

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ ION KIM LOẠI LÊN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LACCASE Ở NẤM *Pleurotus* sp.

Nguy Thị Mai Thảo, Trần Văn Khuê, Lương Bảo Uyên*

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh, *baouyenih@yahoo.com

TÓM TẮT: Việc bổ sung ion kim loại vào môi trường nuôi cấy *Pleurotus* sp. có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp laccase của loài nấm này. Trong số các kim loại khảo sát, bổ sung Cu^{2+} với nồng độ 0,5 mM cho khả năng tăng hoạt tính laccase lên 105%, còn khi được bổ sung Cu^{2+} ở những ngày nuôi cấy khác nhau có sự khác biệt về thời gian cho hoạt tính laccase tối đa. Hoạt tính cao nhất đạt được là 1.333 U/ml và 1.407 U/ml sau 7 ngày nuôi cấy khi Cu^{2+} được bổ sung lần lượt ở ngày thứ 3 và 4 và hoạt tính đạt 1.332 U/ml sau 14 ngày nuôi cấy nếu Cu^{2+} được bổ sung sau 5 ngày nuôi. Nếu bổ sung Cu^{2+} vào những ngày nuôi cấy muộn hơn, ngày thứ 6 và 7, hoạt tính tối đa thấp hơn, đạt xấp xỉ 1.000 U/ml sau 11 ngày nuôi cấy. Các ion kim loại nặng hóa trị 2 khác như Co^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} lại là tác nhân ức chế sinh trưởng của nấm, vì vậy, hoạt tính laccase giảm so với mẫu đối chứng.

Từ khóa: *Pleurotus*, kim loại nặng, laccase, enzyme oxidase.

MỞ ĐẦU

Laccase (EC 1.10.3.2) (benzenediol:oxygen oxydoreductase) có bản chất là glycoprotein và có khả năng oxi hóa các hợp chất phi phenol tạo ra các gốc phenoxy với thể ion hóa tương đối nhỏ [14]. Có 4 nguyên tử đồng tham gia vào thành phần protein và hình thành 2 đến 3 cầu disulphide [6, 7, 9, 16, 17].

Kim loại nặng là một nhóm chất quan trọng điều biến hoạt tính laccase, những chất này hoặc hiện diện trong môi trường tự nhiên hoặc do con người thải vào. Ion kim loại tương tác và liên kết với các enzyme, làm thay đổi hoạt tính của enzyme bằng cách ổn định hay bất ổn định cấu hình protein.

Kết quả nghiên cứu của Ilyas et al. (2012) [8] thực hiện trên *P. ostreatus* cho thấy, trong môi trường nuôi cấy có bổ sung ion Co^{2+} với nồng độ thấp (0,1 mM) hoàn toàn không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của nấm và sinh tổng hợp laccase, ở nồng độ ion này càng cao thì sự ức chế sinh trưởng đối với nấm càng tăng.

Ảnh hưởng của Cd^{2+} lên hoạt tính laccase cũng khác nhau tùy thuộc loài nấm. Galhaup et al. (2002) [4] khảo sát trên *T. pubescens* cho thấy, Cd^{2+} ở nồng độ 5 μM làm tăng khả năng sinh tổng hợp laccase lên 2,7 lần. Trong khi đó, ở *Lentinula edodes*, trong môi trường có

nồng độ Cd^{2+} 1mM làm hoạt tính enzyme giảm 4,5 lần [13].

Những nghiên cứu gần đây cho thấy, ion Hg^{2+} làm ức chế sự sinh trưởng của nhiều loài nấm, do đó làm giảm khả năng sinh laccase ở các loài này. Sadhasivam et al. (2008) [13] khảo sát trên *Trichoderma harzianum* WL1 cho thấy hoạt tính laccase giảm 17,2%.

Nhiều loài nấm mốc trắng có khả năng tăng sinh tổng hợp laccase trong môi trường có nồng độ Mn^{2+} cao [2, 9]. *P. ostreatus* Em-1 cho hoạt tính laccase tăng 180,5% khi được bổ sung 10 mM ion Mn^{2+} [1].

Các nghiên cứu trên nhiều loài nấm như *T. versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *Coriolopsis rigida* và *T. pubescens* đều đã chứng minh sự điều hòa sản sinh laccase diễn ra trong quá trình phiên mã [5]. Phân tích nhiều gen quy định các isozyme laccase khác nhau ở *P. ostreatus* cho thấy sự tồn tại của vùng đáp ứng kim loại (MREs) là con đường cảm ứng kích hoạt các gen này [12].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng nấm *Pleurotus* sp. được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ enzyme, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa

học tự nhiên, ĐHQG tp. Hồ Chí Minh. Các hóa chất được mua từ các công ty Sigma và Merck.

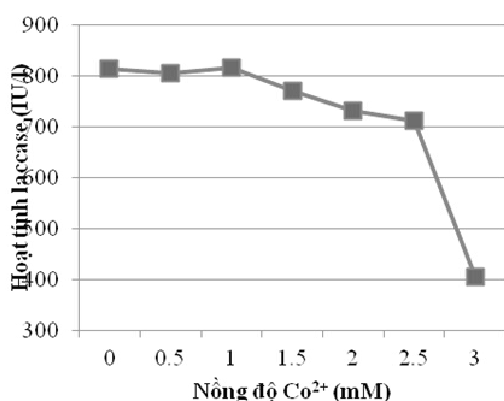
Nấm được cấy chuyền và giữ giống trên môi trường thạch PDA (Potato Dextrose Agar) bổ sung 2% cao nấm men. Sau 7 ngày phát triển ở nhiệt độ phòng, nấm được cấy vào môi trường PDA lỏng và nuôi cấy lắc trong 9 ngày.

Phương pháp xác định hoạt tính laccase

Dựa trên sự oxi hóa ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) bởi laccase thành hợp chất có màu xanh (blue-green) hấp thụ ánh sáng mạnh tại bước sóng 405 nm. Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1 μM sản phẩm từ ABTS trong thời gian 1 phút, ở điều kiện phòng thí nghiệm [11]. Hỗn hợp phản ứng gồm 900 μl đệm acetate 0,1 mM, pH 4,5, 50 μl dịch enzyme (pha loãng nếu cần), 50 μl ABTS. Phản ứng xảy ra khi cho ABTS vào hỗn hợp và đo giá trị mật độ quang ở 0 và 5 phút.

Khảo sát tác động của các ion kim loại lên hoạt tính laccase

Các kim loại được pha thành dung dịch mẹ có nồng độ cao và bổ sung vào môi trường nuôi cấy nấm để đạt nồng độ cuối cùng như mong muốn. Ion Cd²⁺ được đánh giá ở các nồng độ từ 0,5 mM đến 3,0 mM. Tương tự với các ion khác: ion Hg²⁺ từ 0,2 mM đến 1,0 mM; ion Mn²⁺ từ 0,5 mM đến 3,0 mM; ion Cu²⁺ từ 0,2 mM đến 1,0 mM.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ Co²⁺ lên hoạt tính laccase

Khảo sát thời gian bổ sung ion Cu²⁺ và thời gian nuôi cấy cho hoạt tính laccase cao nhất

Để đánh giá tác động của việc bổ sung ion Cu²⁺ ở những thời gian nuôi cấy khác nhau, môi trường nuôi cấy *Pleurotus* sp. được bổ sung CuSO₄ ở những ngày nuôi cấy thứ 3, 4, 5 và 6. Tương ứng với từng ngày bổ sung CuSO₄ hoạt tính laccase được xác định từ ngày nuôi cấy thứ 6 đến ngày thứ 15.

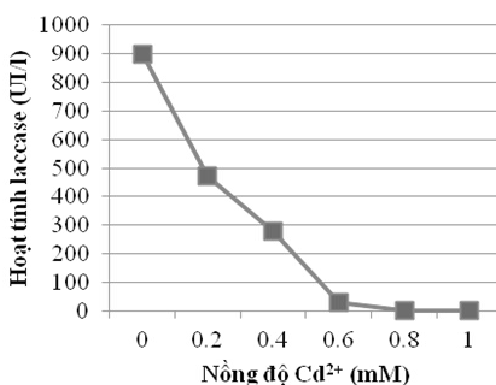
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được tiến hành ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

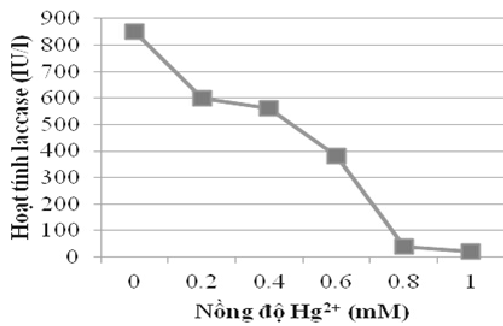
Ảnh hưởng của các ion kim loại lên khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *Pleurotus* sp.

Ảnh hưởng của Co²⁺

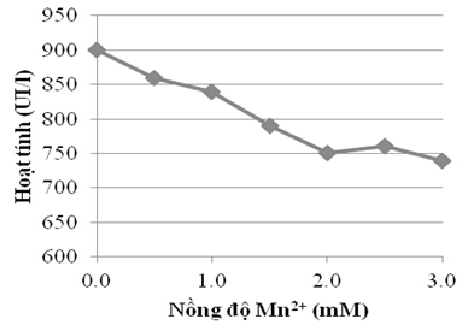
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của cobalt lên hoạt tính laccase được thể hiện trong hình 1. Trong môi trường với nồng độ Co²⁺ thấp (0,0-1,0 mM) hầu như nấm không bị ảnh hưởng. Tuy nhiên, với nồng độ Co²⁺ trong môi trường nuôi cấy cao hơn, hoạt tính enzyme giảm dần. Tại nồng độ 2,0 mM, hoạt tính laccase còn 90% và bắt đầu từ nồng độ 2,5 mM có xu hướng giảm rất nhanh, đạt 50% tại nồng độ Co²⁺ 3,0 mM. Tương ứng với kết quả của Ilyas et al. (2012) [8] thực hiện trên *P. ostreatus*, nồng độ ion Co²⁺ thấp (0,1 mM) không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của nấm và sinh tổng hợp laccase và ở nồng độ ion Co²⁺ càng cao thì sự ức chế sinh trưởng đối với nấm càng tăng.



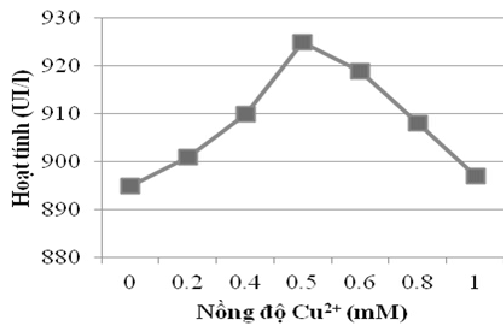
Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ Cd²⁺ lên hoạt tính laccase



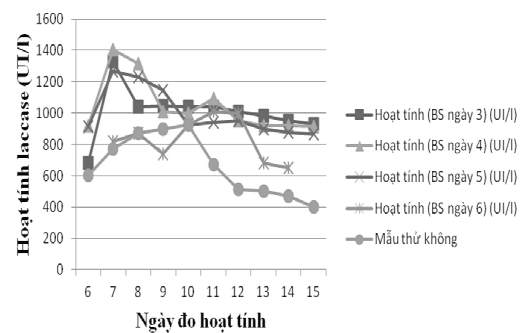
Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ Hg²⁺ lên hoạt tính laccase



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ Mn²⁺ lên hoạt tính laccase



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ Cu²⁺ lên hoạt tính laccase



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung Cu²⁺ vào môi trường lên hoạt tính laccase theo thời gian nuôi cấy

Ảnh hưởng của Cd²⁺

Kết quả hình 2 cho thấy, Cd²⁺ có tác động ức chế mạnh đến sự sinh trưởng của nấm *Pleurotus* sp. ngay từ nồng độ rất thấp. Ở nồng độ Cd²⁺ 0,6 mM, hoạt tính laccase giảm chỉ còn 3% và ở nồng độ 0,8 mM thì hoạt tính mất hoàn toàn.

Ảnh hưởng của Hg²⁺

Từ kết quả hình 3 có thể thấy, môi trường với nồng độ Hg²⁺ từ 0,2-0,8mM, hoạt tính laccase giảm nhanh chóng và gần như bằng 0 ở 1,0 mM.

Trong báo cáo của Tychanowicz et al. (2006) [15], hoạt tính enzyme giảm gần bằng 0UI/l khi môi trường nuôi cấy *P. pulmonarius* có nồng độ Hg²⁺ 1,0 mM.

Ảnh hưởng của Mn²⁺

Hình 4 cho thấy, ion Mn²⁺ có tác động ức chế nhẹ đến sự sinh tổng hợp laccase ở nấm

Pleurotus sp. khi tăng dần nồng độ. Trong môi trường với nồng độ Mn²⁺ hoạt tính laccase còn 95% so với mẫu thử không và giảm dần còn 82% ở nồng độ 3,0 mM.

Trong khi ở một số loài nấm khác, thí dụ như hoạt tính laccase tăng 180,5% ở *P. ostreatus* Em-1 khi bổ sung 10 mM ion Mn²⁺[12], tăng 4,5 lần trong môi trường có nồng độ Mn²⁺ 0,8 mM đối với *Coprinus comatus* [10].

Ảnh hưởng của Cu²⁺

Kết quả của chúng tôi cho thấy, sự sinh tổng hợp laccase tăng dần trong môi trường bổ sung dung dịch CuSO₄ từ 0,0-0,5 mM (hình 5). Hoạt tính laccase đạt cực đại khi nồng độ ion Cu²⁺ đạt 0,5 mM với hoạt tính 925 UI/l, tăng 105% so với môi trường không bổ sung Cu²⁺. Từ nồng độ 0,6-1,0 mM, sự sinh tổng hợp laccase giảm dần. Như vậy, khi nồng độ Cu²⁺ cao, chúng

không còn là tác nhân kích thích mà có xu hướng trở thành tác nhân ức chế hoạt tính laccase. Ion Cu^{2+} là yếu tố có vai trò kích thích sản xuất laccase ở nhiều chủng nấm [3]. Ở nồng độ 20 mM, Adamafio et al. (2012) [1] đã chỉ ra rằng CuSO_4 làm tăng hoạt tính laccase lên 324,4% trên *P. ostreatus* Em-1. Ở *P. pulmonarius*, hoạt tính laccase tăng từ 270 (mẫu thử không) lên 1420 UI/l trong môi trường bổ sung CuSO_4 với nồng độ 25 mM [15].

Ảnh hưởng của thời gian bổ sung CuSO_4 và thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp laccase của *Pleurotus* sp.

Hình 6 cho thấy, kết quả ảnh hưởng của ion Cu^{2+} khi bổ sung ở những thời điểm khác nhau lên hoạt tính laccase theo thời gian nuôi cấy. Khi bổ sung dung dịch CuSO_4 vào môi trường nuôi cấy ở ngày thứ 3, 4 và thứ 5, hoạt tính laccase cao nhất đạt được vào ngày thứ 7, tương ứng 1.333 UI/l, 1.407 UI/l và 1.268 UI/l tăng so với đối chứng ở cùng thời gian nuôi cấy lần lượt 1,7; 1,8 và 1,6 lần. Bổ sung dung dịch CuSO_4 vào môi trường nuôi cấy ở ngày thứ 6, hoạt tính laccase cao nhất vào ngày thứ 11 đạt 1.011 UI/l, cao gấp 1,5 lần so với đối chứng ở cùng thời gian nuôi cấy. Đối với mẫu thử không (mẫu đối chứng), hoạt tính laccase tăng dần từ ngày 6 và cao nhất ở ngày 10 đạt 923 UI/l. Sau ngày 10, hoạt tính bắt đầu giảm nhanh. Kết quả khảo sát cho thấy vào ngày 15 hoạt tính laccase chỉ còn 400 UI/l, giảm 67% (so với ngày thứ 10).

KẾT LUẬN

Việc bổ sung ion kim loại vào môi trường nuôi cấy *Pleurotus* sp. có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp laccase của nấm này.

Trong số các kim loại khảo sát, Cu^{2+} cho khả năng tăng hoạt tính laccase lên 105% khi được bổ sung với nồng độ 0,5 mM, còn bổ sung ion Cu^{2+} ở những ngày nuôi cấy khác nhau cho thấy có sự khác biệt về thời gian cho hoạt tính laccase tối đa.

Các ion kim loại nặng hóa trị 2 khác như Co^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} lại là tác nhân ức chế sự sinh trưởng và hoạt tính laccase tạo bởi nấm *Pleurotus* sp..

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn ban lãnh đạo Trường Đại học Khoa học tự nhiên,

Đại học Quốc gia tp. Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cũng như Bộ môn Sinh hóa thuộc khoa Sinh học đã cung cấp cho chúng tôi điều kiện tốt nhất để hoàn thành các thí nghiệm này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adamafio N. A., Sarpong N. S., Mensah C. A., Obodai M., 2012. Extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus* strain EM-1: thermal stability and response to metal ions. Asian Journal of Biochemistry, 7(3): 143-150.
2. Baldrian P., 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews, 30: 215-242.
3. Baldrian P., Gabriel J., 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiol. Lett., 206: 69-74.
4. Christiane Galhaup, Sabine Goller, Clemens K. Peterbauer, Josef Strauss² and Dietmar Haltrich, 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology, 148: 2159-2169.
5. Christopher F. T., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology, 140: 19-26.
6. Flurkey W. H., 2003. Laccase, in: John R. Whitaker, Alphons G. J. Voragen, Dominic W. S. Wong (ed), *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker Inc.: New York. pp. 503-515.
7. Hildén K., Hakala T. K., Lundell T., 2009. Thermotolerant and thermostable laccases. Biotechnol. Lett., 31: 1117-1128.
8. Ilyas S., Sultan S., Rehman A., 2012. Decolourization and degradation of azo dye, synozol red HF6BN, by *Pleurotus ostreatus*. Afr. J. Biotechnol., 11(88): 15422-15429.
9. Kunamneni A., Francisco J. P., Ballesteros A., Alcalde M., 2008. Laccases and their applications: a patent review. Recent Patent in Biotechnology, 2(2): 10-24.
10. Lu X., Ding S., 2010. Effect of Cu^{2+} , Mn^{2+} and aromatic compounds on the production

- of laccase isoform by *Coprinus comatus*. *Mycoscience*, 51(1): 68-74.
11. Osma J. F., Herrera J. L. T., Couto S. R., 2007. Banana skin: a novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. *Dyes and Pigments*, 75(1): 32-37.
 12. Pezzella C., Lettera V., Piscitelli A., Giardina P., Sannia G., 2012. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 97(2): 705-717.
 13. Sadhasivam S., Savitha S., Swaminathan K., Lin F. H., 2008. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43: 736-742.
 14. Srinivasan C., D'souza T. M., Boominathan K., Reddy C. A., 1995. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4274-4277.
 15. Tychanowicz G. K., De Souza D. F., Souza C. G. M., Kadowaki M. K., Peralta R. M., 2006. Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(5): 699-704.
 16. Xu F., Damhus T., Danielsen S., Østergaard L. H., 2007. Catalytic applications of laccase, in: Rolf D. Schmid, Vlada B. Urlacher (ed), *Modern Biooxidation - Enzymes, Reactions and Applications*. Wiley: Darmstadt. pp. 43-75.
 17. Yaropolov A. I., Skorobogat'ko O. V., Vartanov S. S., Varfolomeyev S. D., 1994. Laccase - properties, catalytic mechanism, and applicability, in: Ashok Mulchandani (ed), *Applied Biochemistry and Biotechnology. Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology*. Springerlink. pp. 257-280.

AFFECT ON BIOSYNTHESIS OF LACCASE FROM *Pleurotus* sp. BY SOME METAL IONS

Nguy Thi Mai Thao, Tran Van Khue, Luong Bao Uyen

Biology Faculty, University of Science, VNU, Ho Chi Minh city

SUMMARY

The biosynthesis of laccase from *Pleurotus* sp. can be effected by adding phenolic compounds or metal ions. In this study, laccase activity increased 105% when adding 0.5 mM CuSO₄ into culture media. Addition CuSO₄ in different time led to the highest activity of laccase achieved in the different days of cultivation. The highest laccase activity achieved 1,333 U/ml và 1,407 U/ml after 7 days cultivation if copper was added on the third and fourth day, however, when Cu²⁺ ion was added on the fifth day, the highest laccase activity attained 1,332 U/ml after 14 days. The highest laccase activity only reached 1,000 U/ml after 10 days cultivation in the samples, which CuSO₄ was added on day 6, 7. In contrast, other heavy metals such as: Co²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺ inhibit the growth and biosynthesis of laccase of this mushroom.

Keywords: *Pleurotus*, heavy metal, laccase, multicopper oxidase.

Ngày nhận bài: 15-7-2013