

## PHÂN LẬP *PHOMOPSIS* SP. N 7.2 SINH TỔNG HỢP LACCASE

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG MAI, LÊ QUANG HÒA, TÔ KIM ANH

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Laccase (EC 1.10.3.2, benzenediol: oxygen oxidoreductase) là một polyphenol oxidase có chứa nhiều nguyên tử đồng trong trung tâm hoạt động. Vốn là một glycoprotein, enzym này xúc tác sự oxy hóa các ortho và paradiphenol, aminophenol, polyphenol, polyamin, lignin và các aryl diamin cũng như một số các ion vô cơ. Một đặc điểm nổi bật khác của laccase là sự oxy hóa các cơ chất chỉ kèm theo sự khử oxy thành nước, khác với các peroxidase cần tới sự có mặt của các cofactor (như  $H_2O_2$ ). Mặt khác, tuy thế oxy hóa khử của laccase là nhỏ hơn so với các hợp chất không chứa nhóm phenol, do vậy nó không có khả năng oxy hóa trực tiếp các hợp chất này, nhưng bằng cách sử dụng các phân tử nhỏ có khả năng đóng vai trò như là chất vận chuyển electron trung gian, laccase có khả năng oxy hóa được nhiều cấu trúc không chứa nhóm phenol. Chính nhờ các đặc tính nêu trên mà laccase có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực đời sống, kinh tế xã hội như trong công nghiệp thực phẩm, công nghiệp giấy, ngành may mặc, xử lý môi trường và gần đây là trong sản xuất ethanol sinh học từ phụ phẩm nông nghiệp như đã trình bày ở trên. Do khả năng oxy hóa các hợp chất polyphenol, laccase liên quan tới rất nhiều quá trình sinh hóa. Trong môi trường, laccase đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy lignin và axit humic hoặc tổng hợp các hợp chất humic mới, và vì thế có vai trò quan trọng trong vòng tuần hoàn cacbon cũng như quá trình khử độc môi trường như oxy hóa các chất màu, thuốc nhuộm, các chất thơm... Laccase được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp bao gồm tẩy trắng giấy, tẩy màu của thuốc nhuộm vải và loại bỏ hợp chất phenol trong rượu, khử độc môi trường do nhiễm hợp chất hydrocacbon thơm. Các laccase liên quan tới khả năng khử lignin là các laccase ngoại bào được ứng dụng trong phân hủy các phế thải nông nghiệp giàu lignin, tạo liên kết ngang trong các vật liệu nguồn gốc lignin, khử độc cho dịch thủy phân lignocellulose trong sản xuất ethanol. Ngoài ra laccase còn được sử dụng trong ổn định sản phẩm bia, vang, nước uống, trong phát triển tế bào nhiên liệu [4, 10].

Về mặt phân bố, laccase đã được tìm thấy ở nhiều loại vi sinh vật. Ở vi khuẩn, hoạt tính laccase cũng đã được tìm thấy trong một số ít trường hợp. Tuy nhiên, tất cả các laccase hay protein tương tự laccase được tìm thấy ở vi khuẩn đều là nằm trong nội bào hay vùng ngoại vi tế bào chất (periplasm) khác với các laccase ở nấm mốc và thực vật bậc cao đều được tiết ra môi trường bên ngoài. Ở nấm mốc, enzym này đã được tinh sạch và đặc tính hóa từ hàng chục loài khác nhau. Các gen mã hóa cho nhiều laccase cũng đã được tách dòng và xác định trình tự, giúp cho việc phân lập các gen mã hóa các laccase mới trở nên dễ dàng hơn. Cũng cần nhấn mạnh rằng do khả năng sống ký sinh trên gỗ mà các loại nấm mục thường là nguồn gen để phân lập các gen mã hóa laccase. Một số nấm điển hình có khả năng tổng hợp laccase như nấm mốc *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Botrytis cinerea* [3], *Coprinus cinereus* hay các nấm lớn như *Pycnoporus cinnabarinus*. Các laccase nấm mốc cũng đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh lý bao gồm quá trình khử độc cho tế bào, quá trình nhiễm nấm mốc của thực vật [5].

Trong quá trình phân lập các chủng nấm mốc có hoạt tính laccase bền nhiệt cho mục tiêu xử lý lignin trong bã thải nông nghiệp, chủng N 7.2 phân lập được cho hoạt tính laccase khá bền nhiệt. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập laccase từ N 7.2 và khả năng thu nhận laccase từ chủng phân lập.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu phân lập

Các mẫu dùng cho phân lập là mẫu bùn thải của cơ sở nhuộm, bùn thải của nhà máy giấy và các mẫu rơm rạ mục. 56 chủng nấm mốc được phân lập từ các mẫu, được sàng lọc và kiểm tra hoạt tính laccase, lựa chọn chủng và định tên.

Chủng *Trametes multicolor* được dùng làm chủng chuẩn sinh laccase để kiểm chứng hoạt tính laccase của các chủng phân lập.

### 2.2. Phân lập các chủng nấm mốc sinh tổng hợp laccase

Các chủng nấm mốc sau khi đã được phân lập trên môi trường MEA (dịch chiết malt 20 g/l, chloramphenicol 100 mg/l, agar 20 g/l) (MT1), được cấy chấm điểm trên các môi trường chứa chất chỉ thị: môi trường MEA có bổ sung 0,5% axit tanic (MT2) [9], môi trường khoáng rắn (Glucose 10 g, Asparagine 3 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g, NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,02 mg, ZnCl<sub>2</sub> 2,5 mg, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,4 mg, MnCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0,09 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,07 mg, FeCl<sub>3</sub> 1 mg, thiamine 0,1mg, chloramphenicol 100mg, tween 80 0,05%, Vetraryl alcohol 0,2 mM) bổ sung 0,04% RBBR (MT3) [7, 9] nuôi ở 30°C trong 5 - 10 ngày. Những chủng cho khuẩn lạc có các vòng oxy hóa: màu nâu đậm xung quanh trên MT2 hoặc nhạt/mất màu môi trường trên MT3 được chọn để kiểm tra hoạt tính laccase.

### 2.3. Nuôi cấy vi sinh vật

Các chủng nấm mốc được hoạt hoá trên môi trường MEA lỏng (bổ sung glucose 10 g/l) ở nhiệt độ 30°C, trên máy lắc 200 vòng/phút trong 24 - 36 giờ, nuôi kiểm tra khả năng tổng hợp laccase trên môi trường MT4 [3, 8] (glucose: 10/l, malt extract: 0,5 g/l, cao nấm men: 1 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 5,5 g/l, pepton: 5 g/l, Mg.SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,6g/l, asparagine: 3g/l, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,4mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5 g/l, NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,02 mg/l, ZnCl<sub>2</sub>: 2,5 mg/l, MnCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O: 0,09 mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 0,07 mg/l, FeCl<sub>3</sub>:1 mg/l, thiamine:0,1 mg/l, chloramphenicol: 100 mg/l, tween 80: 0,05%, vetraryl alcohol: 0,2 mM) ở nhiệt độ 37°C, trên máy lắc 200 vòng/phút trong 4 - 10 ngày. Định kì lấy mẫu xác định sinh khối và hoạt tính enzyme.

### 2.4. Xác định hoạt tính laccase [1]

Dung dịch phản ứng enzyme gồm: 2,2 ml đệm phosphat 0,1M pH 6,5; 0,3 ml dung dịch syringaldazine 0,216 mM trong methanol, 0,5 ml dung dịch enzym. Trộn đều hỗn hợp phản ứng và đo độ tăng của độ hấp thụ tại 530nm của hỗn hợp phản ứng so sánh với mẫu kiểm chứng sau mỗi phút phản ứng. Phản ứng kiểm chứng sử dụng nước khử ion thay cho enzym.

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

### 2.5. Tách chiết DNA tổng số [2]

Cho 0,4 g bột sinh khối nấm mốc (thu nhận từ canh trường nấm mốc sau 5 ngày nuôi cấy nghiền trong nitor lỏng) vào ống eppendorf 2ml, bổ sung 1,6 ml dung dịch đệm chiết: 100 mM Tris-HCl pH 8,5; 20 mM EDTA (pH 8,5); 2% CTAB; 1,5 M NaCl; 2% PVP-40; 10 mM NaHSO<sub>3</sub>; 1% 2-mercaptoethanol. Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ 65°C trong 15 phút, ly tâm 10000 vòng/phút. Hút 800 µl dịch nổi cho vào ống eppendorf 2 ml chứa 800 µl hỗn hợp CIAA. Trộn đều và ly tâm 10000 vòng trong 5 phút. Hút 350 µl dịch nổi cho vào ống eppendorf chứa 700 µl isopropanol, đảo trộn đều và ly tâm 10000 vòng trong 15 phút. Đổ dịch nổi và rửa kết tủa bằng 1000 µl ethanol 70%. Hòa tan DNA trong 50 µl dung dịch đệm TE 1X. Giữ DNA ở -20°C.

## 2.6. Phản ứng PCR [6]

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 5 µl đệm ( 20 mM Tris-HCl; 20 mM KCl; 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 4 µl dNTP, 2 µl mỗi mỗi loại, 2 µl *Taq* DNA polymease (Fermentas), 2 µl khuôn DNA. Chu trình nhiệt bao gồm: 94°C trong 3 phút, nhân gen trong 27 chu trình: 94°C trong 30 giây, 58°C trong 30 giây, và 72°C trong 30 giây. Bước cuối cùng: kéo dài chuỗi ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR thiết kế có kích thước 500 bp. Kiểm tra sản phẩm bằng điện di trên 1% gel agarose.

## 2.7. Giải trình tự vùng ITS

Sản phẩm PCR được tinh sạch qua cột PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen). Kiểm tra độ sạch của sản phẩm PCR trên gel agarose và gửi giải trình tự. Trình tự thu được được so sánh với các trình tự ITS trên ngân hàng gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), qua đó, định tên nấm mốc.

# 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

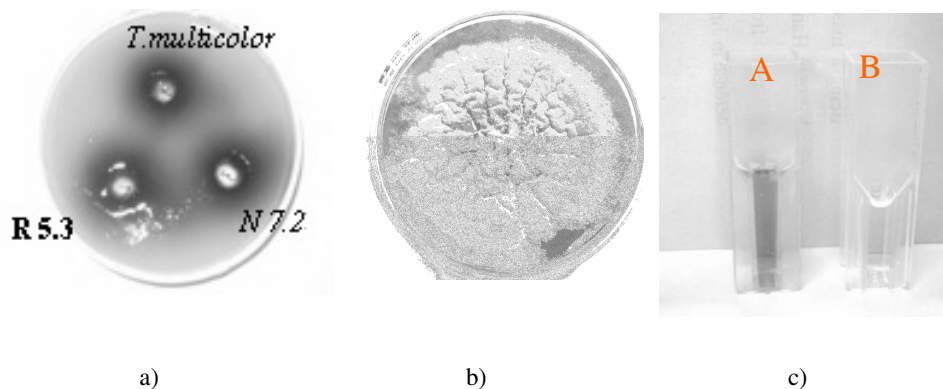
## 3.1. Phân lập nấm mốc tổng hợp laccase

Từ các mẫu môi trường, phân lập và thu được 56 chủng nấm mốc, trong đó, 24 chủng từ mẫu rơm, 14 chủng từ mẫu bùn thải nhuộm và 18 chủng từ mẫu dòng thải nhà máy giấy. Các chủng sinh laccase sau đó được sàng lọc trên môi trường MEA có bổ sung các chất chỉ thị để nhận biết chủng dương tính laccase.

Trên môi trường MT2 có bổ sung 0,5% axit tanic- được xem là chất cảm ứng sự phiên mã của laccase- trong số 56 chủng phân lập, 12 chủng có vòng oxy hóa axit tanic, làm môi trường có màu nâu đậm ở xung quanh khuẩn lạc (hình 3.1a), bao gồm 4 chủng thu được từ mẫu rơm, 3 chủng từ bùn thải cơ sở nhuộm, 05 chủng từ dòng thải nhà máy giấy.

Song song, 56 chủng cũng được thử hoạt tính trên môi trường MT3 chứa RBBR-được xem là chất chỉ thị trong phân lập các chủng có hệ enzyme phân hủy hợp chất mạch vòng. Kết quả cho thấy, từ 56 chủng nấm mốc, thu được 5 chủng có hoạt tính phân giải RBBR, làm nhạt màu môi trường chứa RBBR (hình 3.1b).

16 chủng dương tính thu được trên các môi trường chọn lọc được nuôi trên môi trường MT4 và kiểm tra định tính hoạt tính laccase với cơ chất đặc hiệu là syringaldazine. Các chủng có hoạt tính laccase là những chủng có canh trường tạo màu hồng khi cho phản ứng với Syringaldazine (hình 3.1c). Kết quả sàng lọc các chủng sinh nấm mốc laccase được đưa ra trong bảng 3.1.



Hình 3.1. Vòng oxy hóa cơ chất chỉ thị tanic (a), RBBR (b) và phản ứng định tính của laccase với syringaldazine (c. A-đương tính, c.B- âm tính)

Bảng 3.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính laccase trên môi trường chứa các chất chỉ thị

Chủng	RBBR	A. Tanic	Syring-aldazine	Chủng	RBBR	A. Tanic	Syring-aldazine
R <sub>5.3</sub>	+	++	+	N <sub>7.1</sub>	-	+	-
R <sub>1.1</sub>	-	+	-	N <sub>4</sub>	+	+	-
R <sub>3.1</sub>	-	+	-	N <sub>6</sub>	-	-	-
R <sub>5.1</sub>	-	+	-	GVĐ <sub>3</sub>	-	+	-
R <sub>7</sub>	+	-	-	GVĐ <sub>2</sub>	-	+	-
R <sub>2.1</sub>	+	-	-	GVĐ <sub>1.1</sub>	-	+	-
N <sub>7.2</sub>	+	++	++	GVĐ <sub>5.2</sub>	-	+	-
N <sub>3</sub>	+	-	-	GVĐ <sub>5.1</sub>	-	++	-

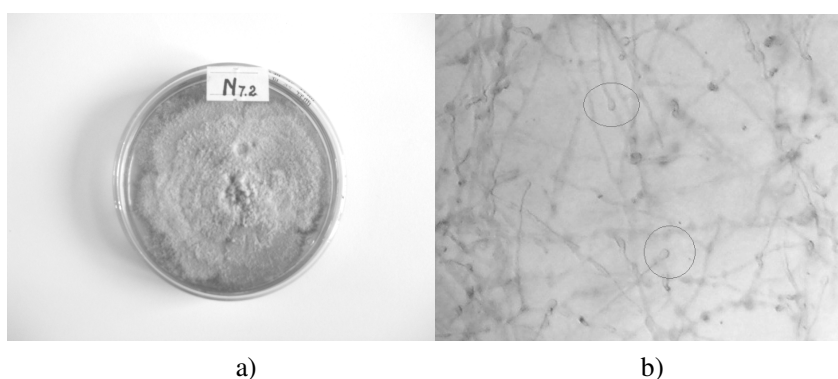
Sàng lọc các chủng trên môi trường chứa chất chỉ thị cho phép thu nhận tập một hợp chủng có khả năng tổng hợp hệ enzyme phân hủy các hợp chất mạch vòng, bao gồm 16 chủng có hoạt tính với các chất chỉ thị trên môi trường chọn lọc. Tuy nhiên, chỉ có canh trường của hai chủng phản ứng với syringaldazine sau 4 - 10 ngày nuôi cấy. Do cơ chất syringaldazine được xem là cơ chất đặc hiệu của laccase, do vậy, chỉ có 2 chủng dương tính với syringaldazine được xem là có khả năng tổng hợp laccase là N7.2 (phân lập từ dòng thải dệt nhuộm) và R5.3 (phân lập từ mẫu rơm).

Để đánh giá khả năng sinh laccase, hai chủng N 7.2 và R 5.3 được nuôi trên môi trường MT4 ở 30°C, pH 5, lắc 200 v/p trong thời gian 8 ngày. Hoạt độ enzym của hai canh trường được

đánh giá định kì. Kết quả cho thấy hai chủng nghiên cứu tích lũy enzyme cao nhất sau 8 ngày nuôi cấy, tương ứng là 84,76 UI/ml và 4,85 UI/ml. Hoạt tính enzyme của chủng N. 7.2. rất bền với thời gian, canh trường của N 7.2 vẫn giữ được hoạt tính laccase sau 4 tháng giữ ở 4°C. Đây là một trong các đặc tính quý của một enzyme, vì thế chủng N 7.2 được chọn để nghiên cứu tiếp.

### 3.2 Định tên chủng nấm mốc N 7.2

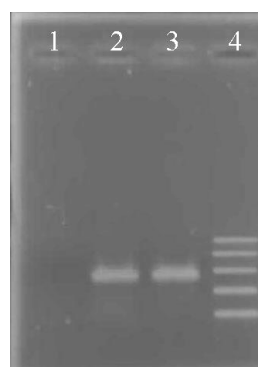
Chủng N 7.2 được nuôi trên hai môi trường MEA và PDA trong 5 ngày. Khuẩn lạc chủng N 7.2 có dạng các cánh tỏa đều, sợi màu chuyển từ trắng sang xám nhạt, rồi nâu, phát triển thành lớp trên môi trường PDA (hình 3.2a). Quan sát trên kính hiển vi, N 7.2 có cuống sinh bào tử nang, sợi nấm đa bào, có vách ngăn (hình 3.2b). Các quan sát này cho thấy N 7.2 có đặc điểm hình thái và khuẩn lạc đặc trưng của *Phomopsis* sp.



Hình 3.2. Đặc điểm hình thái N 7.2

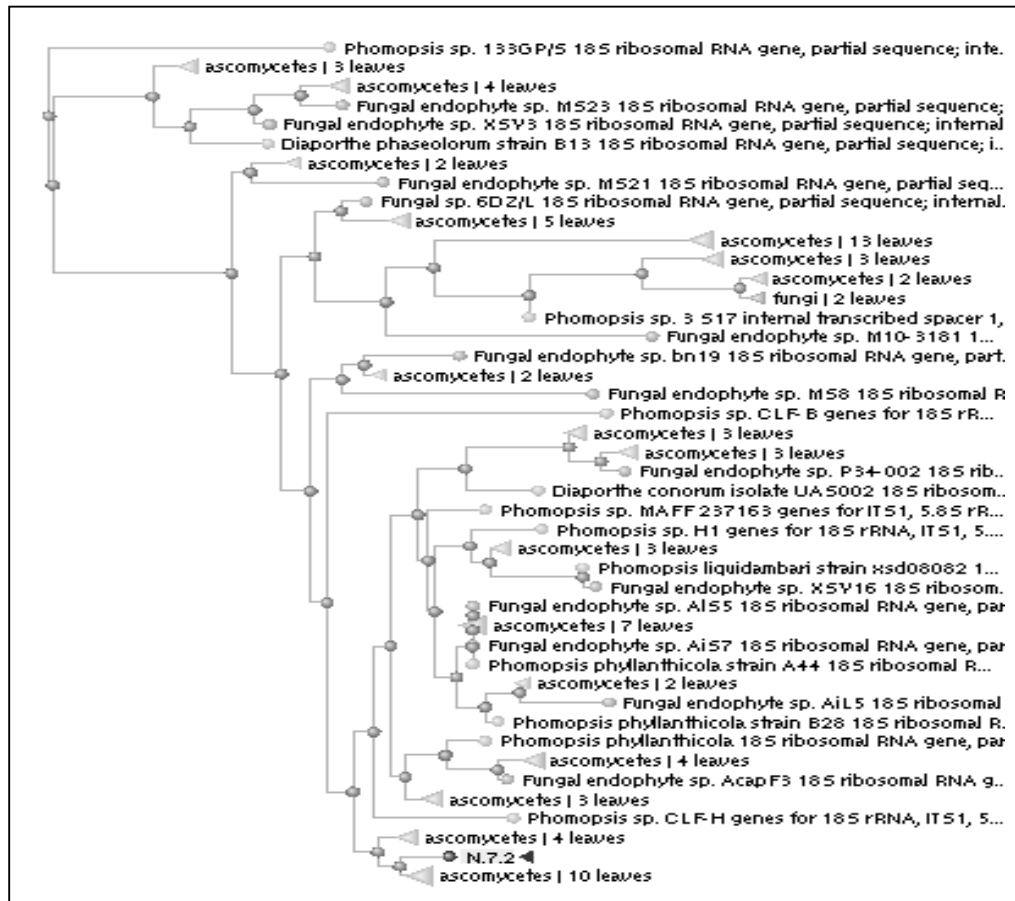
Song song, N 7.2 được định tên thông qua trình tự ITS. Sinh khối N 7.2 thu nhận sau khi lọc canh trường, rửa và phá vỡ tế bào để thu nhận DNA như đã mô tả trong phần phương pháp. Kiểm tra DNA thu được bằng điện di trên gel agarose 1% cho thấy DNA của N 7.2 sạch và đạt chất lượng cho các phản ứng tiếp sau.

Trình tự ITS của N 7.2 được nhân lên sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch với kit tinh sạch Qiagen. Điện di đồ sản phẩm PCR sau tinh sạch trên gel agarose cho thấy sản phẩm ITS sạch và đủ nồng độ cho xác định trình tự (hình 3.3).



1. Mẫu kiểm chứng âm tính;
2. Mẫu kiểm chứng dương tính;
3. Mẫu DNA của N 7.2 sau khi tinh sạch;
4. DNA ladder

Hình 3.3. Sản phẩm PCR nhân trình tự ITS N7.2

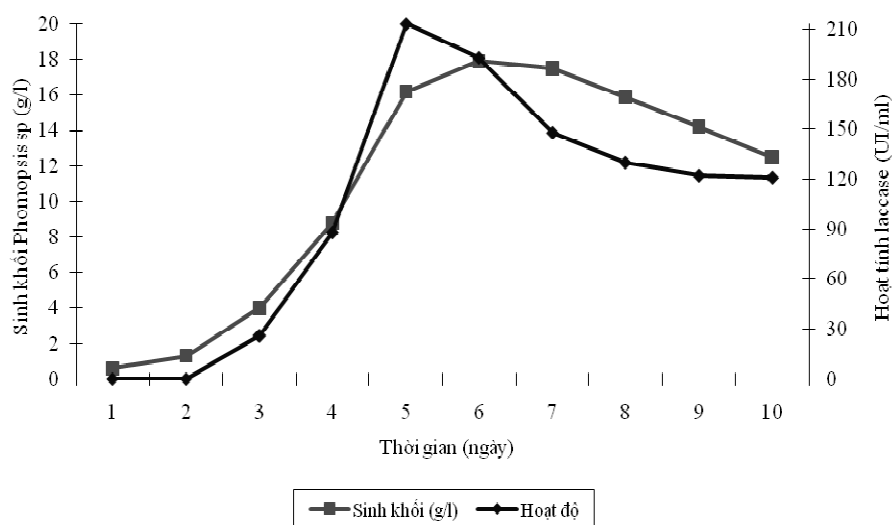


Hình 3.4 .Vị trí N.7.2 trong cây phân loại

Trình tự ITS của N 7.2 được xác định bao gồm 768 cặp base nitơ, có độ tương đồng 99% với trình tự ITS của *Phomopsis* sp. Kết hợp đặc điểm hình thái và đặc điểm trình tự ITS, chủng N 7.2 thuộc *Ascomycetes*, chi *Phomopsis*. Vị trí của N 7.2 trên cây phân loại được chỉ ra trên hình 3.4. *Phomopsis* sp N 7.2 là một nấm ký sinh không bắt buộc trên thực vật.

### 3.3. Động thái sinh tổng hợp laccase của *Phomopsis* sp N 7.2

Chủng *Phomopsis* sp N 7.2 được nuôi trên môi trường MT4 ở nhiệt độ 37<sup>0</sup>C trên máy lắc 200 v/phút. Lấy mẫu cách quãng sau 24 giờ xác định sinh khối và hoạt tính laccase. Đường cong sinh trưởng của nấm mốc được biểu diễn thông qua sinh khối tích lũy theo thời gian. 100 ml canh trường được lọc qua phễu lọc chân không, sinh khối thu được được sấy đến trọng lượng không đổi. Kết quả thể hiện ở hình 3.5.



Hình 3.5. Động thái sinh tổng hợp laccase của *Phomopsis* sp. N 7.2

Kết quả cho thấy N7.2 sinh trưởng mạnh trong 4 – 6 ngày, với hàm lượng sinh khối đạt từ 8,8 g/l đến 18 g/l, sau đó chuyển sang pha cân bằng từ ngày thứ 6. Sinh khối canh trường 4 ngày của N 7.2 trên môi trường MT5 có thể dùng làm vật liệu cấy và thu nhận mRNA cho tách dòng gen laccase.

Hoạt độ laccase của chủng cũng tăng mạnh đồng thời theo mức độ sinh trưởng của nấm mốc. Tại ngày thứ 3, khi sinh khối bắt đầu tăng, hoạt độ enzym cũng bắt đầu xuất hiện, hoạt độ enzym tăng mạnh từ 88,84 UI/ml lên đến giá trị cực đại 213,2 UI/ml vào ngày thứ 5, giảm dần ở ngày thứ 6 cho đến ngày thứ 10 (hoạt độ enzym laccase giảm từ 192,92 UI/ml xuống 122,72 UI/ml. Biểu đồ cũng cho thấy việc tổng hợp laccase trùng với pha sinh trưởng, có thể gợi ý cho việc tối ưu hóa điều kiện nuôi N 7.2 và thu nhận enzym đồng thời.

#### 4. KẾT LUẬN

N7.2 được phân lập từ bùn thải nhà máy dệt nhuộm, dương tính với RBBR và axit tanic, được định tên là *Phomopsis* sp. bằng kết hợp đặc điểm hình thái và trình tự ITS. N7.2 có khả năng tổng hợp laccase với hoạt tính cực đại đối với syringadizine là 213,2 UI/ml canh trường sau 6 ngày nuôi trên môi trường chứa chất cảm ứng vetraryl alcohol, Tween 80 là chất cảm ứng. Đây là công bố đầu tiên về khả năng tổng hợp laccase từ *Phomopsis* sp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Leonowicz, and K. Grzywnowicz.- Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, *Enzyme Microb. Technol.* **3** (1981) 55-58.
2. D. S. Puchooa and S. S. K. Ullhah - Genomic DNA Extraction From *Victoria amazonica*, *Plant Molecular Biology Reporter* **22** (2004) 195a–195j.

3. D. Slomczynski, J. P. Nakas, and S. W. Tanenbaum - Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34, Applied and Environmental Microbiology **3** (1995) 907-912
4. F. T. Christopher- The structure and function of fungal laccases, Microbiology **140** (1994) 19-26.
5. J. J. Roy, T. E. Abraham - Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **38** (2006) 31-36.
6. K. Boominathan, D'souza, Trevorm and C. A. Reddy - Isolation of Laccase Gene-Specific Sequences from White Rot and Brown Rot Fungi by PCR, Applied and Environmental Microbiology **10** (1996) 3739-3744.
7. K. S. Shin, I. K. Oh and C. J. Kim - Production and Purification of Remazol Brilliant Blue R Decolorizing Peroxidase from the Culture Filtrate of *Pleurotus ostreatus*, Applied and environmental microbiology **5** (1997) 1744-1748.
8. L. Levin, F. Forchiassin, A. M. Ramos - Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*, Mycologia **94** (2002) 377-383.
9. L. L. Kiiskinen, M. Ra'ito" and K. Kruus - Screening for novel laccase-producing microbes, Journal of Applied Microbiology **97** (2004) 640-646.
10. S. R. Couto, L. T. H. José – Industrial and biotechnological application of laccases: A review, Biotechnology Advances **24** (2006) 500-513.

## SUMMARY

### ISOLATION OF LACCASE PRODUCING *PHOMOPSIS* SP.N7.2

Among 56 strains collected from degraded rice straw, paper and dye effluent samples, 38 strains were positively screened as potentially laccase producers on the solid medium added with enzyme indicators (tannic acid and RBBR) but only two were positive with Syringaldazine. The strains N 7.2 identified as *Phomopsis* sp. via analysis of its ITS sequence can achieve an laccase activity towards Syringaldazine up to 213,2 UI/ml after 6 days of cultivation. To date, this is the first report on the laccase from *Phomopsis* sp.

*Địa chỉ:*

*Nhận bài ngày 2 tháng 10 năm 2009*

Viện Công nghệ sinh học – Công nghệ thực phẩm,  
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.