biodecolorization of Reactive Black 5 by laccase mediator system. *Afri. Jour Biotech* 11(29): 7464-7471.
- Couto SR and Herrera JLT (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotech. Adv* 25: 558-

569.

Cui T (2009) Enhanced large-scale production of laccases from *Corioloopsis polyzona* for use in dye bioremediation. PhD thesis. The University of Westminster.

Cullen D (2002) Molecular genetics of lignin-degrading fungi and their applications in organopollutant degradation. *The Mycota XI Agricultural Application*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

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

Eggert C, Temp U, Eriksson KEL (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microb* 62: 1151-1158.

Galai S, Limam F, Marzouki MN (2009) A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase use in decolorization of synthetic dyes. *Appl Biochem Biotechnol* 416-431.

Hoàng Thị Nhung, Đinh Thị Thu Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà (2011) Sàng lọc chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp laccase và phân hủy các hợp chất đa vòng thơm, loại màu thuốc nhuộm. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 11 (2): 265-274.

Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B (2004) Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Pro. Biochem* 39(11): 1415-1419.

Jegatheesan M, Eyini M (2014) Response Surface Methodology Mediated Modulation of Laccase Production by *Polyporus arcularius*. *Arab J Sci Eng*.

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

Lorenzo M, Moldes D, Sanromán MA (2006) Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolorise dyes. *Chemosphere* 63(6): 912-7.

Martínez SMS, Gutiérrez-Soto G, Garza CFR, Galván TJV, Cordero JFC, Luna CEH (2013) Purification and partial characterization of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* CS-2 with ability to oxidize high redox potential substrates and recalcitrant dyes.

*Agricultural and Biological Sciences*.

Mechichi T, Mhiri N, Sayadi S (2006) Remazol Brilliant Blue R decolorization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere* 64: 998-1005.

Michniewicz A, Ullrich R, Ledakowicz S, Hofrichter M (2005) The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Appl Microb Biotech* 69(6): 1-7.

Nguyễn Nguyên Quang, Nguyễn Thị Lê, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2010) Phân hủy sinh học các hợp chất vòng thơm và thuốc nhuộm của chủng nấm sợi FBH11 phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại điểm nóng Biên Hòa. *Hội nghị Khoa học Kỷ niệm 35 năm thành lập Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. Hà Nội 2010: 392-398.

Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M, Moukha S (2000) Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 267: 1619-1625.

Reid ID (1989) Solid state fermentation for biological delignification. *Enz. Microb. Technol* 11: 786-803.

Rubia T, Ruiz E, Pérez J, Matínez J (2002) Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavio-alba* induced by vanillin. *Arch Microbiol* 179: 70-73.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Uzan E, Portet B, Lubrano C, Milesi S, Favel A, Lesage-Meessen L, Lomascolo A (2011) *Pycnoporus* laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 97-105.

Wang JW, Wu, JH, Huang WY, Tan RX (2006) Laccase production by *Monotropa* sp., and endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Bioresource Technology* 97(5): 786-789.

Wang Gao-jie, Cao Fu-xiang, Long Jiang-xue, Dong Xu-jie (2009) Growth Conditions of *Myrothecium melanosporum* For the Production of Laccase. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*.

Yeşilada Ö, Bırhanlı E, Ercan S, Özmen N (2014) Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. *Turk J Biol* 38: 103-110.

## **STUDY OF SUITABLE MEDIA FOR LACCASE SYNTHESIS OF BASIDIOMYCETE FUNGI FROM BIDOUP - NUIBA PARK AND ITS REACTIVE DYE DECOLORIZATION ABILITY**

**Tran Thi Thu Hien, Le Thi Hien, Nguyen Van Huynh, Dinh Thi Thu Hang, Dang Thi Cam Ha**<sup>✉</sup>

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

### SUMMARY

A fungal strain FBD154 with high laccase production was isolated from Bidoup-Nui Ba Parks, Lam Dong, Vietnam. FBD154 was identified as *Polyporus* sp. FBD154 based on traditional method and ITS sequence analysis. *Polyporus* sp. FBD154 synthesized laccase with high activity 74925 U/l on modified TSH1 (200 g/l containing potato extract, 1 g/l casein, 1 g/l rice bran, 5 g/l soybean meal, 10 g/l manose, 3 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0.3 mM CuSO<sub>4</sub>, pH 4). Crude laccase of *Polyporus* sp. FBD154 was applied to decolor several synthetic and commercial dyes. After 30 min, laccase from *Polyporus* sp. FBD154 could decolorize synthetic dyes at 100 mg/l concentration with efficiency of 60% acid red (NY1), 18% acid red 299 (NY7), 52% acid blue 281 (NY5) and 83% Remazol Brilliant Blue R (RBBR) without mediator. For commercial dyes at concentration of 100 mg/l, color removal efficiency reached to 62% megafix black CLS (CLS) and 72% everzol red LF2B (LF-2B) without mediator. Efficiency of synthetic dye removal by *Polyporus* sp. FBD154 crude laccase with 200 μM mediator obtained 90% RBBR with violuric acid (VIO) after 30 min; 80% NY5 with hydroxybenzotriazole (HBT) for 24 hours; 87% NY1 with acetosyringone (Ace) for 5 min; 92% NY7, 91% LF-2Band 73% CLS with syringaldehyde (Syr) for 5 min. The obtained evidences show that laccase was synthesized by *Polyporus* sp. FBD154 with high potential for application in wastewater treatment of textile plants in particular as well a sin detoxification of polycyclic aromatic compounds in general.

**Keywords:** *Decolorization, inducer, laccase, mediator, Polyporus*

---

<sup>✉</sup> Author for correspondence: E-mail: [dangcha80@gmail.com](mailto:dangcha80@gmail.com)