

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT LACCASE TỪ NẤM MỐC VÀ THỬ NGHIỆM ỨNG DỤNG TRONG PHÂN HUỖ HOÁ CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT

Đào Văn Huy¹, Mai Thị Thuý Linh²,
Lê Văn Thiện², Ngô Thị Tường Châu^{2,*}

TÓM TẮT

Tồn dư hoá chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) trong nông sản và môi trường đã ảnh hưởng không nhỏ đến sức khỏe con người và phá vỡ cân bằng sinh thái. Nhiều loài nấm được báo cáo là tạo ra laccase có khả năng phân huỷ các hóa chất độc hại. Mục tiêu của nghiên cứu này là tối ưu hoá quá trình sản xuất laccase và thử nghiệm ứng dụng laccase trong phân huỷ HCBVTV. Laccase được sản xuất từ chủng nấm mốc *Penicillium chrysogenum* N2 trong môi trường muối khoáng tối thiểu (MSB) bổ sung bột rom lúa hoặc bột trấu lúa với các tỉ lệ khác nhau. Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và ion kim loại đến hoạt tính của laccase được khảo sát. Hoạt tính laccase được xác định dựa trên sự oxy hóa ABTS. Khả năng phân huỷ HCBVTV (Cartap, Cypermethrin và Chlopyrifos) được đánh giá. Hàm lượng HCBVTV được xác định bằng phương pháp QuEChERS (EN 15662). Kết quả cho thấy, điều kiện thích hợp cho sản xuất laccase là môi trường MSB bổ sung 5% bột rom, ở 25°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, 8 ngày. Điều kiện tối ưu cho hoạt tính laccase là pH 5 và 45°C. Chế phẩm laccase có thể phân huỷ Cartap, Cypermethrin và Chlopyrifos với hiệu quả cao. Vì vậy, laccase từ *P. chrysogenum* N2 có thể được xem là một tác nhân xử lý sinh học tiềm năng trong phân huỷ tồn dư HCBVTV.

Từ khoá: Hoá chất bảo vệ thực vật, laccase, nấm mốc, *P. chrysogenum* N2, xử lý sinh học.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Laccase là một thành viên của enzyme glycoprotein đa phân tử thuộc họ oxidoreductase. Laccase chứa 4 nguyên tử đồng (Cu) và 2 cầu liên kết disulfide phân bố trong 3 vùng khác nhau gọi là T1, T2 và T3. Quá trình oxy hóa cơ chất xảy ra ở vùng T1 thông qua trình tự tripeptide His-Cys-His, sau đó các điện tử được chuyển đến trung tâm ba hạt nhân T2/T3 và diễn ra sự khử O₂ thành nước [1]. Laccase được tìm thấy ở thực vật bậc cao và nhiều loài vi sinh vật. Tuy nhiên, laccase ở vi khuẩn thường nằm trong nội bào và laccase từ nấm mốc được phát hiện là có khả năng khử cao hơn nhiều so với thực vật bậc cao. Một số nấm điển hình có khả năng tổng hợp laccase cao như

Trametes versicolor, *Pleurotus ostreatus* và *Aspergillus nidulans* [2]. Laccase từ nấm cũng đã được sử dụng thành công trong phân huỷ cấu trúc phức tạp của nhiều HCBVTV [3, 4] và tạo ra các sản phẩm vô hại [5].

Việt Nam là nước nông nghiệp với diện tích canh tác lớn, điều kiện khí hậu thuận lợi, chủng loại cây trồng phong phú nên nhu cầu sử dụng HCBVTV để kiểm soát dịch bệnh khá cao. Ước tính chỉ có 5% lượng HCBVTV sử dụng đến được với sinh vật đích, phần còn lại cùng với các sản phẩm biến đổi của chúng được phân tán vào môi trường [6]. Do đó, việc phát triển giải pháp sử dụng laccase một cách hiệu quả và tiết kiệm chi phí để xử lý HCBVTV là rất cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu này là: (i) tối ưu hoá quá trình lên men sản xuất laccase từ chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 và (ii) thử nghiệm ứng dụng laccase trong phân huỷ một số loại HCBVTV (Cartap, Cypermethrin và Chlopyrifos).

¹ Ban Tổ chức cán bộ, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email: ngotuongchau@hus.edu.vn

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, hoá chất, thiết bị

- Chủng nấm mốc *Penicillium chrysogenum* N2 có khả năng phân huỷ lignin đã được phân lập từ mẫu hỗn hợp đất và mùn cưa tại Thừa Thiên Huế [7], hiện đang được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Nghiên cứu Môi trường và Thực phẩm, Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.



Hình 1. Chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 có khả năng phân huỷ lignin cao [7]

- Hoá chất:

+ Môi trường muối khoáng tối thiểu (minimal salt broth- MSB) có thành phần như sau (g/l): glucose 10; KH_2PO_4 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01; ammonium tartrate 0,22; 2,2-dimethylsuccinic acid 2,9; thiamine 0,1; Tween 80 0,1% (v/v), veratryl alcohol 1,5 mM 50 và dung dịch các yếu tố vi lượng (có thành phần mg/l: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 80; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 33; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 43; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50) 10 ml/l. Glucose, thiamine, Tween 80, veratryl alcohol và các nguyên tố vi lượng được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,45 μm và thêm vào môi trường sau hấp khử trùng ở 121°C–15 phút [8].

+ Bột rơm lúa (kích thước hạt 2–3 mm) và bột trấu lúa (kích thước hạt 0,4–0,7 mm).

+ ABTS [2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)].

+ Dung dịch các ion kim loại: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} và Ag^+ .

+ Các loại HCBVTV có độ tinh khiết cao: Cartap [(1,3-bis(carbamoylthio)-2-(N,N-dimethylamino) propane hydrochloride, $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}_2$, CAS No. 22042-59-7]; Cypermethrin [3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic axit, $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$, CAS No. 52315-07-8] và Chlorpyrifos [(O, O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothiate, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$, CAS No. 2921-89-2] (Sigma- Aldrich).

- Thiết bị: Tủ an toàn sinh học (Biovanguard 4/AZBIL TELSTAR- Tây Ban Nha); tủ ẩm ổn nhiệt (Memmert - Đức); máy lắc ổn nhiệt (Innova 44R/Eppendorf - Đức); máy ly tâm (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Germany); bể siêu âm (Nahita, Model 626/6, Alea Equipment); bể ổn nhiệt (BS-06/Jeiotech - Hàn Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị giống nấm mốc

Từ ống thạch nghiêng giữ giống, chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 đã được cấy lên các đĩa thạch chứa môi trường PDA và nuôi cấy trong 7 ngày. Sau đó, cấy 3 nút thạch chứa nấm mốc đã phát triển (đường kính 6 mm) vào các bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường PDB, nuôi cấy lắc 150 vòng/phút, ở 30°C, trong 7 ngày. Dịch nuôi cấy sau đó được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ phần dịch nổi và thu sinh khối nấm mốc ở dạng ướt (hiệu suất thu đạt 10 g sinh khối ướt/100 ml dịch nuôi cấy).

2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính laccase

Chuẩn bị một hỗn hợp phản ứng (thể tích 1 ml) chứa dung dịch đệm axetic axit - natri axetat 100 mM (pH 4,5), 1 mM ABTS (nồng độ cuối cùng) và 20 μl dịch enzyme thô. Ủ hỗn hợp phản ứng trên ở 40°C trong 10 phút. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM/cm}$) trên máy quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-VIS) [9]. Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để oxy hoá 1 μM ABTS trong 1 phút.

2.2.3. Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sản xuất laccase của chủng nấm mốc

Sinh khối nấm sau khi được chuẩn bị theo phương pháp nêu ở mục 2.2.1 đã được cấy vào các bình tam giác thể tích 500 ml chứa 150 ml các loại môi trường sau: (i) MSB; (ii) MSB-1 gồm MSB (không chứa glucose) + 5% bột rom lúa; (iii) MSB-2 gồm MSB (không chứa glucose) + 10% bột rom lúa; (iv) MSB-3 gồm MSB (không chứa glucose) + 5% bột trấu lúa; (v) MSB-4 gồm MSB (không chứa glucose) + 10% bột trấu lúa. Nuôi cấy lắc ở 150 vòng/phút, ở 30°C trong 22 ngày. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thu dịch nuôi cấy (dịch enzyme thô) sau mỗi 2 ngày bằng cách ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút để xác định hoạt tính laccase theo phương pháp đã nêu ở mục 2.2.2. Việc lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp dựa vào số đơn vị hoạt độ của laccase được tạo thành.

2.2.4. Lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho sự sản xuất laccase của chủng nấm mốc

Nuôi cấy chủng nấm mốc trong môi trường nuôi cấy thích hợp ở các mức nhiệt độ 25°C, 30°C và 35°C. Thu dịch enzyme thô và xác định hoạt tính laccase như trên. Việc lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy thích hợp dựa vào số đơn vị hoạt độ của laccase được tạo thành.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính của laccase

Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính của laccase được khảo sát trong phạm vi pH 3–8

trong đệm natri axetat 100 mM và nhiệt độ 25–50°C, sử dụng ABTS làm cơ chất (mục 2.2.2). Hoạt tính laccase tại pH và nhiệt độ tối ưu được xác định là 100%.

2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của laccase

Ảnh hưởng của các ion kim loại (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} và Co^{2+}) đến hoạt tính laccase được xác định bằng cách bổ sung 5 mM các ion kim loại vào hỗn hợp phản ứng (mục 2.2.2) tại pH và nhiệt độ tối ưu. Hoạt tính laccase khi không có mặt của các ion kim loại (control) được xác định là 100%.

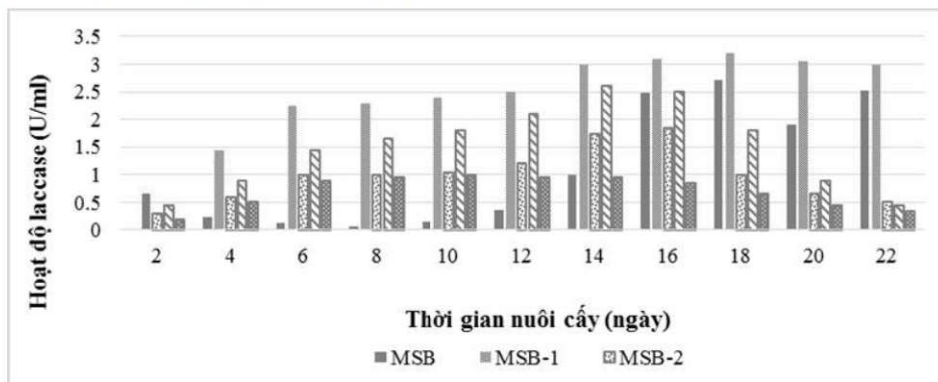
2.2.7. Thử nghiệm ứng dụng laccase trong phân huỷ HCBVTV

Chuẩn bị các ống nghiệm thể tích 10 ml chứa đệm natri axetat 100 mM (pH 5,0), bổ sung 20 mg/l mỗi loại HCBVTV (Cartap, Cypermethrin và Chlorpyrifos) và ủ trong bóng tối ở 45°C. Thu mẫu sau 8 ngày ủ. Nồng độ HCBVTV còn lại trong mẫu được xác định bằng phương pháp QuEChERS (EN 15662). Tất cả thử nghiệm và đối chứng đều được lặp lại 3 lần.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sản xuất laccase của chủng nấm mốc

Tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *P. chrysogenum* N2 trong 5 loại môi trường khác nhau, kết quả được trình bày ở hình 2.

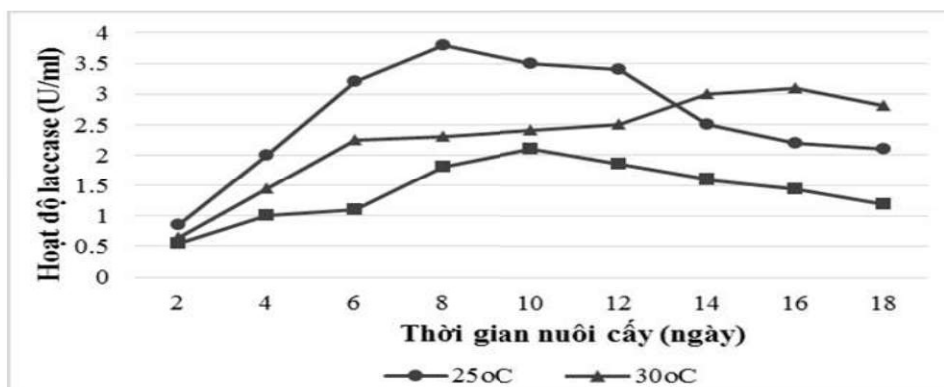


Hình 2. Khả năng sản xuất laccase ở các môi trường khác nhau

Hình 2 cho thấy khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng nấm mốc đạt cao nhất trong môi trường MSB-1 (hoạt độ đạt 3,2 U/ml) sau 18 ngày nuôi cấy. Sau đó, hoạt động sinh tổng hợp laccase giảm dần. Điều này có thể là do các điều kiện bất lợi mà chủng nấm mốc gặp phải đã khiến cho khả năng sinh trưởng và phát triển của chúng suy giảm, dẫn đến sự sinh tổng hợp laccase cũng giảm theo. Tương tự, Xu và cs (2015) cho rằng, chủng *Trametes versicolor* BBEL0970 có khả năng tích lũy laccase cao hơn khi thay thế glucose bằng bột rom lúa mì trong môi trường muối khoáng tối thiểu [8]. Vì vậy, môi trường MSB-1 được lựa chọn cho nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ thích hợp cho sản xuất laccase.

3.2. Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho sự sản xuất laccase của chủng nấm mốc

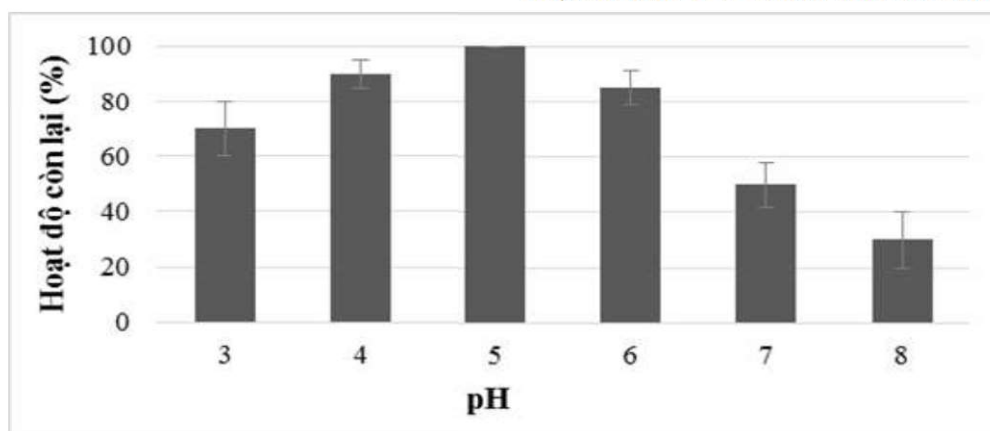
Tiến hành khảo sát khả năng sản xuất laccase của chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 trong môi trường thích hợp ở các mức nhiệt độ 25°C, 30°C và 35°C, kết quả được trình bày ở hình 3. Qua đó cho thấy, khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng nấm mốc đạt cao nhất trong môi trường MSB-1 ở nhiệt độ 25°C sau 8 ngày nuôi cấy (hoạt độ đạt 3,8 U/ml), tiếp đến là ở nhiệt độ 30°C sau 14 ngày nuôi cấy (hoạt độ đạt 3,1 U/ml). Vì vậy, nhiệt độ 25°C được lựa chọn cho nghiên cứu sản xuất laccase tiếp theo.



Hình 3. Khả năng sản xuất laccase ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau

3.3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của laccase

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt tính và độ bền của laccase từ chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2, kết quả được thể hiện ở hình 4.



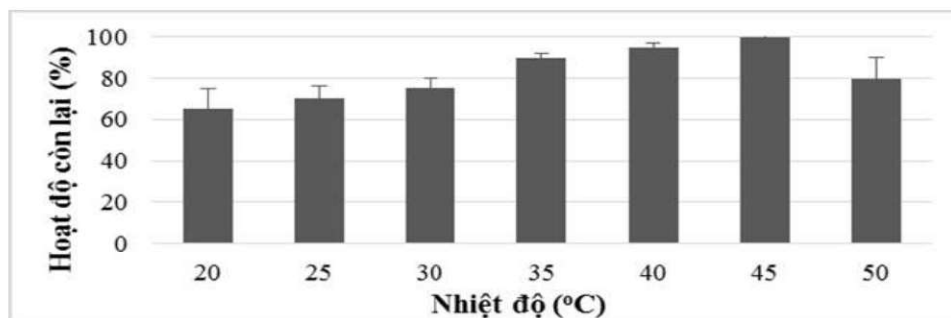
Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của laccase

Qua đó cho thấy, giá trị pH tối ưu cho hoạt tính laccase của chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 là 5,0. Ở các mức pH > 5,0 hoạt tính của laccase giảm dần, thậm chí hoạt tính chỉ còn lại 30% ở pH 8,0. Kết quả này tương tự với các công bố trước đây khi cho rằng hầu hết pH tối ưu cho hoạt tính của laccase nấm mốc là 5,0 [10]. Ngoài ra, giá trị pH tối ưu còn phụ thuộc vào các loại cơ chất khác nhau, tuy nhiên laccase chỉ thể hiện hoạt tính cao trong một phạm vi pH axit hẹp (3,0–4,5). Ở pH > 5,0, hoạt tính laccase của chủng nấm mốc

Paraphoma sp. GZS18 giảm nhanh chóng và chỉ còn lại 45% so với hoạt tính cực đại, thậm chí ở pH 6,0 laccase cơ bản không thể oxy hoá được các cơ chất [11].

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của laccase

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của laccase từ chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2, kết quả được thể hiện ở hình 5.



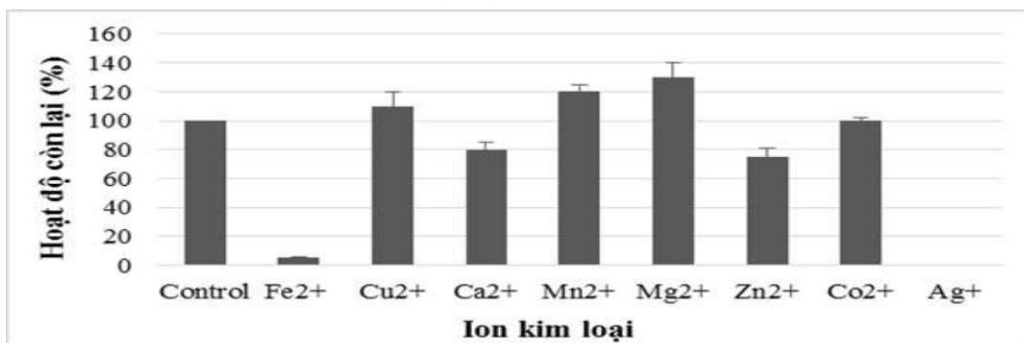
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính và độ bền của laccase

Hình 5 cho thấy, phạm vi nhiệt độ thích hợp cho hoạt tính laccase của chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 là 35–45°C với nhiệt độ tối ưu là 45°C. Tương tự, hoạt tính laccase cao nhất của chủng *Rigidoporus lignosus* đã được quan sát tại nhiệt độ 35–45°C và nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính laccase của chủng *Coriolus hirsutus* là 45°C [12]. Đồng thời, laccase nấm mốc nói chung có nhiệt độ phản ứng tối ưu ở 45°C [13]. Tuy nhiên, theo Jin và cs (2016), chủng nấm *T. versicolor* được tuyển chọn có hoạt tính laccase cao nhất ở nhiệt độ thấp

hơn (25°C) [10]. Trong nghiên cứu này, khi tăng nhiệt độ lên 50°C, hoạt tính của laccase chỉ còn lại 80%.

3.5. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của laccase

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của laccase từ chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2, kết quả được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của laccase

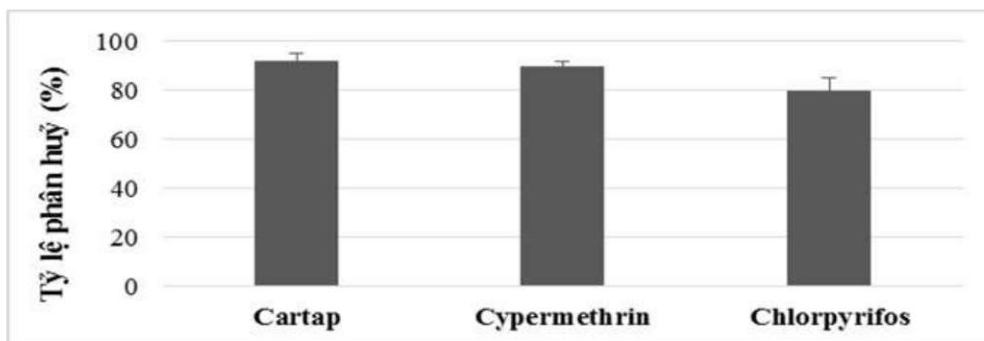
Hình 6 cho thấy, ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính của laccase đã được phát hiện. Ở nồng độ 5 mM, sự có mặt của các ion Cu^{2+} , Mn^{2+} và Mg^{2+} đã làm tăng hoạt tính của laccase, trong khi Ca^{2+} , Zn^{2+} lại làm giảm hoạt tính của laccase và Co^{2+} lại hầu như không làm thay đổi hoạt tính của laccase so với đối chứng. Đáng chú ý là sự có mặt của Fe^{2+} đã làm suy giảm đáng kể hoạt tính của laccase, thậm chí Ag^+ đã ức chế hoàn toàn hoạt tính của laccase.

Đồng là nguyên tố quan trọng cho hoạt động của laccase. Các ion Cu^{2+} tồn tại trong dung dịch có tác dụng kích hoạt đối với hầu hết các laccase và tác dụng ức chế đối với một số laccase nhất

định. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng Cu^{2+} (thậm chí ở nồng độ thấp, chẳng hạn như 0,1 mM) cũng thể hiện tác dụng kích hoạt laccase [13]. Theo Chernykh và cs (2008), Cu^{2+} có tác dụng kích hoạt laccase ở nồng độ thấp và chúng có tác dụng ức chế laccase ở nồng độ cao [14].

3.6. Khả năng phân hủy HCBVTV của laccase

pH và nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của laccase và sự phân hủy HCBVTV được xúc tác bởi chúng [10]. Vì vậy trong thử nghiệm này các giá trị pH (5,0) và nhiệt độ tối ưu (45°C) đã được sử dụng để đánh giá khả năng ứng dụng laccase vào phân hủy các loại HCBVTV. Kết quả được thể hiện ở hình 7.



Hình 7. Khả năng phân hủy HCBVTV của laccase

Hình 7 cho thấy laccase của chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 có khả năng phân hủy Cartap, Cypermethrin và Chlorpyrifos (20 mg/l) lần lượt theo các tỷ lệ 92%, 90% và 80%. So với laccase của chủng nấm *T. versicolor* được báo cáo bởi Jin và cs (2016), tỷ lệ phân hủy Chlorpyrifos bởi laccase của chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2 là tương đương nhau (đạt gần 80%) [10]. Vì vậy, ngoài ứng dụng trong xử lý chất thải nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm, phân hủy thuốc và mỹ phẩm, loại màu thuốc nhuộm, phân hủy chất thải công nghiệp giấy và bột giấy [15], laccase của nấm mốc thật sự có tiềm năng trong phân hủy tồn dư HCBVTV.

4. KẾT LUẬN

Đã tối ưu hoá quá trình lên men sản xuất laccase của chủng nấm mốc *P. chrysogenum* N2

và thử nghiệm ứng dụng laccase trong phân hủy một số loại HCBVTV. Môi trường và điều kiện lên men thích hợp cho quá trình sản xuất laccase được xác định là môi trường MSB bổ sung 5% bột rơm (MSB-1), ở nhiệt độ 25°C , tốc độ lắc 150 vòng/phút, trong 8 ngày. Điều kiện tối ưu cho hoạt tính laccase là pH 5,0 và nhiệt độ 45°C . Chế phẩm laccase có thể phân hủy Cartap, Cypermethrin và Chlorpyrifos (nồng độ 20 mg/l) với hiệu quả cao (lần lượt đạt tỷ lệ 92%, 90% và 80%). Vì vậy, laccase từ *P. chrysogenum* N2 có thể được xem là một tác nhân xử lý sinh học tiềm năng trong phân hủy tồn dư HCBVTV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mayolo-Deloya, K., González-González, M., Rito-Palomares, M. (2020). Laccases in food

industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological appliions. *Front Bioeng Biotechnol* 8, 222. doi: 10.3389/fbioe.2020.00222.

2. Ratan, K. S., Waman, B. J., Bomblay, K. M., Maind, M. S. (2020). Production of Fungal Laccase from Beer Industry Waste and Its Appliion in Biodegradation of Pesticides. *Adv Ind Biotechnol* 3, 012.

3. Castillo, M. D. P., Torstensson, L., Stenström, J. (2008). Biobeds for environmental protection from pesticide use - a review. *J. Agric Food Chem*, 56, 6206–6219.

4. Pizzul, L., Castillo, M. D. P., Stenström, J. (2009). Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation* 20, 751–759.

5. Mir-Tutusaus, J. A., Masís-Mora, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2014). Degradation of selected agrochemicals by the white rot-fungus *Trametes versicolor*. *Sci. Total Environ* 500, 235–242.

6. Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (2009). Halogenated pesticide transformation by a laccase mediator system. *Chemosphere* 77, 687–692.

7. Thien, L. V., Huy, D. V., Chau, N. T. T. (2021). Development of a Novel Biomixture for Pesticide Degradation and Detoxifiion in Vietnam. *Chiang Mai J. Sci.* 48(4), 1021–1035.

8. Xu, C., Singh, D., Dorgan, K. M., Zhang, X., Chen S. (2015). Screening of ligninolytic fungi for biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Can. J. Microbiol*, 61(10), 745–752. doi: 10.1139/cjm-2015-0156.

9. More, S. S., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S., Veena, S. M. (2011). Isolation, purifiion and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* spp. *Enzyme Res* 2011: 7. doi:10.4061/2011/248735.

10. Jin, X., Yu, X., Zhu, G., Zheng, Z., Feng, F., Zhang, Z. (2016). Conditions Optimizing and Appliion of Laccase-mediator System (LMS) for the Laccasecatalyzed Pesticide Degradation. *Scientific Reports* 6, 35787. doi: 10.1038/srep35787.

11. Du, W., Sun, C., Wang, J., Wang, B., Yao, Z., Qu, F., Xia, J., Xie, W., Sun, J., Duan, D. (2018). Isolation, identification of a laccase - producing fungal strain and enzymatic properties of the laccase. *3 Biotech* 8, 137. doi: 10.1007/s13205-018-1149-7.

12. Shin, K. S., Lee, Y. J. (2000). Purifiion and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch Biochem Biophys* 384, 109–115.

13. Du, W., Sun, C., Liang, J., Han, Y., Yu, J., Liang, Z. (2015). Improvement of laccase production and its characterization by mutagenesis. *J. Food Biochem* 39, 101–108.

14. Chernykh, A., Myasoedova, N., Kolomytseva, M., Ferraroni, M., Briganti, F., Scozzafava, A., Golovleva, L. (2008). Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* strain 1833. *J. Appl. Microbiol* 105, 2065–2075.

15. Paraschiv, G., Ferdes, M., Ionescu, M., Moiceanu, G., Zabava, B. S., Dinca, M. N. (2011). Laccases - Versatile Enzymes Used to Reduce Environmental Pollution. *Energies* 15, 1835. doi: 10.3390/en15051835.

**PRODUCTION OF FUNGAL LACCASE AND ITS APPLICATION
IN BIODEGRADATION OF PESTICIDES**

**Dao Van Huy, Mai Thi Thuy Linh,
Le Van Thien, Ngo Thi Tuong Chau**

Summary

Residues of pesticides in agricultural products, soils, waters and airs due to their overuse in crop production have significantly affected human health and disturbed the balance in ecosystem. Many bacteria and fungi have been reported to produce laccases capable of degrading toxic and structurally complex chemicals. This study aimed to optimize the fermentation process for laccase production and test the application of laccase in biodegradation of pesticides. Laccase production was carried out using *Penicillium chrysogenum* N2 in Minimal Salt Broth (MSB) supplemented with substrates as rice straw powder or rice husk powder at different ratios. Effects of pH, temperature and metal ions on laccase activity were investigated. Laccase activity was determined based on oxidation of ABTS. Degradation of three commercial grade pesticides (Cartap, Cypermethrin and Chlorpyrifos) were assessed. Concentrations of pesticides were determined by QuEChERS (EN 15662) method. The results showed that the suitable fermentation conditions for laccase production were MSB supplemented with 5% rice straw powder, at 25°C, 150 rpm, for 8 days. The optimum conditions for the highest activity of laccase were pH at 5.0 and temperature at 45°C. A high capacity of laccase capable of degrading Cartap, Cypermethrin and Chlorpyrifos has been revealed. Therefore, laccase from *P. chrysogenum* N2 can be considered as a potential agent for the bioremediation of pesticide residues in environment.

Keywords: *Bioremediation, fungi, laccase, Penicillium chrysogenum N2, pesticides.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm

Ngày nhận bài: 24/02/2023

Ngày thông qua phản biện: 22/3/2023

Ngày duyệt đăng: 29/3/2023