

PHÂN LẬP MỘT SỐ CHỦNG NẤM *Polyporales* sp. F6 SẢN XUẤT LACCASE TẠI THÀNH PHỐ BUÔN MA THUỘT

Đặng Thị Thanh Hà^{1*}, Vũ Thị Diệu Thu¹, Đoàn Chiến Thắng¹,
Phạm Thị Ngọc Lan², Nguyễn Đức Huy³

¹ Khoa KHTN&CN, Đại học Tây Nguyên

² Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

*Email: thanhha.tnu@gmail.com

Ngày nhận bài: 12/11/2019; ngày hoàn thành phản biện: 14/01/2020; ngày duyệt đăng: 02/4/2020

TÓM TẮT

Laccase thuộc nhóm enzyme oxy hóa nhân đồng, có tính oxy hóa mạnh, có phổ cơ chất đa dạng, và là enzyme thân thiện với môi trường do trong phản ứng laccase chỉ cần lấy oxygen từ không khí và sản phẩm phụ duy nhất tạo thành sau phản ứng là nước nên laccase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau đặc biệt công nghiệp dệt, nhuộm và xử lý ô nhiễm môi trường. Laccase được thu từ nhiều nguồn khác nhau như thực vật, vi khuẩn, côn trùng và nhiều vi sinh vật khác. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc và hình thái sợi nấm cùng với trình tự gen mã hóa 18S rRNA đã xác định chủng F6 có độ tương đồng đến 99% với loài *Polyporales* sp khi so sánh trên GenBank (NCBI), F6 có khoảng 608bp. Loài *Polyporales* sp F6 có khả năng sinh tổng hợp enzym laccase mạnh, đạt 90,37 (U/L) sau 9 ngày lên men. Điều kiện lên men để loài này sinh tổng hợp laccase mạnh là lên men lỏng, môi trường BSM bổ sung 5% cơ chất bột rom, ở nhiệt độ 30°C, pH7.

Từ khóa: *Polyporales*, laccase, nấm, phân lập, vi sinh vật.

1. MỞ ĐẦU

Ngày nay, tốc độ ô nhiễm môi trường đang gia tăng do việc thải các chất thải vào môi trường không kiểm soát. Các phương pháp hóa học và sinh học thông thường ngày càng khó đạt được mức độ cần thiết để loại bỏ các chất ô nhiễm. Do đó, cần phải triển khai những phương pháp hiệu quả và không gây ô nhiễm thứ cấp. Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh được enzyme có nhiều khả năng và triển vọng trong giải quyết vấn đề xử lý ô nhiễm môi trường. Enzyme có thể hoạt động trên các chất ô nhiễm đặc biệt khó xử lý để loại chúng bằng cách kết tủa, chuyển hóa, phân hủy các chất ô

nhằm thành dạng khác. Ngoài ra, enzyme còn có thể làm thay đổi các đặc tính của chất thải đưa chúng về dạng dễ xử lý hoặc chuyển thành các sản phẩm có giá trị hơn. Phương pháp xử lý bằng enzyme có những ưu điểm sau: được áp dụng với những chất sinh học khó xử lý, tác dụng cả ở vùng nồng độ chất ô nhiễm môi trường cao, một số enzyme riêng biệt có tác dụng trên phạm vi rộng pH, nhiệt độ,...mà không gây ra những biến đổi bất thường, không gây ra các cản trở phá vỡ cân bằng sinh thái. Trong các loại enzyme, thì enzyme phản ứng oxy hóa khử thuộc lớp 1 (oxidoreductase) và các enzyme xúc tác phản ứng thủy phân thuộc lớp 3 (hydrolase) có khả năng phân hủy các hợp chất được nêu trên rất cao (Baldrian P,2006).

Laccase (EC 1.10.3.2, p-diphenol oxidase) thuộc nhóm enzyme oxidase, cụ thể là phenol oxidase, xúc tác quá trình oxi hóa nhiều hợp chất hữu cơ bao gồm diphenol, polyphenol, diamine, amine thơm, benzenethiol.... Laccase có tính oxy hóa mạnh, có phổ cơ chất đa dạng và sử dụng oxy phân tử làm chất nhận điện tử nên enzyme này được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp, trong xử lý phụ phẩm công - nông nghiệp và nguồn nước thải ô nhiễm.

Ngoài ra, laccase được thu từ nhiều nguồn khác nhau như thực vật, vi khuẩn, côn trùng và nhiều vi sinh vật khác nữa. Trước sự phát triển mạnh mẽ của các ngành công nghiệp và yêu cầu khắt khe về xử lý nước thải tránh gây ô nhiễm môi trường, việc tìm ra công nghệ xử lý nước thải công nghiệp đạt hiệu quả cao, giá thành rẻ, ít sử dụng hoá chất, thân thiện với môi trường đã trở thành vấn đề cấp thiết.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày một số kết quả phân lập chủng vi sinh vật có khả năng sản xuất enzyme laccase, xác định đặc tính của enzyme laccase sau đó giải trình tự gen mã hóa, và so sánh đối chiếu kết quả giải trình tự với dữ liệu ngân hàng gen GenBank.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Xác mùn thực vật lấy từ một số khu vực trên địa bàn thành phố Buôn Ma Thuột, agar, khoai tây, bột rom, mùn cưa, guaiacol (0,01 %), pepton.

2.2. Phương pháp

Lấy mẫu và bảo quản mẫu

➤ **Lấy mẫu:** Quá trình lấy mẫu tuân theo TCVN 7538 - 2: 2005 [TCVN,2005]

Chọn những thân cây mục có xuất hiện những quần thể nấm mục trắng, dùng thìa hoặc dao sạch (đã được hấp tiệt trùng) nạo lớp vỏ này cho vào túi nilong, lấy đất vùng tiếp giáp giữa thân gỗ mục với đất cho vào túi nilong và khít miệng túi lại.

➤ **Bảo quản mẫu:** Mẫu sau khi lấy sẽ được giữ trong túi nilon cho đến khi đem phân tích, thời gian giữ không quá 24 giờ

Phân lập và giữ giống

Mẫu sau khi thu về, cân 1g cho vào cối sứ nghiền nát, cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước vô trùng rồi lắc 5 phút, để lắng 30 giây, ta được độ pha loãng 10^{-1} . Tiếp tục pha loãng đến nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} . Sử dụng mẫu pha loãng ở nồng độ cuối để trải môi trường PDA, nuôi ở 30°C , trong 3 ngày. Tuyển chọn những chủng nấm mốc phát triển mạnh, cấy chuyển sang môi trường PDA và làm thuần. Những chủng nấm mốc phân lập được có hoạt tính laccase, lưu mẫu ở -80°C trong glycerin 70%

Nuôi cấy

Nuôi sàng lọc: Dùng que cấy xấn 1 miếng thạch khoảng 1cm^2 có sợi nấm nuôi trên môi trường PDA của chủng nấm mốc được phân lập, để úp miếng thạch cho sợi nấm tiếp xúc với môi trường sàng lọc (BSM bổ sung guaiacol) [Dương Minh Lam và cs, 2013]. Nuôi ở 30°C trong 2 tuần.

Nuôi sinh khối: Sau khi chọn được các chủng nấm mốc có hoạt tính laccase mạnh, dùng que cấy xấn một miếng thạch khoảng 1cm^2 có sợi nấm trên môi trường PDA, chuyển vào bình tam giác có chứa 20ml môi trường PDA lỏng, nuôi ở 30°C , 180 vòng/phút, trong 3 ngày.

Nuôi sản xuất enzyme: Sau khi có sinh khối sợi nấm mốc, dùng micropipette hút 1ml dịch sinh khối chuyển vào bình tam giác có chứa 50ml môi trường sản xuất enzyme. Gồm 4 môi trường (MF1, MF2, MF3, MF4, tương ứng với, MF1: môi trường rom lỏng (là môi trường BSM (không bổ sung glucose và agar), bổ sung 5% bột rom), MF2: môi trường gỗ lỏng (là môi trường BSM (không bổ sung glucose và agar), bổ sung 5% bột gỗ), MF3: môi trường rom bán rắn (là môi trường BSM (không bổ sung glucose và agar), bổ sung 10% bột rom), MF4: môi trường gỗ bán rắn (là môi trường BSM (không bổ sung glucose và agar), bổ sung 10% bột gỗ)). Nuôi ở 30°C , 180 vòng/phút, trong 18 ngày đối với lên men lỏng. Nuôi ở 30°C và 18 ngày đối với lên men rắn.

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của nấm

Tiến hành quan sát trực tiếp chủng nấm mốc trên môi trường PDA bằng mắt thường và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Quan sát một số chỉ tiêu của các chủng nấm mốc trên môi trường PDA: khả năng phát triển của khuẩn lạc, màu sắc, hình dáng và bề mặt khuẩn lạc. Đo kích thước đường kính khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy [Phạm Thị Trân Châu, 2009].

Quan sát một số chỉ tiêu của các chủng nấm mốc dưới kính hiển vi quang học: phương pháp này được tiến hành để quan sát đặc điểm sợi nấm, sự hình thành bào tử

Phân lập một số chủng nấm Polyporales sp. F6 sản xuất laccase tại thành phố Buôn Ma Thuột

và đặc điểm của bào tử nấm. Quan sát ở độ phóng đại X40 trên tiêu bản. [Nguyễn Đức Long, 2011]

Sàng lọc chủng nấm sinh tổng hợp laccase

Guaiacol (0,01 %) được sử dụng làm chất chỉ thị trong các nghiên cứu xác định hoạt tính enzyme laccase. Các chủng nấm mốc phân lập được, làm thuần trên đĩa thạch PDA và cấy chuyển lên môi trường sàng lọc (BSM) có bổ sung guaiacol và nuôi ở 30° C trong 2 tuần. Chủng được xem là có khả năng sinh tổng hợp laccase nếu xuất hiện vòng nâu đỏ quanh khuẩn lạc (Trịnh Thu Thủy và cs, 2015). Quan sát theo trực quan, vòng màu nâu đỏ càng đậm thì hoạt tính của laccase càng mạnh.

Khảo sát điều kiện sinh tổng hợp enzyme laccase

Môi trường (cơ chất)

Tiến hành nuôi các chủng nấm sàng lọc được trên 4 loại môi trường sản xuất enzyme: MF1, MF2, MF3, MF4. Nuôi 3 bình trên mỗi loại môi trường, nuôi 18 ngày ở 30°C, 180 vòng/phút thu dịch enzyme. Dựa trên sự oxi hóa ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) bởi laccase thành hợp chất được hấp thụ ánh sáng mạnh tại bước sóng 420nm. Dựa vào kết quả thu được để xác định môi trường thích hợp cho sự sinh tổng hợp laccase của chủng nấm.

Phương pháp định danh sinh học phân tử

Sản phẩm PCR của chủng nấm được định danh tại công ty 1st BASE – Malaysia. Trình tự hoàn chỉnh được BLAST trên NCBI để đánh giá mức độ tương đồng của vùng bảo thủ ITS1-18S-ITS4 và từ đó tìm ra loài tương đồng nhất với trình tự cần nghiên cứu.

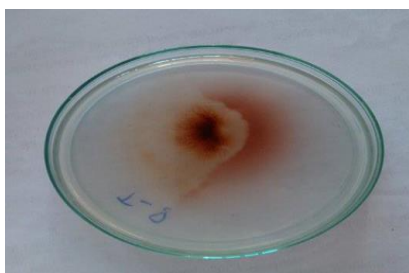
Phương pháp xử lý thống kê

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Micorosolf Excel 2010, SPSS, phần mềm Blast.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc chủng nấm có hoạt tính laccase

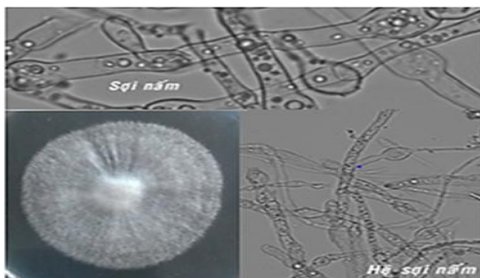
Những khuẩn lạc có hoạt tính enzyme sẽ tạo ra những thay đổi dễ nhận thấy bằng mắt thường trên môi trường thạch. Nếu khuẩn lạc có hoạt tính enzyme phân hủy hợp chất hữu cơ vòng thơm thì trên môi trường BSM có guaiacol sẽ xuất hiện vòng phân giải màu đỏ tía đối với nấm. Từ 9 chủng nấm (F1-F9) phân lập chọn ra được chủng nấm F6 có phản ứng màu với guaiacol (đường kính 4cm), chủng nấm này được tiếp tục nghiên cứu và định lượng sơ bộ về đặc điểm hình thái, điều kiện thích nghi và khả năng sinh laccase.



Hình 1. Sàng lọc trên môi trường BSM bổ sung guaiacol

Một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử của chủng nấm F6

Chủng nấm F1 được nuôi trên môi trường PDA sau 3 đến 5 ngày, sinh trưởng rất nhanh có khuẩn lạc mọc lan rộng, mọc dày, đường kính 4,5 cm. Khuẩn ty khí sinh màu trắng chuyển dần ra viền ngoài màu hồng phấn, bông xốp. Khuẩn ty cơ chất có màu trắng. Quan sát trên kính hiển vi, sợi nấm phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử nằm bên trong sợi khuẩn ty khí sinh, có bào tử vách dày, hình trứng, nằm ở đầu tận cùng hoặc chen giữa các sợi nấm già. Chúng có thể mọc thành thân đơn hoặc thành chồi, chúng tách ra và mọc các ống mầm nếu bào tử gặp điều kiện thuận lợi (hình 2.)



Hình 2. Khuẩn lạc sợi nấm chủng F6

Khảo sát ảnh hưởng nguồn carbon của môi trường đến hoạt tính laccase của chủng nấm F6

Kết quả khảo sát khả năng tích lũy laccase của chủng F6 trên 4 điều kiện lên men là MF1, MF2, MF3 và MF4 qua 18 ngày nuôi cấy, thể hiện trong *bảng sau*:

Bảng 1. Hoạt độ laccase (U/l) của chủng F6 trên 4 điều kiện lên men

Môi trường	Thời gian (ngày)					
	3	6	9	12	15	18
MT1	13,61 ^d	64,77 ^a	90,37 ^e	86,72 ^b	71,87 ^a	50,65 ^a
MT2	1,32 ^a	4,21 ^a	8,84 ^{ab}	7,08 ^c	13,19 ^b	11,71 ^b
MT3	2,22 ^a	4,49 ^b	5,93 ^f	13,33 ^a	9,49 ^a	8,94 ^d
MT4	0,69 ^c	0,83 ^d	2,5 ^d	5,5 ^f	8,05 ^c	6,31 ^c

Ghi chú: Các kí tự a, b, c, d, e, f chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một cột với $p < 0,05$

Phân lập một số chủng nấm Polyporales sp. F6 sản xuất laccase tại thành phố Buôn Ma Thuột

Chủng nấm sàng lọc được có khả năng tích lũy laccase mạnh trên môi trường MF1 là cao nhất đạt 90,37U/L, cao hơn so với 3 môi trường còn lại. Như vậy, nguồn carbon từ rom thích hợp cho sự phát triển và sinh laccase của chủng F6, Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Chunyan Xu và cộng sự (2015), khi nghiên cứu laccase trên nấm mục trắng, lên men sản xuất enzyme trên môi trường bổ sung cơ chất là rom lúa mạch đã kết luận, chủng *T. versicolor* BBEL0970 tích lũy laccase đạt cực đại 10,3 (U/ml) tăng 58,5% so với môi trường bổ sung glucose 5,2 (U/ml), sau 20 ngày lên men.

Khảo sát một số điều kiện ảnh hưởng đến hoạt tính của laccase

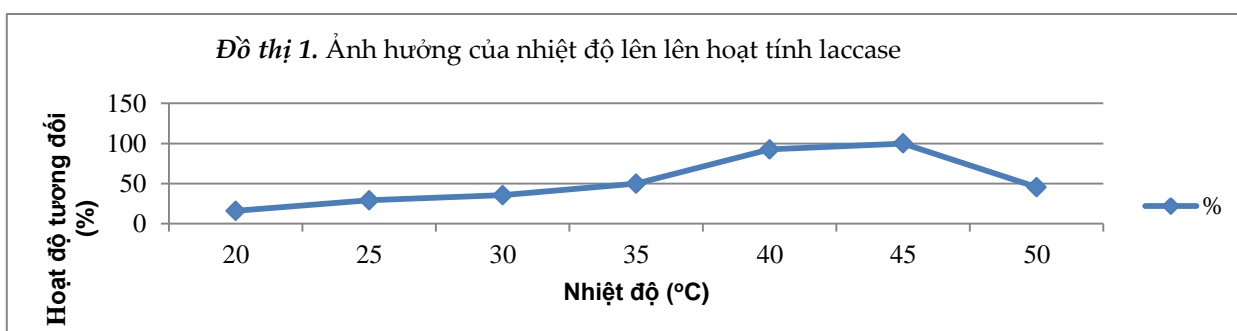
Để tìm ra khoảng pH tối ưu cho hoạt động của laccase từ chủng F6, hoạt tính enzyme được xác định thông qua việc đo OD phần dịch enzyme thu được với pH của đệm thay đổi từ 3-8

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính laccase của chủng F6

pH	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
Hoạt độ laccase (U/L)	80,52 ^c	93,84 ^a	83,07 ^e	74,61 ^b	29,34 ^a	14,85 ^a
Hoạt độ tương đối (%)	80,46	100	86,71	68,03	31,27	15,82

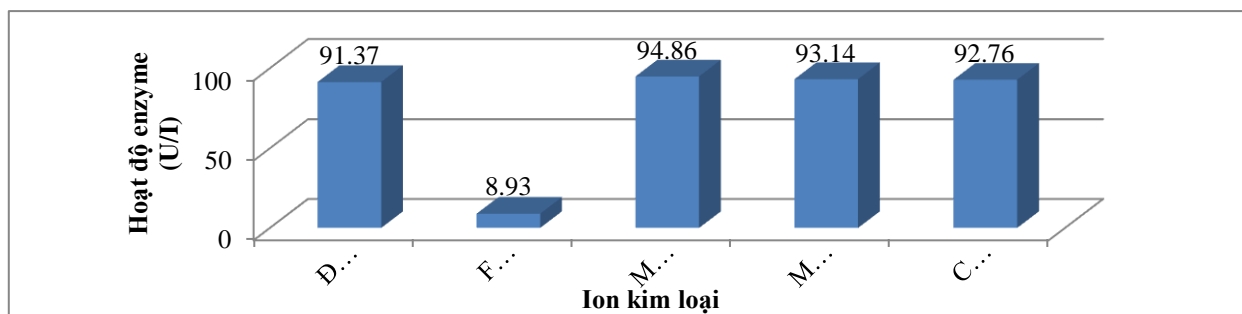
Ghi chú: Các kí tự a, b, c,d,,f chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một cột với $p < 0,05$

Enzyme do F6 sinh ra hoạt động xúc tác phản ứng mạnh nhất trong khoảng pH từ pH 3 – 5, laccase này hoạt động tối ưu ở khoảng pH4, tại đây hoạt tính laccase đo được lên đến 93,84 U/L. Kết quả này cũng khá tương đồng với một số nghiên cứu trước ở các chủng nấm như *Muruliporia* sp là pH 3,5 [Trình Thị Thủy, 2015].



Từ 20°C đến 30°C hoạt độ laccase rất thấp chỉ đạt 16,03% (15,24 U/L) đến 35,55% (33,79 U/L). Tăng nhiệt độ lên 40°C đến 45°C độ enzyme tăng cao từ 92,59% (88,02 U/L) đến 100%. Nhiệt độ thích hợp nhất cho laccase hoạt động là vào khoảng 45°C, hoạt độ enzyme xác định được lên tới 95,06 U/L, nhiệt độ này thấp hơn nhiều so với một số chủng nấm đảm khác như *Pycnoporus sanguineus* là 55°C [Kizhekkedathu Narayanan Niladevi et al, 2005]

Đồ thị 2. Ảnh hưởng của kim loại đến hoạt tính laccase



Hoạt tính laccase của chủng F6 ít bị ảnh hưởng của ion kim loại, chỉ có ion Fe^{2+} làm ức chế hoạt động của enzyme, dường như enzyme bị mất hoạt tính hoàn toàn khi bổ sung 5mM ion Fe^{2+} vào hỗn hợp phản ứng, hoạt tính giảm 91,23% so với mẫu đối chứng. Ở một số nghiên cứu khác, hoạt tính laccase tăng 180,5% khi bổ sung 5mM Mn^{2+} ở loài *P.ostreatus*, tăng 4,5 lần trong môi trường có nồng độ Mn^{2+} 0,8mM ở loài *Coprinus comatus* [Yaropolov et al, 2010.]

Định danh chủng F6

Trình tự ITS của F6 được nhân lên sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Dựa trên đặc điểm khuẩn lạc và hình thái sợi nấm cùng với kết quả giải trình tự trên phần mềm Blast, xác định chủng F6 có độ tương đồng đến 99% với loài *Polyporales* sp khi so sánh trên ngân hàng dữ liệu GenBank.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Perenniporia tephropora isolate D2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1061	1061	97%	0.0	99%	KC414232.1
Polyporales sp. JCM 28403 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA, partial and complete sequence	1056	1056	97%	0.0	99%	LC133841.1
Loweporus sp. 3-L-2-C-31(R MAT)-A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1056	1056	97%	0.0	99%	KJ654481.1
Loweporus sp. 6-L-S-3-C-16(M)-A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1056	1056	97%	0.0	99%	KJ654478.1
Loweporus sp. 6-L-S-3-B-42(M) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1056	1056	97%	0.0	99%	KJ654477.1
Uncultured fungus clone ZMTD-H201308-52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	97%	0.0	99%	KX515920.1
Uncultured fungus clone ZMTD-H201308-40 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	97%	0.0	99%	KX515908.1
Loweporus sp. 2-L-S-1-A-39-A 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence: and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	97%	0.0	99%	KJ654475.1
Loweporus sp. 1 E8838B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	97%	0.0	99%	KJ654410.1
Loweporus sp. 1 E8818A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	97%	0.0	99%	KJ654409.1
Polyporales sp. PSU-E5189 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	97%	0.0	99%	JN116701.1
Polyporales sp. 4 SR-2012 strain 104 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1050	1050	97%	0.0	99%	JQ312162.1
Loweporus sp. 7-ND-5-A-82(W)-C 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1047	1047	97%	0.0	99%	KJ654482.1
Perenniporia corticola isolate SKB1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence: and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1047	1047	97%	0.0	99%	KC570342.1

Hình 4. Kết quả phân tích trình tự tương đồng BLAST của đoạn ITS của chủng F6

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập và định danh được loài *Polyporales* sp F6 có năng sinh tổng hợp laccase mạnh đạt 90,37 (U/L), cũng ghiên cứu và lựa chọn thành công điều kiện môi trường cho loài *Polyporales* sp F6 sinh tổng hợp laccase là môi trường lên men lỏng bổ sung 5% cơ chất bột rom sau 9 ngày lên men. Laccase từ *Polyporales* sp F6 có pH tối ưu ở pH7, nhiệt độ tối ưu là 30°C. Hoạt tính của laccase bị ảnh hưởng bởi một số ion kim loại như Fe²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, nhưng Fe²⁺ lại làm ức chế hoạt tính laccase.

LỜI CẢM ƠN

Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được cung cấp bởi Trường Đại học Tây Nguyên qua đề tài cơ sở năm 2017.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Thị Trân Châu (2009). Công nghệ sinh học, enzym và ứng dụng, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
- [2]. Nguyễn Thị Minh Đức (2001). Thực tập vi sinh học, NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội.
- [3]. Dương Minh Lam, Chiên Trương Thị (2013), "Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của chủng nấm đảm *Trametes maxima* CPB30 sinh laccase ứng dụng trong xử lý màu nước ô nhiễm do thuốc nhuộm ", Tạp chí sinh học, 35(4), tr. 477-483.
- [4]. Nguyễn Đức Long (2011). Công nghệ enzyme. Nhà xuất bản Đại học quốc gia TP. HCM.
- [5]. Nguyễn Thị Phương Mai và cs (2010)."Phân lập *Phanerochaete* sp. N 7.2 sinh tổng hợp laccase", Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 48(3):51-58.
- [6]. Nguyễn Thị Phương Mai và cs (2012)."Tinh sạch và xác định đặc tính của laccase tái tổ hợp từ *Aspergillus niger*®", Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 50(3):297-307.
- [7]. TCVN 7538 - 2: 2005, Chất lượng đất - lấy mẫu - Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.
- [8]. 8.Trịnh Thu Thủy và cs (2015). "Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc sinh tổng hợp enzyme laccase từ gỗ mục", Tạp chí Khoa học và Phát triển, 13(7), tr. 1173-1178.
- [9]. Christiane Galhaup, Harald Wagner Barbara, Hinterstoisser và Dietmar Haltrich, 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), pp.529-536.
- [10]. D. D'Souza-Tido, A.K. Verma, M. Mathew và C.Raghukumar, 2006. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC #2a, isolated from mangrove wood. *Indian Journal of Marine Sciences* 35, 364.
- [11]. Kunamneni A, Ballesteros A, Francisco J.P, Alcalde M, (2007), Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications, *Microbiology Book Series*. pp. 233-245.
- [12]. Yaropolov X, Ding S, (2010). Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoform by *Coprinus comatus*. *Mycoscience*, 51(1): pp 68-74.

ISOLATION FUNGUS STRAINS POSSESS BIOSYNTHESIS OF LACCASE IN BUON MA THUOT CITY

Dang Thi Thanh Ha^{1*}, Vu Thi Dieu Thu, Doan Chien Thang¹,
Pham Thi Ngoc Lan², Nguyen Duc Huy³

¹ Faculty of Natural Sciences & Technology, Tay Nguyen University

² University of Sciences, Hue University

³ Institute of Biotechnology, Hue University

*Email: thanhha.tnu@gmail.com

ABSTRACT

Laccase, which belongs to the group of copper oxidizing enzymes, has a strong oxidizing power, a diverse substrate, and is an environmentally friendly enzyme since in the laccase reaction it only takes oxygen from the air and the only byproduct after the reaction is water, laccase is widely applied in many different fields, especially in textile, dyeing and environmental pollution. Laccase is obtained from various sources such as plants, bacteria, insects and from many other microorganisms. Based on the characteristics of colonies and mycelial morphology, along with the gene coding 18S rRNA, the F6 strain was found to be 99% homologous to the *Polyporales* sp when compared to GenBank (NCBI), the F6 has about 608bp. *Polyporales* sp F6 has strong laccase enzyme biosynthesis, reaching 90.37 (U / L) after 9 days of fermentation. The fermentation condition for this species to produce strong laccase biosynthesis is liquid fermentation, BSM medium supplemented with 5% substrate of straw powder, at a temperature of 30°C, pH7. The activity of laccase is affected by some metal ions such as Fe²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, but Fe²⁺ inhibits the laccase activity.

Keywords: fungi, laccase, isolation, microorganisms, *Polyporales*.



Đặng Thị Thanh Hà sinh ngày 08/12/1983. Bà tốt nghiệp đại học năm 2006 ngành Sinh học, tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm năm 2009 tại Trường Đại học Quy Nhơn. Từ năm 2016 đến 2020, bà là nghiên cứu sinh chuyên ngành Công nghệ sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Ứng dụng công nghệ sinh học trong xử lý ô nhiễm môi trường, xử lý ô nhiễm môi trường bằng thực vật, vi sinh vật, Vi sinh môi trường.



Phạm Thị Ngọc Lan sinh ngày 01/01/1963 tại Hà Tĩnh. Năm 1984, bà tốt nghiệp cử nhân Sinh học tại trường Đại học Tổng hợp Huế. Năm 1995, bà tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Hóa sinh – Sinh lý thực vật tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Năm 2004, bà tốt nghiệp tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý thực vật tại Đại học Huế. Từ năm 1984 đến nay, bà là giảng viên tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Vi sinh vật học, Vi sinh môi trường, Ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất, Phân bón Vi sinh, Enzyme vi sinh vật.



Nguyễn Đức Huy tốt nghiệp đại học năm 2006, chuyên ngành Công nghệ sinh học tại Đại học Bách Khoa Đà Nẵng. Ông nhận học vị thạc sĩ năm 2011 và tiến sĩ năm 2014 tại Đại học Quốc gia Chonbuk, Hàn Quốc. Hiện nay, ông công tác tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Sàng lọc và ứng dụng vi sinh vật, enzyme vi sinh vật, tạo dòng phân tử và biểu hiện tái tổ hợp, điều hòa biểu hiện gen.