

Ảnh hưởng của một số điều kiện đến việc ổn định hoạt tính laccase trong bào tử *Bacillus subtilis* và khảo sát khả năng khử màu thuốc nhuộm azo của laccase
Effect of various conditions on stabilizing laccase activity in *Bacillus subtilis* spores and evaluating the ability of laccase to decolorize azo dyes

Đỗ Thị Hồng^{1,2*}, Lương Bảo Uyên^{1,2}

¹Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: dthong@hcmus.edu.vn

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.20.2.4188.2025

Ngày nhận: 02/03/2025

Ngày nhận lại: 13/03/2025

Duyệt đăng: 02/04/2025

Laccase là một polyphenol oxidase và việc ổn định hoạt tính của enzyme này thường gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, việc tìm ra phương pháp ổn định hoạt tính laccase có ý nghĩa thực tiễn. Chủng *Bacillus subtilis* được nuôi cấy trong môi trường tạo bào tử, và thời gian cũng như phương pháp thu nhận bào tử được khảo sát để tạo ra mẫu chế phẩm có hoạt tính laccase cao nhất. Hoạt tính laccase từ mẫu *B.subtilis* sau 04 ngày nuôi cấy đã tăng 14.53 lần so với ngày đầu tiên. Sinh khối chứa bào tử được xử lý với NaCl và CuSO₄ để tạo mẫu chế phẩm có hoạt tính laccase. Sau khi xử lý, mẫu chế phẩm được bảo quản trong CuSO₄ để khảo sát tính ổn định của laccase. Trong các nồng độ khảo sát, nồng độ CuSO₄ 0.25mM cho hoạt tính laccase cao nhất (39 U/g), tăng 2.38 lần sau 06 tuần bảo quản. Về nhiệt độ bảo quản, mẫu chế phẩm bảo quản ở 4°C có độ tăng hoạt tính cao nhất (tăng 2.9 lần) và ổn định nhất so với mẫu bảo quản ở -4°C (tăng 1.19 lần) và 37°C (tăng 2.02 lần). Đối với thời gian bảo quản, mẫu chế phẩm bảo quản trong CuSO₄ 0.25mM ở 4°C sau 12 tuần vẫn duy trì hoạt tính laccase ổn định và tăng 2.64 lần (39.42 U/g) so với mẫu ban đầu. Sau 09 tuần, hoạt tính laccase đạt mức tăng cao nhất, tăng 3.44 lần (51.33 U/g). Mẫu chế phẩm bảo quản trong CuSO₄ 0.25mM sau 04, 08 và 12 tuần đạt hiệu suất khử màu lần lượt là 46.75%, 65.02% và 70.89%. Kết quả cho thấy có mối tương quan thuận giữa hoạt tính laccase và khả năng khử màu Congo red của mẫu chế phẩm.

ABSTRACT

Laccase is a polyphenol oxidase, and stabilizing its activity can be challenging. Therefore, developing a method to stabilize laccase activity is of practical significance. *Bacillus subtilis* was cultured to produce spores, and the time and method for collecting spores to achieve the highest laccase activity were investigated. Laccase activity from the *B.subtilis* sample increased 14.53 times after 04 days of culture compared to the first day. The biomass containing spores was treated with NaCl and CuSO₄ to create samples with laccase activity. After

Từ khóa:

Bacillus subtilis; congo red; khử màu thuốc nhuộm azo; laccase; ổn định hoạt tính

treatment, the sample was preserved in CuSO_4 to assess the stability of laccase. Among the CuSO_4 concentrations tested, 0.25mM CuSO_4 gave the highest laccase activity (39 U/g), which increased 2.38 times after 6 weeks of preservation. Regarding the effect of temperature, the sample preserved at 4°C showed the highest activity increase (29 times) and the most stability, compared to samples preserved at -4°C (1.19 times) and 37°C (2.02 times). As for preservative time, the sample preserved in 0.25mM CuSO_4 at 4°C for 12 weeks retained laccase activity, with a 2.64 times increase (39.42 U/g). After 09 weeks, the laccase activity increased the most, showing a 3.44 times increase (51.33 U/g). The sample preserved in 0.25mM CuSO_4 showed the % discoloration of 46.75%, 65.02%, and 70.89% after 04, 08, and 12 weeks, respectively. The results demonstrate a positive correlation between laccase activity and the Congo red decolorization ability of the spore sample.

Keywords:

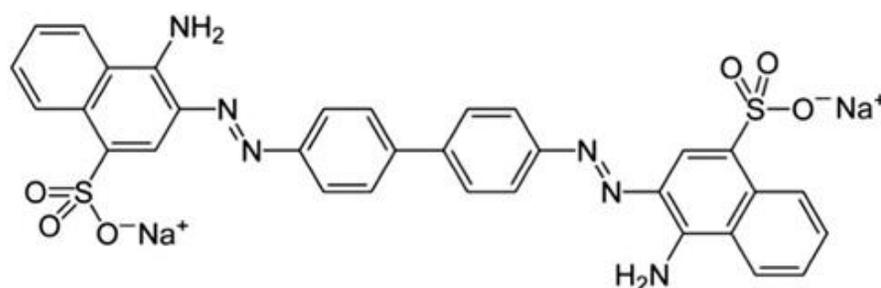
Bacillus subtilis; congo red; decolorizes azo dye; laccase; stabilizes activity

1. Đặt vấn đề

Congo red thuộc nhóm thuốc nhuộm azo, là thuốc nhuộm tổng hợp đầu tiên được sản xuất có khả năng nhuộm trực tiếp vải bông (Saratale & ctg., 2011). Thuốc nhuộm có tên hóa học là 3,3'-(1E,1'E)-biphenyl-4,4'-diylbis(diazene-2,1-diyl)bis(4-amin naphthalene1-sulfonate) (Ali & ctg., 2016).

Hình 1

Cấu Trúc Hóa Học của Congo Red



Ghi chú: Dữ liệu từ “Molecular uptake of congo red dye from water on iron composite nano particles” bởi I. Ali, Z. A. AL-Othman, & A. Alwarthan, 2016, *Journal of Molecular Liquids*, 224(A), pp. 171-176 (<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.09.108>)

Thuốc nhuộm azo gây tác động tiêu cực đến con người như là chất gây ung thư, chất gây đột biến gen. Đồng thời, sự hiện diện của chúng với nồng độ cao trong hệ sinh thái nước ảnh hưởng đến hoạt động quang hợp, làm suy giảm chất lượng nước, làm giảm lượng khí hòa tan, gây ra tác động nguy hại đối với hệ thực vật thủy sinh và hệ động vật (Abo-State & ctg., 2017).

Hiện nay có rất nhiều phương pháp vật lý và hóa học để khử màu thuốc nhuộm trong nước thải, trong đó phương pháp sinh học thân thiện với môi trường và hiệu quả cao đã trở thành một hướng đi mới đầy tiềm năng (Hanis & ctg., 2020). Laccase được coi là công cụ sinh học xanh đầy hứa hẹn cho một loạt các ứng dụng xử lý môi trường (Chauhan & ctg., 2017).

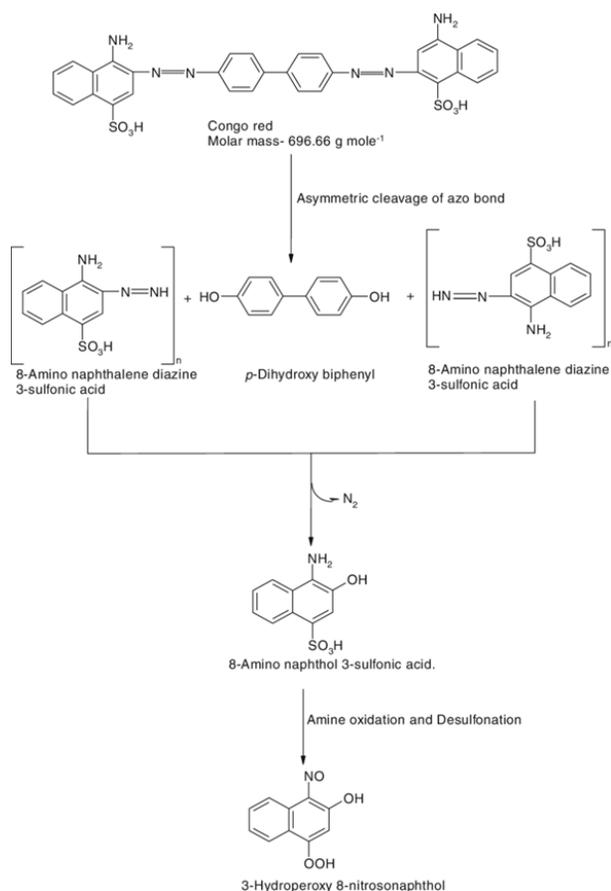
Laccase (EC 1.10.3.2) (benzenediol:oxygen oxydoreductase) là enzyme oxy hóa - khử, có phổ cơ chất rộng. Phân tử có chứa 04 nguyên tử đồng xúc tác và khử oxy thành nước (Kunamneni & ctg., 2008). Laccase phân bố rộng rãi trong tự nhiên ở một số thực vật, côn

trùng, nấm và vi khuẩn (Wang & ctg., 2016). Ở *Bacillus subtilis*, laccase có vai trò trong sinh tổng hợp các sắc tố bào tử màu nâu và bảo vệ bào tử chống tia UV và hydrogen peroxide (Guan & ctg., 2015; Mishra & Srivastava, 2016).

Đã có nhiều nghiên cứu về đặc tính của laccase và khả năng ứng dụng enzyme này trong xử lý môi trường, nổi bật là khả năng phân hủy thuốc nhuộm, trong đó có thuốc nhuộm azo. Laccase có khả năng oxy hóa Congo red tạo ra ion carbocation. Ion này liên kết với các nhóm cho điện tử như $-OH$, $-SO_3$ hoặc ion halogen, dẫn đến sự phân cắt không đối xứng của liên kết azo và hình thành *p*-Dihydroxy biphenyl cùng với hai diazine trung gian. Các diazine trung gian này không ổn định khi có sự hiện diện của O_2 . Mặt khác, khi hai diazine mất phân tử nito và liên kết với nhóm hydroxyl tại cùng vị trí, chúng tạo ra 8-aminonaphthol-3-sulfonic acid. Cuối cùng, 3-Hydroperoxy-8-nitrosonaphthol được hình thành bởi quá trình oxy hóa amine và khử nhóm sulfo của 8-aminonaphthol-3-sulfonic acid. Như vậy, Congo red đã bị khử thành các nhóm hydroxyl và chất chuyển hóa hydroperoxyl không độc (Telke & ctg., 2010).

Hình 2

Cơ Chế Khử Màu Congo Red của Laccase



Ghi chú: Dữ liệu từ “Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT” bởi A. A. Telke, S. M. Joshi, S. U. Jadhav, D. P. Tamboli, & S. P. Govindwar, 2010, *Biodegradation*, 21(2), pp. 283-296

Năm 2011, Chun Lei Wang đã nghiên cứu đặc tính của laccase trên bào tử vi khuẩn *B. subtilis* WD23 và ứng dụng khử màu thuốc nhuộm, với kết quả là 90% thuốc nhuộm remazol brilliant blue R và alizarin red đã được khử trong vòng 24 giờ, đồng thời, hiệu quả khử màu các loại thuốc nhuộm khác như congo red, methyl orange và methyl violet đều đạt 50% (Wang & ctg., 2011). Năm 2015, gen *cotA* của chủng *B. subtilis* WD23 được chuyển vào *E.*

coli tạo laccase tái tổ hợp và nhóm nghiên cứu trên tiếp tục thành công trong khảo sát khả năng khử màu thuốc nhuộm của laccase tái tổ hợp (Wang & ctg., 2016). Các nghiên cứu về khả năng phân hủy thuốc nhuộm của laccase vi khuẩn đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của chúng trong xử lý các vấn đề ô nhiễm môi trường.

Laccase ở *Bacillus subtilis* nằm trên lớp vỏ bào tử, và đây là một lợi thế để phát triển các chế phẩm laccase dạng bào tử. Việc ổn định hoạt tính của laccase còn gặp nhiều khó khăn vì đây là enzyme oxy hóa khử. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào việc khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố như nhiệt độ, thời gian, nồng độ CuSO_4 , hay nồng độ cơ chất, ... nhằm xác định các điều kiện tối ưu để enzyme này hoạt động hiệu quả. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát một số yếu tố giúp ổn định và duy trì hoạt tính của chế phẩm laccase từ *Bacillus subtilis* theo thời gian. Sinh khối chứa bào tử *B. subtilis* có hoạt tính laccase sau khi bảo quản được kiểm tra khả năng khử màu thuốc nhuộm Congo red. Kết quả của nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn khi tạo ra được chế phẩm laccase dạng bào tử và ứng dụng chế phẩm chứa laccase trong việc khử màu thuốc nhuộm azo.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chúng *Bacillus subtilis* do phòng thí nghiệm Công nghệ enzyme, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Môi trường nuôi cấy tạo bào tử

Chúng khảo sát được hoạt hóa trên môi trường LB (Cao nấm men 0.5%, Trypton 1% , NaCl 1%). Sau đó, chúng đã hoạt hóa được chuyển tiếp sang môi trường nuôi cấy tạo bào tử với tỉ lệ cấy giống là 5%.

Môi trường nuôi cấy tạo bào tử là hỗn hợp của 03 dung dịch A, B và C theo tỉ lệ thể tích 100:1:1 (Schaeffer & ctg., 1965). Trong đó:

- Dung dịch A: K_2HPO_4 1%, KH_2PO_4 0.35%, NH_4Cl 0.05% và D-Glucose glucose 0.2%;
- Dung dịch B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%;
- Dung dịch C: CaCl_2 0.5%, MnCl_2 0.05%.

2.2.2. Phương pháp khảo sát thời gian thu nhận sinh khối chứa bào tử

B. subtilis được nuôi cấy trên môi trường tạo bào tử với ở nhiệt độ 37°C , với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sinh khối chứa bào tử được thu từ canh trường nuôi cấy sau 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07 và 14 ngày. Dịch canh trường được ly tâm 12,000 vòng/phút trong 15 phút, sau đó loại bỏ phần dịch và thu cặn sinh khối chứa bào tử.

2.2.3. Phương pháp thu nhận sinh khối chứa bào tử

Sinh khối chứa bào tử được thu nhận từ dịch canh trường nuôi cấy chủng *B.subtilis*. Cụ thể, sau khi ly tâm 12,000 vòng/phút trong 15 phút, phần dịch được loại bỏ và sinh khối chứa bào tử được thu nhận. Sinh khối được huyền phù trong nước cất 02 lần hấp khử trùng. Sau khi ly tâm 12,000 vòng/phút trong 15 phút, sinh khối được thu nhận lại. Ở bước tiếp theo, 0.5mg sinh khối chứa bào tử được cho vào eppendorf và ủ với 1ml NaCl 0.5M trong 01 phút (Hirose & ctg., 2003). Sau đó khi ly tâm 10,000 vòng/phút trong 05 phút, cặn được thu nhận và được ủ

với 1ml CuSO₄ 0.25mM trong 30 phút (Mongkoltharuk & ctg., 2012). Sau đó, ly tâm 10,000 vòng/phút trong 05 phút và thu cặn. Tiến hành xác định hoạt tính laccase của từng mẫu sinh khối chứa bào tử.

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính laccase

Hoạt tính laccase được xác định dựa trên sự oxy hóa 2,2'-azinobis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) bởi laccase thành hợp chất có màu xanh hấp thụ ánh sáng tại bước sóng 405nm (Cho & ctg., 2011). Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1μM sản phẩm từ ABTS trong thời gian 01 phút, ở điều kiện phòng thí nghiệm (Diwaniyan & ctg., 2010).

Thành phần phản ứng (1ml) gồm: 900μl đệm acetate 0.1M pH 3.7, 0.05mg sinh khối chứa bào tử và 100μl ABTS. Sau 15 phút phản ứng, hỗn hợp được ly tâm để loại bỏ bào tử, phần dịch còn lại được đo ở bước sóng 405nm để định lượng sản phẩm tạo ra.

2.2.5. Phương pháp xác định khả năng khử màu Congo red của mẫu chế phẩm

Thành phần phản ứng gồm: Congo red 15μM, acetosyringone 4.5μM, lượng bào tử 0.025g hoặc hoạt tính laccase 0.5 U/g. Sau 04 giờ phản ứng hút 1ml dung dịch đem ly tâm 10,000 vòng/phút trong 05 phút, loại cặn, thu dịch nổi, và đo OD của dịch nổi tại bước sóng hấp thụ tối đa của Congo red (495nm). Hiệu suất khử màu được tính theo công thức (Cho & ctg., 2011):

$$H (\%) = \frac{OD_0 - OD_t}{OD_0} * 100\% \quad (1)$$

Trong đó:

- H: Hiệu suất khử màu
- OD₀: giá trị OD tại thời điểm 0 phút
- OD_t: giá trị OD tại thời điểm t phút.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

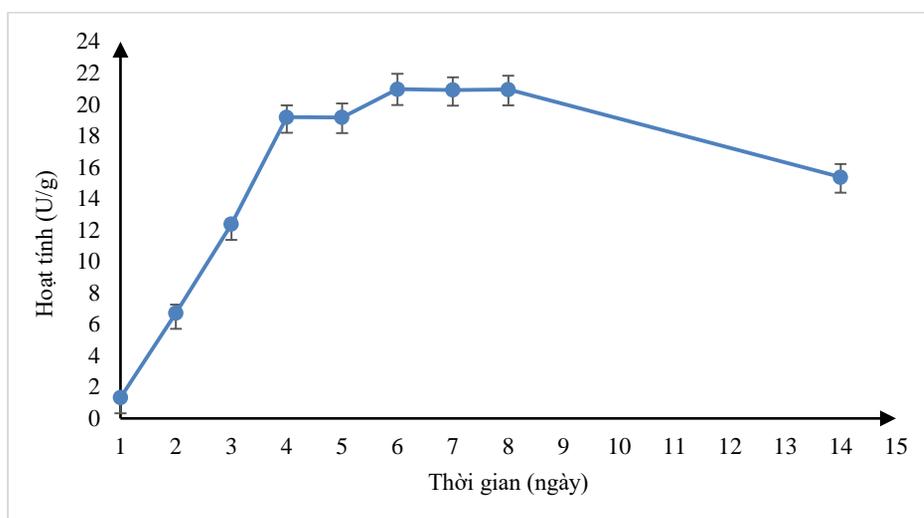
Xử lý số liệu thống kê bằng phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA), kiểm định Post - Hoc theo phương pháp Turkey bằng phần mềm SPSS.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát thời gian thu nhận bào tử

Kết quả khảo sát thời gian thu nhận bào tử được thể hiện qua Hình 3. Kết quả cho thấy, hoạt tính laccase của bào tử tăng dần từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 4, sau đó hầu như không thay đổi đáng kể vào các ngày thứ 5, 6, 7, 8, và hoạt tính được ghi nhận giảm vào ngày thứ 14.

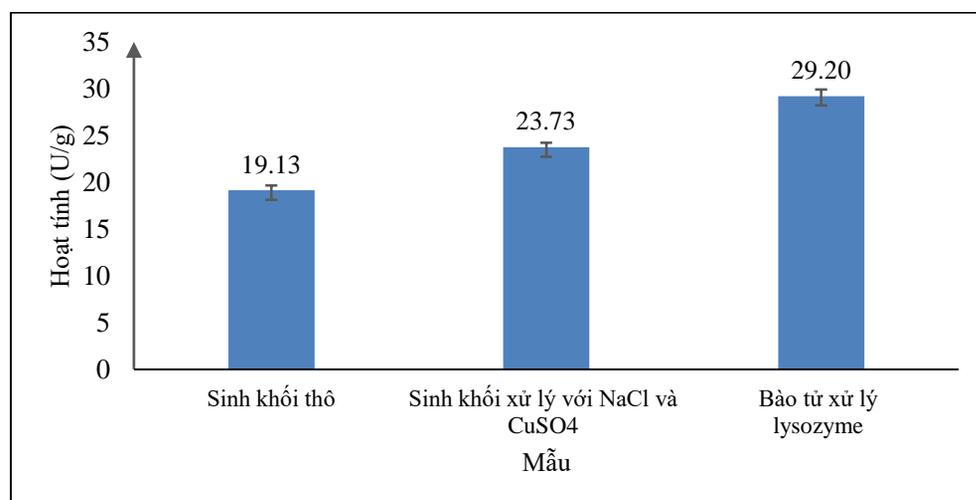
Với kết quả thu được, nhận thấy thời điểm thích hợp thu bào tử là ngày thứ 4 trên môi trường nuôi cấy tạo bào tử. Đây là thời điểm đã có sự hình thành bào tử, hoạt tính laccase đạt 19.8 U/g và tăng gấp 14.53 lần so với ngày đầu tiên. Ở ngày thứ 6, hoạt tính laccase đạt 20.96 U/g và tăng 15.88 lần khi so với ngày đầu tiên. Kết quả phù hợp với nguyên cứu của Kumar và cộng sự, hoạt tính laccase từ *Bacillus* sp. sau 04 ngày nuôi cấy đạt giá trị cao nhất (Kumar & ctg., 2020). Do hoạt tính laccase xác định được vào ngày thứ 4 và ngày thứ 6 không có sự khác biệt lớn, nên thu bào tử ở ngày thứ 4 thì sẽ tiết kiệm được thời gian và chi phí hơn, mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn.

Hình 3*Biểu Đồ Thể Hiện Hoạt Tính Laccase trên Bào Tử Thô theo Thời Gian Nuôi Cấy*

Ghi chú: Kết quả dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.2. Khảo sát phương pháp xử lý bào tử

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của phương pháp xử lý bào tử lên hoạt tính laccase được thể hiện ở Hình 4. Mẫu sinh khối thô có hoạt tính laccase là 19.13 U/g, mẫu sinh khối xử lý với NaCl và CuSO₄ có hoạt tính là 23.73 U/g tăng 1.24 lần so với mẫu sinh khối thô và mẫu sinh khối xử lý với lysozyme có hoạt tính cao nhất là 29.2 U/g tăng 1.53 lần so với mẫu thô.

Hình 4*Hoạt Tính Laccase của Các Phương Pháp Xử Lý Bào Tử*

Ghi chú: Kết quả dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Mẫu sinh khối khi xử lý bằng NaCl đã giúp làm sạch tế bào vi khuẩn và ABTS dễ dàng tiếp xúc với laccase, do đó hoạt tính laccase tăng so với mẫu sinh khối thô (Forootanfar & ctg., 2016). Mẫu sinh khối xử lý lysozyme có hoạt tính laccase cao do phương pháp đã loại được phần lớn các tế bào, vì vậy, ABTS có thể dễ dàng tiếp xúc với laccase trên vỏ bào tử làm cho hoạt tính laccase tăng 1.53 lần. Tuy nhiên, phương pháp này trải qua nhiều bước (phá vỡ

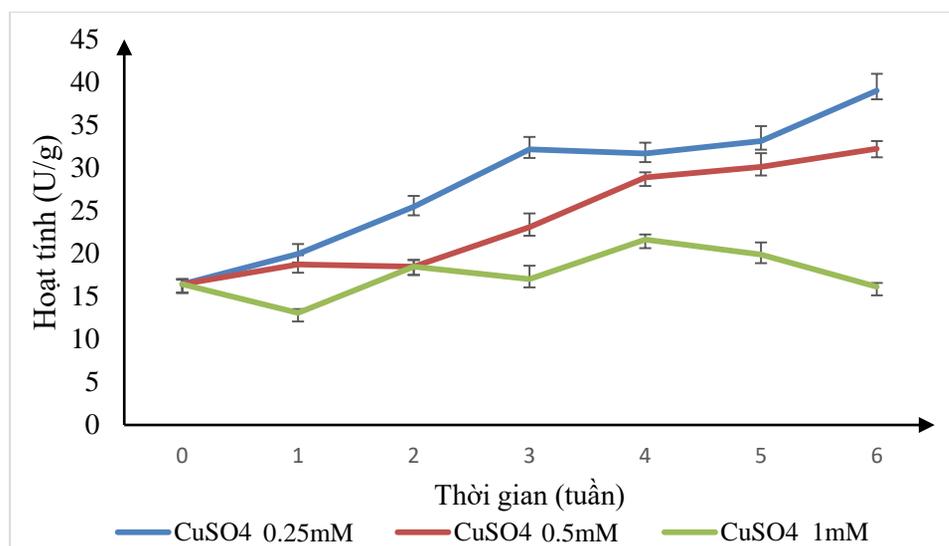
tế bào, loại bỏ tế bào, ...) và sử dụng nhiều hóa chất, quy trình khá phức tạp, giá thành lysozyme cao và nếu không thể loại hết lysozyme trong mẫu trong quá trình bảo quản thì sẽ ảnh hưởng tới hoạt tính laccase của bào tử. Lysozyme khi tiếp xúc trực tiếp với laccase làm cho các chuỗi oligosaccharide liên kết với laccase bị phân hủy, ảnh hưởng tới cấu trúc và làm giảm hoạt tính laccase (Claus, 2004). Vì vậy, phương pháp xử bào tử với NaCl và CuSO_4 tạo chế phẩm được chọn để tiến hành các nghiệm thức tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ CuSO_4 đến hoạt tính laccase

Hình 5 thể hiện kết quả khảo sát ảnh hưởng nồng độ CuSO_4 đến hoạt tính laccase của mẫu bảo quản. Sự bảo quản mẫu trong CuSO_4 với nồng độ 0.25mM và 0.5mM đều có xu hướng làm tăng hoạt tính laccase sau 06 tuần bảo quản. Sau thời gian dài, tế bào chuyển sang dạng bào tử, lượng bào tử trong mẫu bảo quản cao hơn so với ban đầu nên hoạt tính laccase có sự gia tăng. Ngoài ra, CuSO_4 là một cofactor của laccase nên đã giúp ổn định cấu trúc của enzyme trong thời gian bảo quản (Mongkolthanasakul & ctg., 2012). Ngược lại, nồng độ Cu^{2+} 1mM không làm thay đổi, hoạt tính laccase sau 06 tuần bảo quản. Kết quả này cho thấy khi được sử dụng ở nồng độ 1mM Cu^{2+} có thể đã trở thành tác nhân gây ức chế hoạt tính laccase. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ming-Qiang Ai và cộng sự, khi nồng độ Cu^{2+} tăng từ 1mM lên 5mM và 10mM, thì hoạt tính laccase giảm xuống còn 92.3% và 80.9% so với ban đầu (Ai & ctg., 2015).

Hình 5

Ảnh Hưởng của Nồng Độ CuSO_4 đến Hoạt Tính Laccase trong 06 Tuần Bảo Quản



Ghi chú: Kết quả dữ liệu của nhóm nghiên cứu

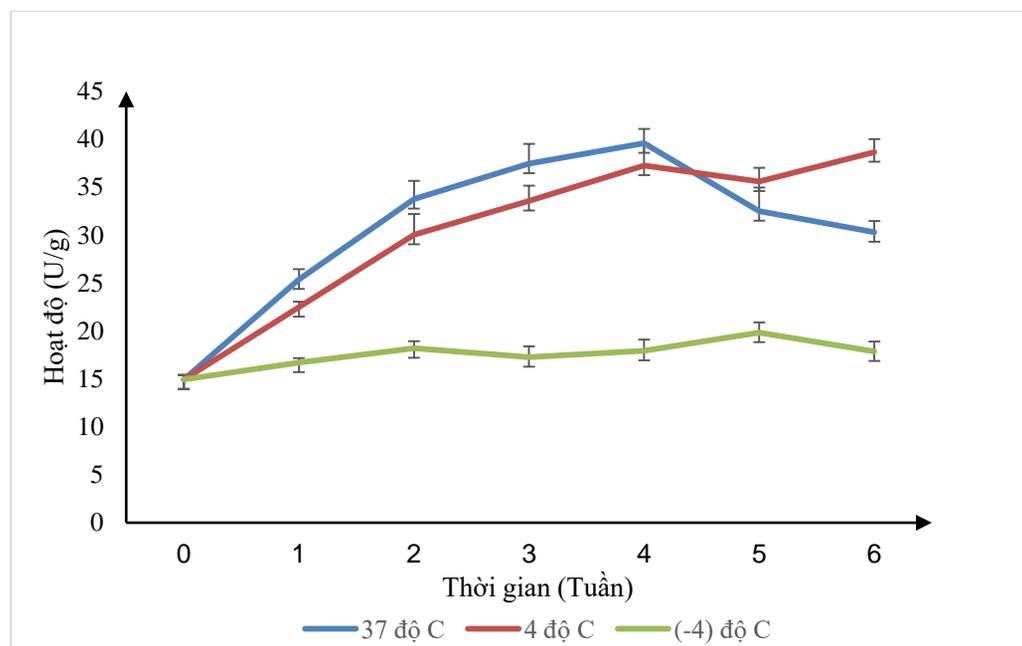
Vì vậy nồng độ CuSO_4 0.25mM được chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính laccase được thể hiện trong Hình 6. Mẫu bảo quản ở nhiệt độ 37°C có hoạt tính tăng cao nhất sau 04 tuần (đạt 39.57 U/g), sau thời gian này hoạt tính có xu hướng giảm dần. Trong khi đó, mẫu bảo quản ở nhiệt độ 4°C đạt hoạt tính cao nhất sau 06 tuần (38.65 U/g) và có xu hướng tăng dần hoạt tính. Hoạt tính laccase của mẫu bảo quản ở nhiệt độ -4°C không thay đổi trong quá trình bảo quản.

Hình 6

Ảnh Hưởng của Nhiệt Độ Bảo Quản đến Hoạt Tính Laccase của Mẫu trong 06 Tuần Bảo Quản



Ghi chú: Kết quả dữ liệu của nhóm nghiên cứu

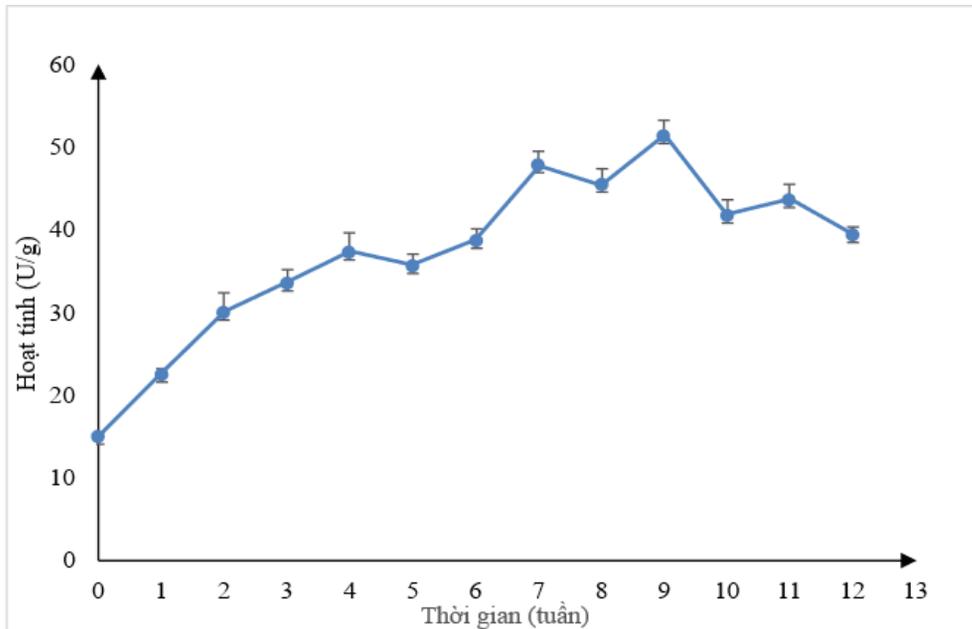
Theo nghiên cứu của Guo và cộng sự (2017) laccase từ *Bacillus* hoạt động tối ưu ở mức nhiệt từ 30 - 40°C, khi nhiệt độ tăng từ 40 đến 80°C hoạt tính laccase có xu hướng giảm (Guo & ctg., 2017). Điều này phù hợp với nghiên cứu khi hoạt tính laccase của mẫu bảo quản ở 37°C đạt giá trị cao nhất sau 04 tuần bảo quản, tuy nhiên sau thời gian này, hoạt tính lại giảm dần. Trong khi ở nhiệt độ bảo quản 4°C, sau 06 tuần, hoạt tính laccase tăng dần. Theo Phoane và cộng sự (2022), nhiệt độ và thời gian bảo quản của mẫu *Bacillus subtilis* đông khô ảnh hưởng đến khả năng sống sót của chúng, ở nhiệt độ -20°C, toàn bộ vi khuẩn đều có khả năng sống sót sau 240 ngày, tỉ lệ sống sót giảm dần ở nhiệt độ 4°C và 25°C (93.3% và 86.6%) (Phoane & ctg., 2022). Như vậy, khi bảo quản mẫu bào tử trong dung dịch CuSO₄ 0.25mM, nhiệt độ đã ảnh hưởng đến khả năng sống sót của *Bacillus subtilis* và hoạt tính laccase của mẫu. Trong khảo sát này, nhiệt độ bảo quản 4°C là phù hợp để đảm bảo được hoạt tính laccase trong thời gian dài.

3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian bảo quản

Sinh khối chứa bào tử được xử lý với NaCl và CuSO₄, sau đó mẫu được bảo quản trong CuSO₄ 0.25mM ở nhiệt độ 4°C. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến hoạt tính laccase được thể hiện ở Hình 7. Theo đó, mẫu bào tử có hoạt tính tăng dần và đạt hoạt tính cực đại tại tuần thứ 9 với hoạt tính là 51.33 (U/g), tăng 3.44 lần so với ban đầu. Từ tuần thứ 9 trở đi, hoạt tính có xu hướng giảm dần. Sau 12 tuần, hoạt tính laccase đạt được là 39.42 (U/g), tăng 2.64 lần so với ban đầu. Tuy nhiên cần thêm nghiên cứu để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt đến hoạt tính cũng như khả năng sống sót của mẫu bảo quản để có thể kết luận chính xác hơn.

Hình 7

Ảnh Hưởng của Thời Gian Bảo Quản đến Hoạt Tính Laccase



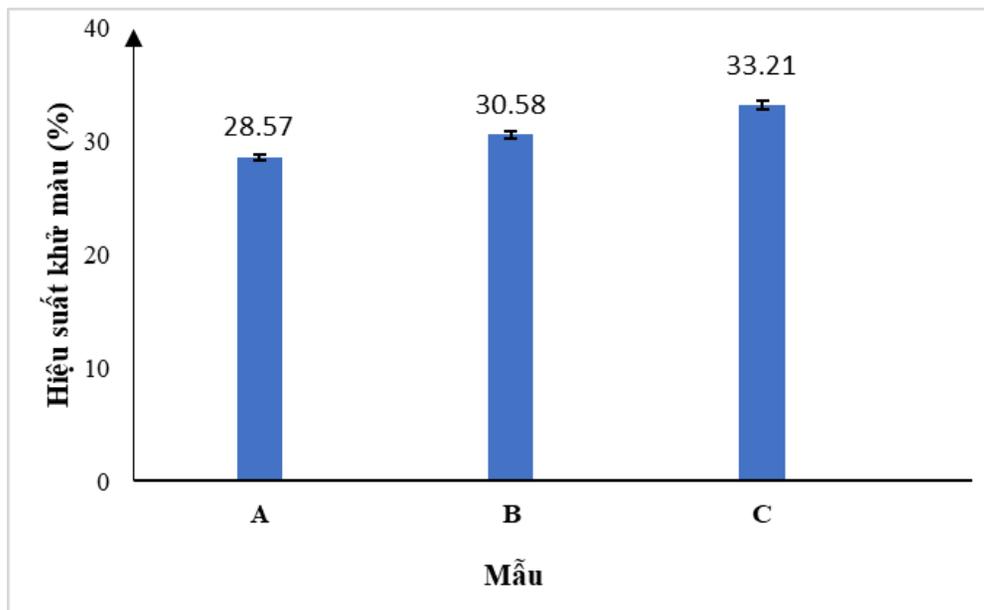
Ghi chú: Kết quả dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.6. Kết quả khử màu thuốc nhuộm azo của mẫu bào tử ban đầu

Phản ứng khử màu CR lần lượt được thực hiện với nguồn laccase từ các mẫu bào tử thô không qua xử lý, bào tử xử lý NaCl và CuSO₄ và bào tử xử lý lysozyme. Phản ứng xảy ra trong 04 giờ ở 65°C, hoạt tính laccase khảo sát ở các mẫu là 0.5 U/g. Kết quả khử màu thuốc nhuộm CR của các mẫu bào tử được thể hiện qua Hình 8.

Hình 8

Khả Năng Khử Màu Thuốc Nhuộm Azo của Các Mẫu Bào Tử



Ghi chú: A: Mẫu sinh khối không xử lý; B: Mẫu sinh khối xử lý với NaCl và CuSO₄; C: Mẫu sinh khối xử lý với lysosome. Kết quả dữ liệu của nhóm nghiên cứu

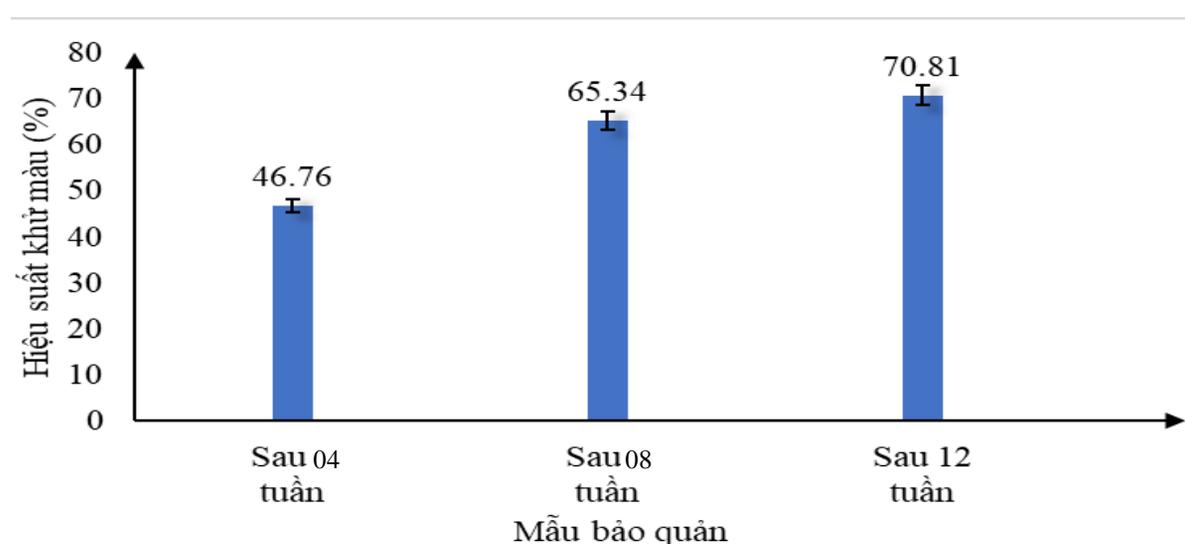
Hiệu suất khử màu của mẫu sinh khối không xử lý, mẫu sinh khối xử lý với NaCl và CuSO_4 và sinh khối lysozyme tăng dần (28.57%, 30.58% và 33.21%) (Hình 7). Tuy nhiên, hiệu suất khử màu của mẫu sinh khối xử lý gia tăng không đáng kể với mẫu không xử lý. Điều này phù hợp với hoạt tính laccase ban đầu của các mẫu khi tiến hành phản ứng khử màu (0.5 U/g).

3.7. Kết quả khử màu thuốc nhuộm azo của mẫu bào tử bảo quản trong CuSO_4 0.25mM

Mẫu bào tử sau 04, 08 và 12 tuần bảo quản trong CuSO_4 0.25mM được sử dụng để thiết lập phản ứng đánh giá khả năng khử màu CR trong 04 giờ và ở nhiệt độ 65°C . Lượng bào tử trong phản ứng là 0.025g. Kết quả khảo sát hiệu suất khử màu CR bởi các mẫu bào tử nêu trên được thể hiện qua Hình 9.

Hình 9

Khả Năng Khử Màu của Các Mẫu Bào Tử sau 04, 08 Và 12 Tuần Bảo Quản trong CuSO_4 0.25mM



Ghi chú: Kết quả dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Khả năng khử màu của mẫu bào tử bảo quản trong CuSO_4 0.25mM tăng theo thời gian bảo quản mẫu. Hiệu suất khử màu của mẫu sau 08 tuần bảo quản đạt 65.02% và sau 12 tuần bảo quản đạt 70.89% (Hình 9). Điều này phù hợp với độ tăng hoạt tính laccase của mẫu bào tử sau 04, 08 và 12 tuần bảo quản so với ban đầu, với mức độ gia tăng lần lượt là 2.49; 3.04 và 2.78 lần (Hình 7). Kết quả cho thấy mối tương quan giữa hoạt tính laccase và khả năng khử màu Congo Red của mẫu bào tử, khi tạo được mẫu bào tử có hoạt tính laccase tốt, hiệu suất khử màu CR sẽ cao.

Như vậy, sau 04 ngày nuôi cấy trên môi trường tạo bào tử, chủng *Bacillus subtilis* thu nhận có hoạt tính laccase đạt 19.8 U/g. Nồng độ CuSO_4 0.25mM và nhiệt độ 4°C là điều kiện thích hợp để ổn định và duy trì hoạt tính laccase của mẫu chế phẩm trong suốt 12 tuần bảo quản (tăng 3.44 lần sau 09 tuần và tăng 2.64 lần sau 12 tuần). Mẫu chế phẩm trong quá trình bảo quản vẫn thể hiện sự tăng hoạt tính laccase và khả năng khử màu thuốc nhuộm Congo red. Như vậy, nghiên cứu đã xác định được điều kiện bảo quản phù hợp cho chế phẩm *Bacillus subtilis* chứa laccase và mở ra hướng ứng dụng chế phẩm này để khử màu nước thải chứa thuốc nhuộm azo.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ Đề tài mã số T2019-24.

TUYÊN BỐ KHÔNG CÓ XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam kết, tuyên bố không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến việc công bố bài báo này.

Tài liệu tham khảo

- Abo-State, M. A. M., Saleh, Y. E., & Hazaa, H. A. (2017). Decolorization of Congo Red dye by bacterial isolates. *Journal of Ecology of Health & Environment An International Journal*, 5(2), 41-48.
- Ai, M.-Q., Wang, F.-F., & Huang, F. (2015). Purification and characterization of a thermostable laccase from *Trametes trogii* and its ability in modification of kraft lignin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1361-1370. <https://doi.org/10.4014/jmb.1502.02022>
- Ali, I., AL-Othman, Z. A., & Alwarthan, A. (2016). Molecular uptake of congo red dye from water on iron composite nano particles. *Journal of Molecular Liquids*, 224(A), 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.09.108>
- Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: Recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, 7(5), Article 323. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7>
- Cho, E.-A., Seo, J., Lee, D.-W., & Pan, J.-G. (2011). Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(1), 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.03.005>
- Claus, H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1/2), 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>
- Diwaniyan, S., Kharb, D., Raghukumar, C., & Kuhad, R. C. (2010). Decolorization of synthetic dyes and textile effluents by basidiomycetous fungi. *Water, Air, & Soil Pollution*, 210(1/4), 409-419. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0263-x>
- Forootanfar, H., Rezaei, S., Zeinvand-Lorestani, H., Tahmasbi, H., Mogharabi, M., Ameri, A., & Faramarzi, M. A. (2016). Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 14(1) 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40201-016-0248-9>
- Guan, Z. B., Shui, Y., Song, C. M., Zhang, N., Cai, Y. J., & Liao, X. R. (2015). Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(12), 9515-9523. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4426-6>
- Guo, H., Lin, C., Wang, S., Jiang, D., Zheng, B., Liu, Y., & Qin, W. (2017). Characterization of a novel laccase-producing bacillus sp. A4 and its application in miscanthus degradation. *BioResources*, 12(3), 4776-4794. <https://doi.org/10.15376/biores.12.3.4776-4794>

- Hanis, K. K. A., Nasri, A. M., Farahiyah, W. W., & Rabani, M. M. (2020). Bacterial degradation of Azo Dye Congo Red by *Bacillus* sp. *Journal of Physics: Conference Series*, 1529, Article 022048.
- Hirose, J., Nasu, M., & Yokoi, H. (2003). Reaction of substituted phenols with thermostable laccase bound to *Bacillus subtilis* spores. *Biotechnology Letters*, 25(19), 1609-1612. <https://doi.org/10.1023/A:1025663931019>
- Kumar, A., Singh, A. K., Ahmad, S., & Chandra, R. (2020). Optimization of laccase production by *Bacillus* sp. strain AKRC01 in presence of agro-waste as effective substrate using response surface methodology. *Journal of Pure Appl Microbiology*, 14(1), 351-362. <https://doi.org/10.14302/issn.2377-2549.jndc-20-3460>
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial cell factories*, 7(1), Article 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-32>
- Mishra, S. K., & Srivastava, S. K. (2016). Production of extracellular laccase from bacterial strain *Bacillus subtilis* MTCC 1039 using different parameter. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(3), 1645-1650. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2312>
- Mongkolthanaruk, W., Tongbopit, S., & Bhoonobtong, A. (2012). Independent behavior of bacterial laccases to inducers and metal ions during production and activity. *African Journal of Biotechnology*, 11(39), 9391-9398. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3042>
- Phoane, K. V., Tjoa, E., Joon, S., Karmawan, L. U., & Moehario, L. H. (2022). Effect of temperature and preservation period on the viability of lyophilized *Bacillus subtilis*. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12, 153-155.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.06.006>
- Schaeffer, P., Millet, J., & Aubert, J. P. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(3), 704-711. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.3.704>
- Telke, A. A., Joshi, S. M., Jadhav, S. U., Tamboli, D. P., & Govindwar, S. P. (2010). Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. *Biodegradation*, 21(2) 283-296.
- Wang, C., Cui, D., Lu, L., Zhang, N., Yang, H., Zhao, M., & Dai, S. (2016). Cloning and characterization of CotA laccase from *Bacillus subtilis* WD23 decoloring dyes. *Annals of microbiology*, 66(1), 461-467. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1128-8>
- Wang, C., Zhao, M., Lu, L., Wei, X., & Li, T. (2011). Characterization of spore laccase from *Bacillus subtilis* WD23 and its use in dye decolorization. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2186-2192. <https://doi.org/10.4028/AMR.113-116.226>

