

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Công nghệ sinh học đã và đang làm thay đổi thế giới. Chính vì vậy mà nhiều tổ chức và chuyên gia trên thế giới đã khẳng định thế kỷ 21 là thế kỷ của công nghệ sinh học và nó đã thực sự trở thành công cụ không thể thiếu, đóng góp thiết thực và hiệu quả trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp, nông nghiệp, y – dược, vật liệu... với việc tạo ra các giống cây trồng, vật nuôi mới cho năng suất, chất lượng với hiệu quả kinh tế cao, các loại enzyme đã tạo ra những sinh phẩm phục vụ điều trị bệnh, và những chế phẩm vi sinh ứng dụng trong xử lý môi trường.

Với tốc độ ô nhiễm môi trường đang gia tăng do việc thải các chất thải vào môi trường không kiểm soát như hiện nay, sử dụng 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, việc triển khai những phương pháp xử lý hiệu quả và không gây ô nhiễm thứ cấp là điều cấp thiết. 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 nhiễm 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. Như đã biết, các chất độc hại trong môi trường thường là các chất hữu cơ có vòng thơm như các hợp chất phenol, amine vòng hoặc các hợp chất phosphore, để đạt được mục đích xử lý môi trường cần phải phá hủy hoặc loại bỏ các chất độc đó. 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.

Laccase là một enzyme đặc biệt phổ biến và linh hoạt được sản xuất rộng rãi và đa dạng trong tự nhiên như từ thực vật, nấm, vi khuẩn và côn trùng. Laccase (EC 1.10.3.2, p-diphenol oxidase) thuộc nhóm enzyme oxidase, cụ thể là phenol oxidase, xúc tác quá trình oxy hóa nhiều hợp chất hữu cơ bao gồm diphenol, polyphenol, diamine, amine thơm, benzenethiol và một số hợp chất vô cơ như iodine,... Laccase có tính oxy hóa mạnh, có phổ cơ chất đa dạng và sử dụng oxygen 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. Bên cạnh đó, laccase cũng 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.

Với những ứng dụng quan trọng và những lợi thế ưu việt như vậy, chúng tôi chọn nghiên cứu đề tài: ***“Nghiên cứu tạo laccase tái tổ hợp và thử nghiệm khả năng khử màu một số thuốc nhuộm công nghiệp”*** nhằm mục đích tạo được laccase tái tổ hợp để phân giải các hợp chất hữu cơ khó phân hủy gây ô nhiễm môi trường.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Mục tiêu lý thuyết

- Tuyển chọn ra được chủng vi sinh vật mới có khả năng sinh tổng hợp laccase mạnh.
- Nghiên cứu biểu hiện laccase của *Fusarium oxysporum* trong *Pichia pastoris* nhằm nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp.

Mục tiêu thực nghiệm: tạo được laccase tái tổ hợp để phân giải các hợp chất hữu cơ khó phân hủy gây ô nhiễm môi trường.

3. NỘI DUNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Nội dung nghiên cứu

- Tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp laccase
- Tạo dòng gen laccase vào hệ thống vector biểu hiện cho vi sinh vật
- Sinh tổng hợp laccase trong *Pichia pastoris*
- Tinh sạch và xác định đặc tính laccase tái tổ hợp
- Khảo sát khả năng phân hủy các hợp chất màu hữu cơ (khó phân hủy) của laccase tái tổ hợp.

Phạm vi nghiên cứu

Tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp laccase, tạo dòng gen, biểu trong *Pichia pastoris*, tinh sạch và xác định đặc tính laccase tái tổ hợp, khảo sát khả năng phân hủy các hợp chất màu hữu cơ (khó phân hủy) của laccase tái tổ hợp được thực hiện tại Phòng thí nghiệm của Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học và Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

4. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Phân lập chủng *Fusarium oxysporum* HUIB02 có khả năng tiết laccase ngoại bào mạnh. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về laccase từ *F. oxysporum*.
- Tạo dòng và giải trình tự thành công 04 gen mã laccase từ DNA và cDNA của chủng *F. oxysporum* HUIB02. Các gen có độ tương đồng cao với nhóm gen laccase với các chủng *F. oxysporum* phân lập từ các vùng khác trên thế giới cho thấy có sự bảo thủ cao về nhóm gen mã hóa laccase ở nấm nói chung và *F. oxysporum* nói riêng.
- Biểu hiện tái tổ hợp thành công gen mã hóa laccase từ cDNA của chủng *F. oxysporum* HUIB02 trong *P. pastoris*. Gen được ký hiệu *Folac1*, đây là nghiên cứu đầu tiên trên thế giới về biểu hiện tái tổ hợp thành công *Folac1* trong vật chủ.
- Laccase tự nhiên và laccase tái tổ hợp có khả năng loại bỏ màu nhiều thuốc nhuộm tổng hợp với hiệu suất hơn 90%. Kết quả chứng minh tính ứng dụng cao của laccase trong xử lý các hợp chất hữu cơ gây ô nhiễm môi trường.

5. CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án được trình bày trong 110 trang A4 (không tính tài liệu tham khảo). Trong đó, phần Mở đầu 3 trang, Tổng quan tài liệu 29 trang, Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu 15 trang, Kết quả nghiên cứu 47 trang, Bàn luận 14 trang, Kết luận và Kiến nghị 1 trang, Danh mục các công trình công bố 1 trang, Tài liệu tham khảo 15 trang với 138 tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh và tiếng Việt. Luận án có 7 bảng và 49 hình.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết về 3 vấn đề chính với các nội dung: **(1) Giới thiệu chung về laccase; (2) Hệ thống biểu hiện *Pichia pastoris*; (3) Thuốc nhuộm công nghiệp và các biện pháp xử lý**

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Các chủng nấm mốc phân lập từ xác bã thực vật tại các địa điểm khác nhau trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân lập các chủng nấm mốc có hoạt tính laccase

2.2.2. Xác định hoạt độ enzyme laccase.

2.2.3. Xác định protein ngoại bào bằng phương pháp Bradford

2.2.4. Xác định một số đặc tính của laccase như ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và ion kim loại.

2.2.5. Định danh phân tử chủng nấm có hoạt tính laccase mạnh nhất

2.2.5.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2.5.2. Khuếch đại trình tự ITS 1-4

2.2.5.3. Giải trình tự và xây dựng cây phát sinh loài

2.2.6. Phân lập các gen mã hóa laccase

2.2.6.1. Sinh tổng hợp cDNA và khuếch đại gen từ cDNA

*2.2.6.2. Khuếch đại gen *Folac1*, *Folac2*, *Folac3*, *Folac4* bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu*

2.2.6.3. Gắn sản phẩm PCR vào vector tạo dòng

*2.2.6.4. Biến nạp vào *E. coli* TOP10 và chọn lọc thể biến nạp*

2.2.6.5. Giải trình tự gen laccase

2.2.7. Biểu hiện gen mã hóa enzyme *Folac1* trong *P. pastoris*

2.2.7.1. Tạo dòng trong vector biểu hiện pPICZαA

*2.2.7.2. Biến nạp vào *P. pastoris**

2.2.7.3. Biểu hiện gen laccase

2.2.8. Xác định hoạt tính enzyme tái tổ hợp

2.2.9. Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đến sự biểu hiện laccase tái tổ hợp

2.2.10. Tinh sạch protein tái tổ hợp

2.2.11. Điện di SDS – PAGE

2.2.12. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính laccase tái tổ hợp

2.2.13. Thử nghiệm khả năng phân hủy thuốc nhuộm công nghiệp của laccase tự nhiên và laccase tái tổ hợp

2.2.13.1. Thử nghiệm xử lý màu của chủng tự nhiên

2.2.13.2. Thử nghiệm xử lý màu của chủng tái tổ hợp

2.14. Xử lý thống kê

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM MỐC CÓ HOẠT TÍNH LACCASE

3.1.1. Phân lập, sàng lọc các chủng nấm mốc có khả năng phân hủy lignin

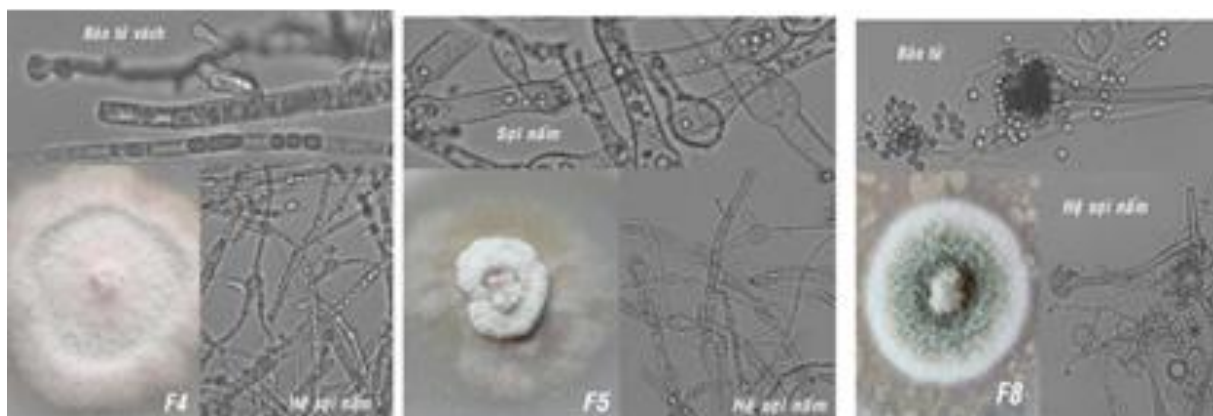
Các mẫu mùn thực vật được thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau, được tiến hành pha loãng và sử dụng 10^{-4} để cấy trải trên môi trường đĩa thạch PDA. Sau 3 đến 5 ngày nuôi ở 30°C , quan sát chọn những chủng nấm sợi trắng có khuẩn lạc phát triển mạnh, tiến hành thử định tính khả năng sinh laccase trên môi trường BSM bổ sung cơ chất là guaiacol (0,01%) làm chỉ thị màu cho các phản ứng của laccase. Qua kiểm tra, so sánh vùng màu phân giải trên đĩa thạch, chúng tôi chọn ra 3 chủng nấm F4; F5 và F8, có vùng màu đậm hơn, vượt trội về khả năng phân hủy guaiacol, để tiếp tục nghiên cứu (hình 3.1).



Hình 3.1. Sàng lọc chủng sinh tổng hợp peroxidase trên môi trường chọn lọc có bổ sung guaiacol

3.1.2. Một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử của các chủng F4; F5 và F8

Các chủng nấm F4, F5 và F8 được nuôi trên môi trường PDA sau 3 đến 5 ngày, đo kích thước đường kính khuẩn lạc, quan sát màu sắc khuẩn lạc bằng mắt thường và quan sát hình thái khuẩn lạc dưới kính hiển vi quang học (hình 3.2).



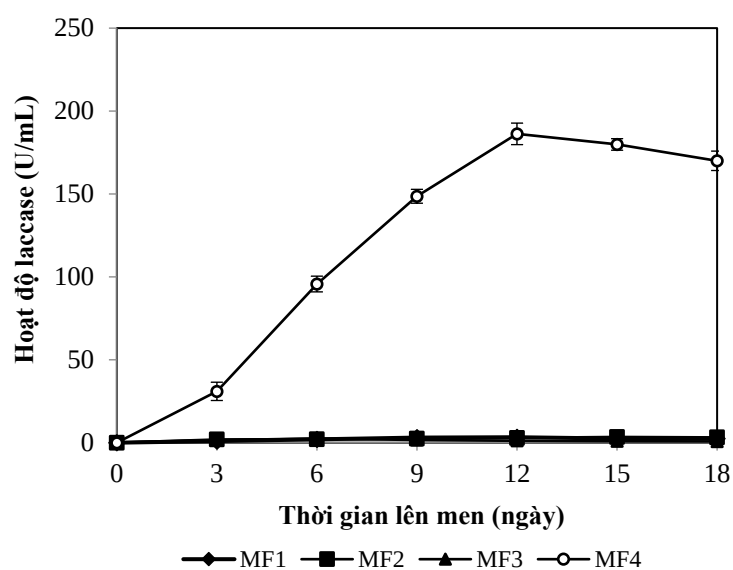
Hình 3.2. Khuẩn lạc sợi nấm chủng F4, F5, F8

3.1.3. Đánh giá khả năng sinh laccase của ba chủng nấm F4; F5 và F8

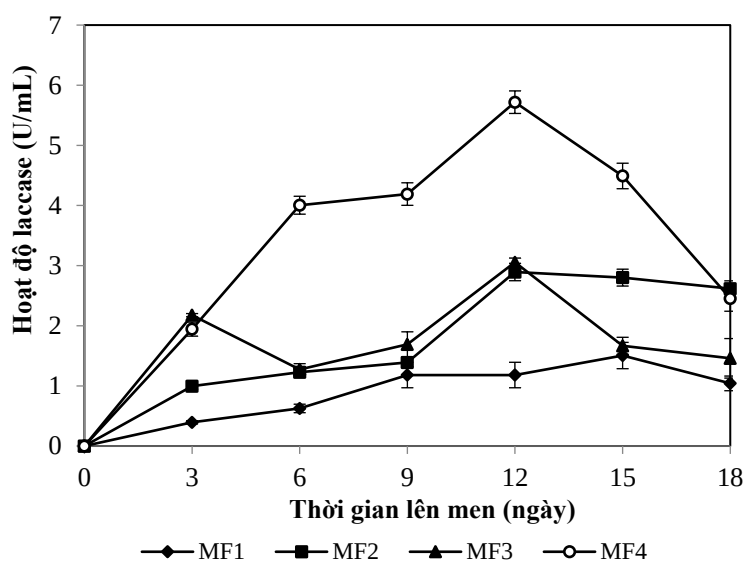
3.1.3.1. Khảo sát khả năng tích lũy laccase trên các điều kiện môi trường lên men

Khảo sát khả năng tích lũy enzyme laccase, chúng tôi chọn 2 điều kiện nuôi cấy là lên men bán rắn (10% cơ chất) và lên men lỏng (5% cơ chất). Trên mỗi điều kiện, chúng tôi chọn 2 loại môi trường BSM bổ sung cơ chất là bột rom và bột gỗ.

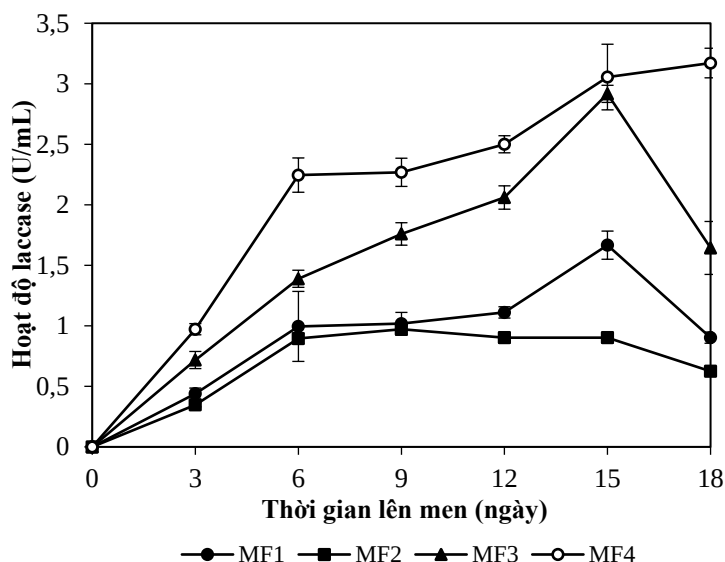
Kết quả khảo sát khả năng tích lũy laccase của chủng F4, F5 và F8 trên 4 điều kiện lên men là MF1, MF2, MF3 và MF4 qua 18 ngày nuôi cấy, thể hiện lần lượt trong *hình 3.3, 3.4, 3.5*.



Hình 3.3. Khả năng tích lũy laccase của chủng F4 ở 4 môi trường lên men



Hình 3.4. Khả năng tích lũy laccase của chủng F5 ở 4 môi trường lên men

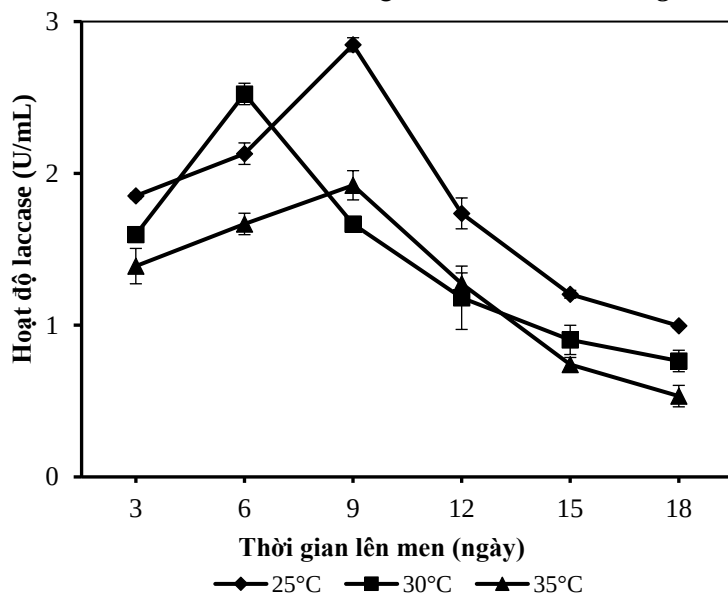


Hình 3.5. Khả năng tích lũy laccase của chủng F8 ở 4 môi trường lên men

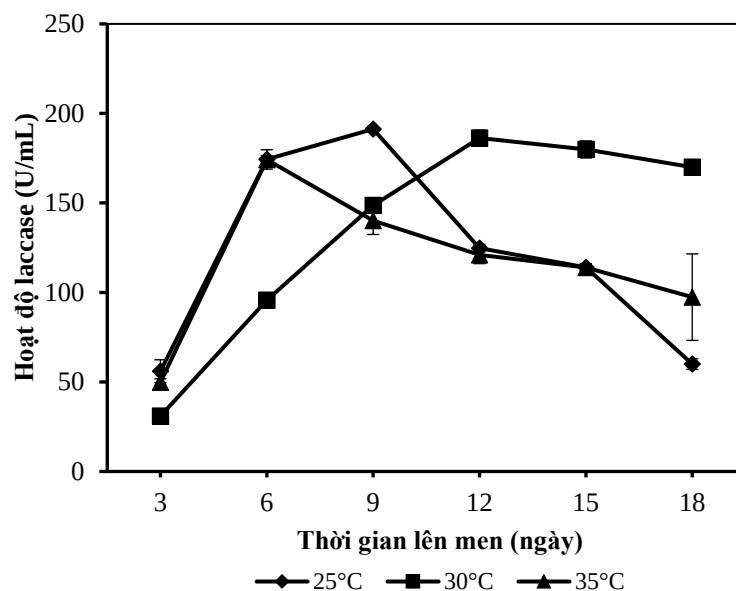
Như vậy, rom là một cơ chất tiềm năng để sản xuất laccase - một nguồn nguyên liệu rẻ tiền và hiệu quả.

3.1.4.2. Khảo sát khả năng tích lũy laccase trên các điều kiện nhiệt độ lên men

Chủng F4; F5 và F8 có khả năng sinh enzyme laccase ngoại bào trong điều kiện lên men lỏng cao hơn so với lên men bán rắn. Vì vậy chúng tôi đã tiếp tục khảo sát khả năng tích lũy laccase trên 3 khoảng nhiệt độ lên men là 25°C; 30°C và 35°C trong điều kiện lên men lỏng.

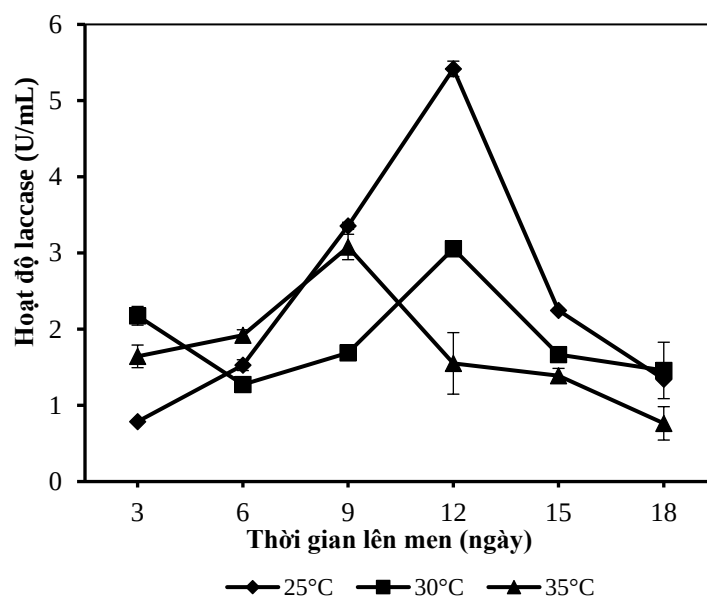


Hình 3.6. Khả năng tích lũy laccase của chủng F4 ở 3 nhiệt độ lên men khác nhau trong môi trường lên men MF3

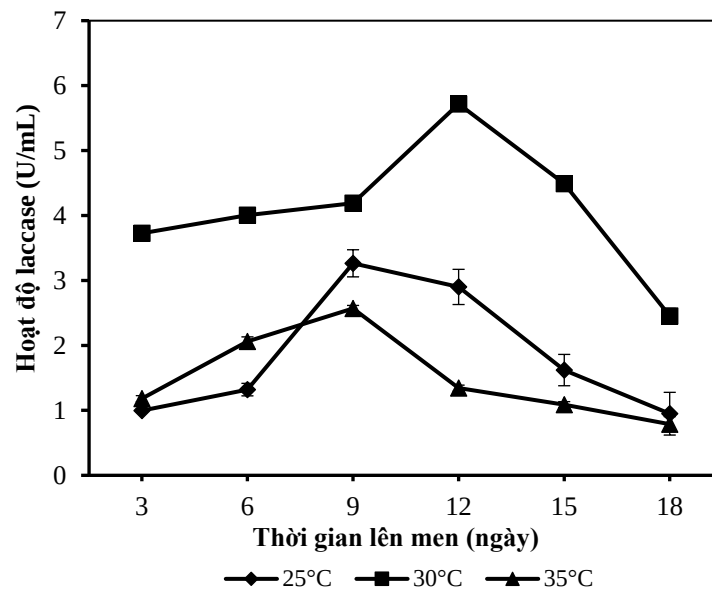


Hình 3.7. Khả năng tích lũy laccase của chủng F4 ở 3 nhiệt độ lên men khác nhau trong môi trường lên men MF4.

Chủng F5 được nuôi ở các nhiệt độ khác nhau trên 2 loại môi trường là MF3 và MF4, kết quả được đánh giá trong 18 ngày lên men.

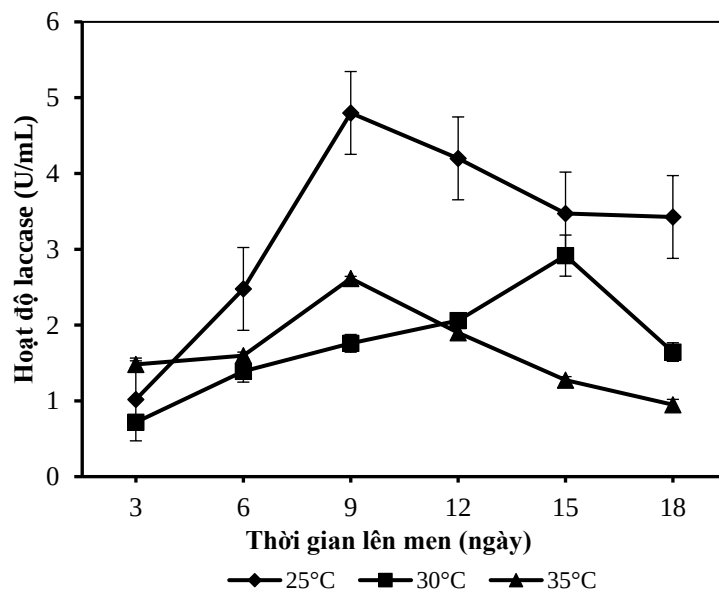


Hình 3.8. Khả năng tích lũy laccase của chủng F5 ở 3 nhiệt độ lên men khác nhau trong môi trường lên men MF3

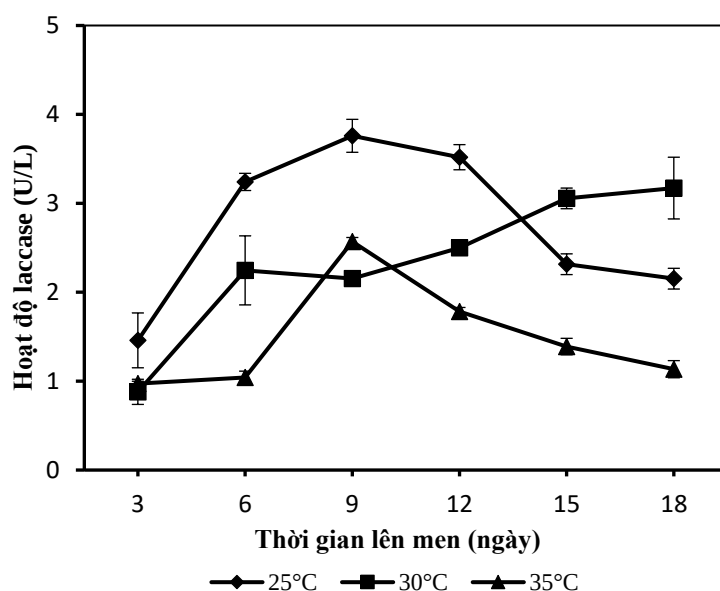


Hình 3.9. Khả năng tích lũy laccase của chủng F5 ở 3 nhiệt độ lên men khác nhau trong môi trường lên men MF4

Chủng F8 được nuôi ở các nhiệt độ khác nhau trên 2 loại môi trường là MF3 và MF4, kết quả được đánh giá trong 18 ngày lên men



Hình 3.10. Khả năng tích lũy laccase của chủng F8 ở 3 nhiệt độ lên men khác nhau trong môi trường lên men MF3



Hình 3.11. Khả năng tích lũy laccase của chủng F8 ở 3 nhiệt độ lên men khác nhau trong môi trường lên men MF4

3.1.4.3. Hàm lượng protein tổng số và độ sạch của enzyme

Bảng 3.1. Hàm lượng protein và hoạt tính laccase của 3 chủng F4, F5, F8

Chủng	Protein tổng số (µg/mL)	Hoạt tính (U/mL)	Hoạt độ riêng (U/mg)
F4	45,7	186	4,07
F5	59,0	5,72	0,1
F8	25,7	3,3	0,13

Hoạt độ riêng là số đơn vị enzyme/1mg protein (U/mg). Dựa vào bảng 3.1, laccase từ chủng F4 có độ sạch cao hơn nhiều so với chủng F5 và F8.

3.1.4. Khảo sát một số đặc tính của laccase tự nhiên

3.1.5.1. Ảnh hưởng của pH

Enzyme laccase do F4 sinh ra hoạt động xúc tác phản ứng mạnh nhất trong khoảng pH từ 4 – 6, khi tăng pH từ 3 đến 5 hoạt độ enzyme cũng tăng từ 72,1% (145 U/L) đến 100%, laccase này hoạt động tối ưu khoảng pH5, tại đây hoạt tính laccase đo được lên đến 201,1 U/L. Hoạt tính giảm nhẹ khi tăng lên pH 6 còn 89,5% (180 U/L), sau đó giảm mạnh khi tăng pH lên 8 chỉ còn 33,1% (66,7 U/L).

3.1.5.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khi nhiệt độ tăng dần từ 20°C đến 45°C hoạt tính laccase do chủng F4 sinh ra cũng tăng dần từ 66,4 % (139,4 U/L) đến 100% (208,8 U/L), nhiệt độ thích hợp nhất cho laccase hoạt động khoảng 45°C (208,5 U/L) và giảm khi nhiệt độ tăng lên 50°C còn 74,7% (155,7 U/L).

3.1.5.3. Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt độ laccase

Enzyme bị mất hoạt tính hoàn toàn khi bổ sung 5mM ion Fe^{2+} vào hỗn hợp phản ứng và hoạt tính giảm 96,7% so với đối chứng. Cu^{2+} ; Mg^{2+} và Co^{2+} làm tăng nhẹ hoạt tính laccase lên tương ứng 5%;

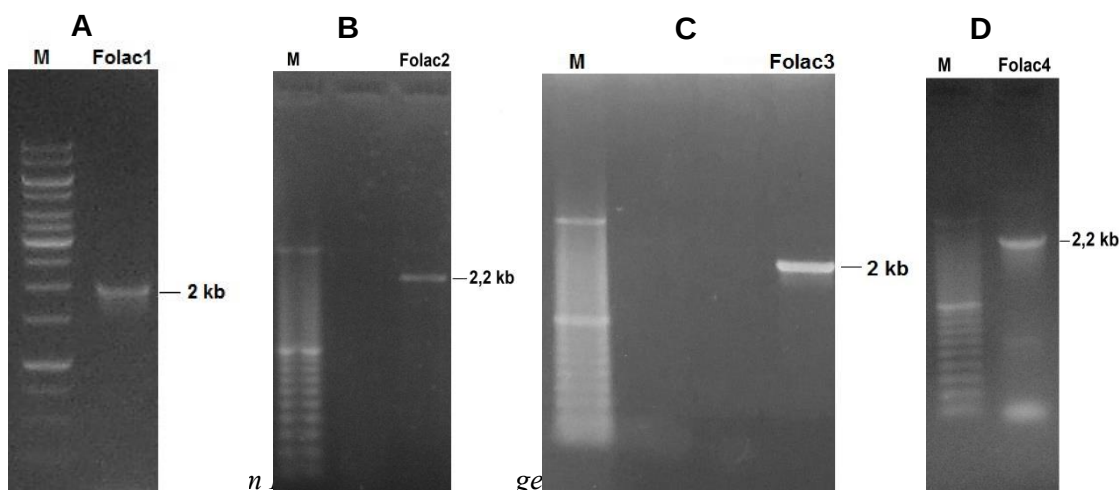
15%; 4% so với đối chứng, nhưng cũng không đáng kể.

3.1.5. Định danh vi sinh vật

Trình tự ITS của F4 được xác định bao gồm 514 cặp base nitơ, so sánh với các trình tự gen 18S rRNA của các chủng vi nấm đã công bố trên các ngân hàng dữ liệu Genbank, EMBL cho thấy chủng F4 có mức tương đồng cao với các chủng vi nấm thuộc chi *Fusarium*, loài *F. oxysporum*

3.2. TẠO DÒNG CÁC GEN LACCASE TỪ *FUSARIUM OXYSPORUM*

Kết quả khuếch đại PCR gen *Folac1*, *Folac2*, *Folac3* và *Folac4* bằng cặp mồi đặc hiệu *Folac1F/Folac1R*; *Folac2F/Folac2R*; *Folac3F/Folac3R*; *Folac4F/Folac4R* được trình bày ở hình 3.12



M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ),

A. Sản phẩm gen *Folac1* với khuôn mẫu là cDNA và cặp mồi *Folac1F/Folac1R*.

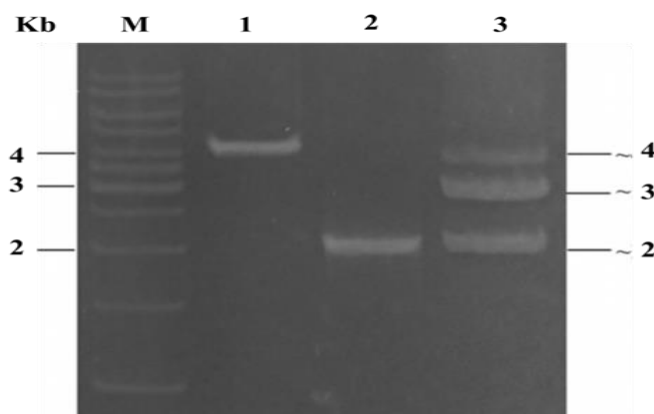
B. Sản phẩm gen *Folac2* với khuôn mẫu là DNA tổng số và cặp mồi *Folac2F/Folac2R*.

C. Sản phẩm gen *Folac3* với khuôn mẫu là DNA tổng số và cặp mồi *Folac3F/Folac3R*.

D. Sản phẩm gen *Folac4* với khuôn mẫu là DNA tổng số và cặp mồi *Folac4F/Folac4R*

Sản phẩm PCR trên gel agarose 1% xuất hiện băng rõ, không có các sản phẩm phụ, có kích thước khoảng 2 kb đối với *Folac1* và *Folac3*, kích thước gen 2,2 kb đối với *Folac2* và *Folac4*, tương đương kích thước các gen laccase của *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4278 đã được công bố trên NCBI

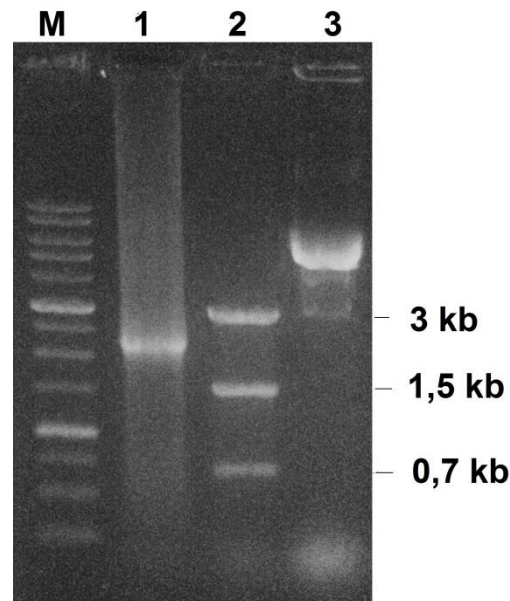
3.2.2. Tạo dòng các gen mã hóa enzyme laccase trong vector pGEM®T-Easy



Hình 3.13. Sản phẩm cắt hạn chế bằng *EcoRI* của plasmid tái tổ hợp pGEM®T-Easy-*Folac1*.

M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ);

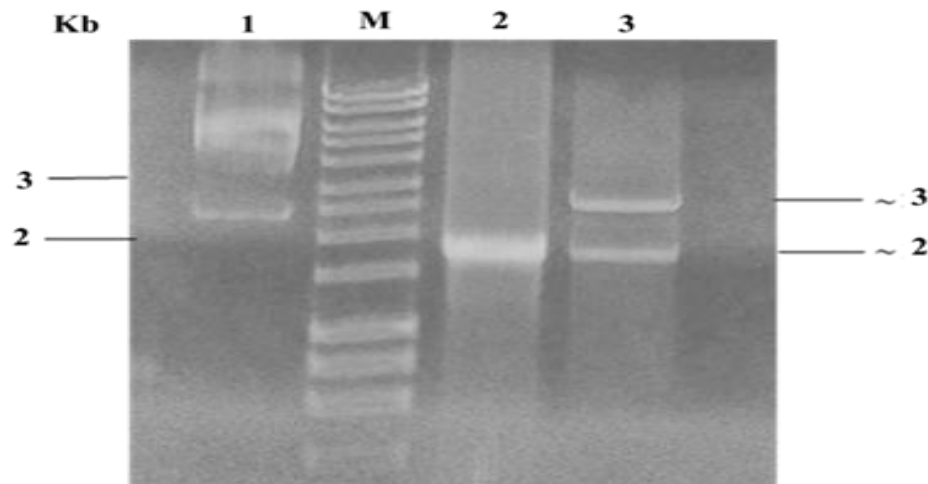
- 1: plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac1* tách chiết từ *E. coli* TOP10;
- 2: sản phẩm PCR gen *Folac1* trên DNA khuôn mẫu là plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac1*;
- 3: sản phẩm phản ứng cắt plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac1* bằng enzyme *EcoRI*.



Hình 3.14. Sản phẩm cắt hạn chế bằng *EcoRI* plasmid tái tổ hợp pGEM®T-Easy-*Folac2*.

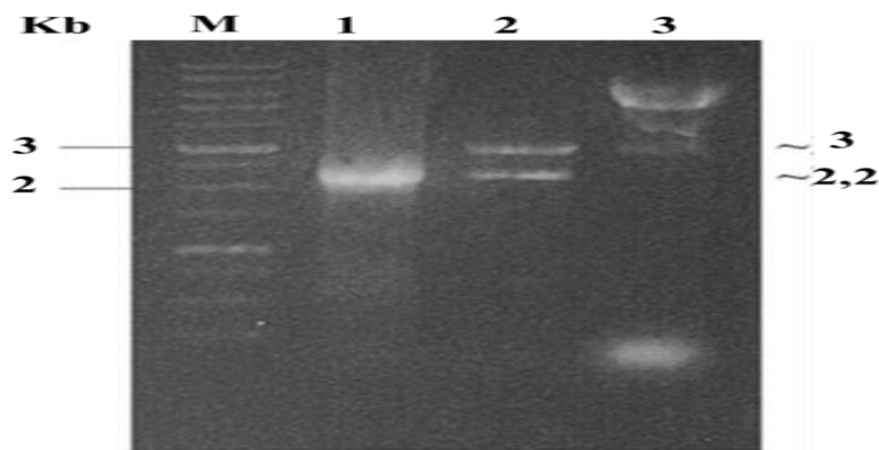
M: PreciGene 1 kb DNA Ladder (BioPioneer),

- 1: Sản phẩm PCR gen *Folac2* trên DNA khuôn mẫu là plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac2*;
- 2: Sản phẩm phản ứng cắt plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac2* bằng enzyme *EcoRI*;
- 3: Plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac2* tách chiết từ *E. coli* TOP10.



Hình 3.15. Sản phẩm cắt hạn chế bằng *EcoRI* của plasmid tái tổ hợp pGEM®T-Easy-*Folac3*.

M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 1: plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac3* tách chiết từ *E. coli* TOP10; 2: sản phẩm PCR gen *lac1* trên DNA khuôn mẫu là plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac3*; 3: sản phẩm phản ứng cắt plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac3* bằng enzyme *EcoRI*



Hình 3.16. Sản phẩm cắt hạn chế bằng *EcoRI* của vector tái tổ hợp pGEM®T-Folac4

Thang DNA chuẩn (GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ)); 1: Sản phẩm PCR gen *Folac4* sử dụng vector tái tổ hợp pGEM®T-Folac4 làm DNA khuôn mẫu; 2: Sản phẩm phản ứng cắt vector tái tổ hợp pGEM®T-Folac4 bằng enzyme *EcoRI*; 3: Plasmid tái tổ hợp pGEM®T- *Folac4* tách chiết từ *E. coli* TOP10

3.2.3. Giải trình tự gen laccase

Plasmid mang vector tái tổ hợp của từng gen *Folac1*, *Folac2*, *Folac3* và *Folac4* được gửi giải trình tự nucleotide bởi công ty FIRST BASE (Malaysia).

3.2.3.1. Trình tự gen *Folac1*

Gen *Folac1* được tạo dòng từ cDNA có kích thước 2064 nucleotide trong trình tự nucleotide thu được không có các đoạn intron.

3.2.3.2. Trình tự gen *Folac2*

Gen *Folac2* có chiều dài 2229 nucleotide và chứa 5 vùng không mã hóa với chiều dài của các vùng lần lượt là 52 nucleotide, 48 nucleotide, 52 nucleotide, 55 nucleotide, 47 nucleotide, đã được đăng ký trên Genbank với mã số KY825237.

3.2.3.3. Trình tự gen *Folac3*

Gen *Folac3* có chiều dài 1957 nucleotide bằng kích thước khuôn mẫu gen *Folac3* của chủng *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287. Trình tự hoàn chỉnh gen *Folac3* được đăng ký trên ngân hàng gen Genbank với mã số KY825238.

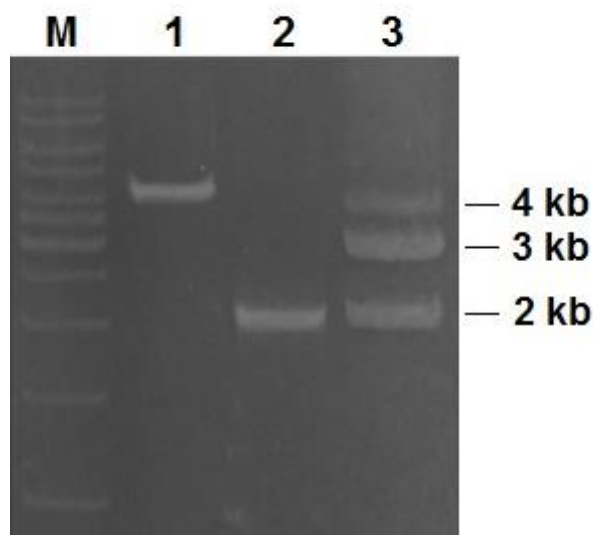
3.2.3.4. Trình tự gen *Folac4*

Gen *Folac4* có chiều dài 2238 nu và chứa 5 vùng không mã hóa với chiều dài của các vùng lần lượt là 53 nucleotide, 50 nucleotide, 59 nucleotide, 52 nucleotide, 47 nucleotide. Trình tự nucleotide đã được đăng ký trên ngân hàng gen GenBank với mã số KY825239.

3.3. BIỂU HIỆN GEN LACCASE TRONG *P. PASTORIS*

3.3.1. Tạo dòng *cFolac1* vào pGEM®T-Easy và biến nạp vào *E. coli* Top10

Chúng tôi chọn *cFolac1* để tiếp tục nghiên cứu sản xuất laccase tái tổ hợp thông qua vật chủ *P. pastoris*



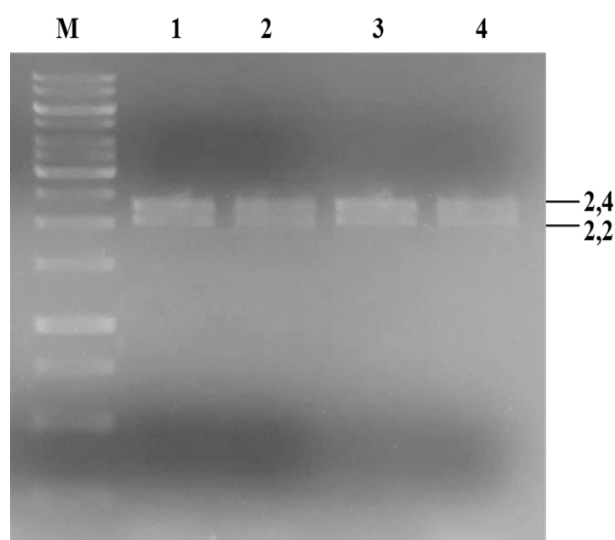
Hình 3.17. Sản phẩm cắt hạn chế bằng EcoRI plasmid tái tổ hợp pGEM®T-Easy-*Folac1*.

M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

1: plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac1* tách chiết từ *E. coli* TOP10;

2: sản phẩm PCR gen *Folac1* trên DNA khuôn mẫu là plasmid tái tổ hợp pGEM®T-*Folac1*;

3.3.2. Tạo dòng vào vector biểu hiện pPICZαA



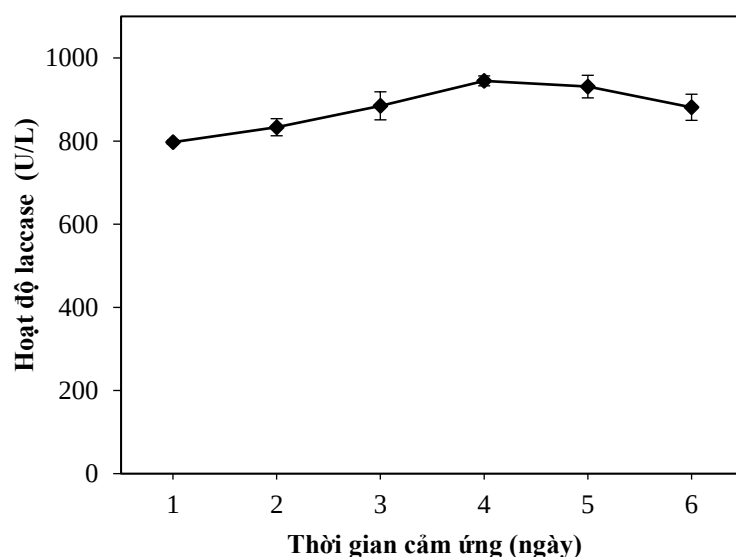
Hình 3.18. Sản phẩm PCR *cFolac1* sử dụng cặp primer AOX1.

M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder,

1-4: sản phẩm PCR *cFolac1* từ DNA tổng số của *P. pastoris* tái tổ hợp

3.3.3. Biểu hiện gen *Folac1* trong *P. pastoris*

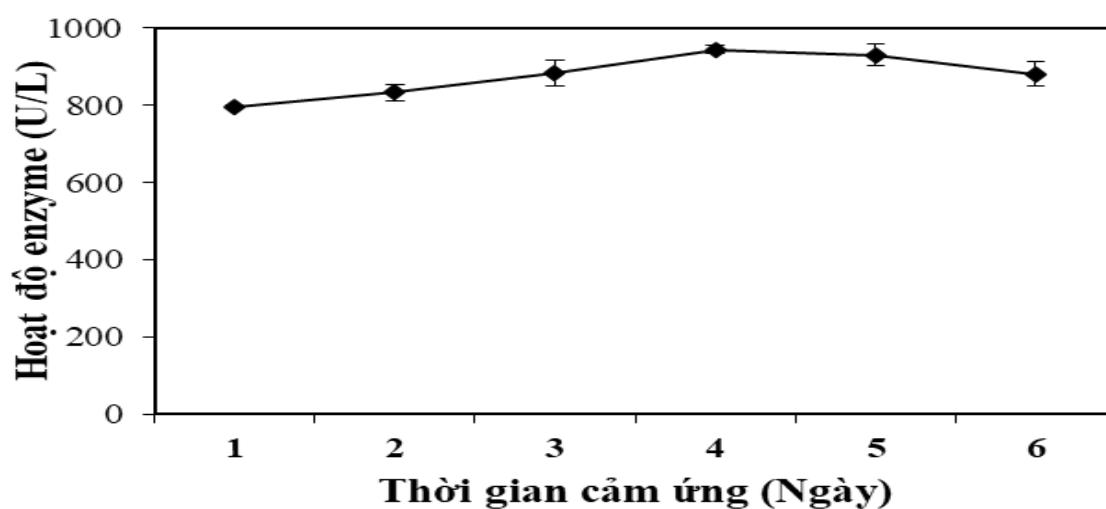
Xác định hoạt độ laccase tái tổ hợp



Hình 3.19. Hoạt độ Folac1 tái tổ hợp theo thời gian cảm ứng.

3.3.4. Tối ưu hóa sự biểu hiện laccase tái tổ hợp

3.3.4.1. Ảnh hưởng thời gian cảm ứng



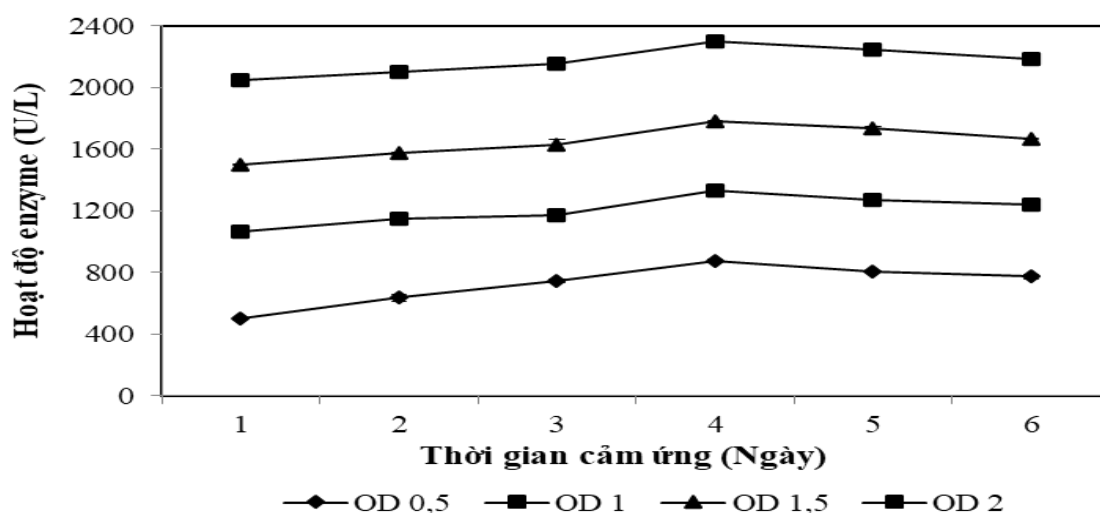
Hình 3.20. Hoạt tính *rFolac1* theo thời gian cảm ứng

Hoạt độ của *rFolac1* tăng dần và đạt cực đại 944,8 U/L vào ngày thứ 4. Laccase bắt đầu được tích lũy trong môi trường có cảm ứng 1% methanol ở ngày nuôi cấy thứ 1. Hoạt độ laccase bắt đầu giảm vào ngày thứ 5, tuy nhiên ở ngày nuôi cấy cuối cùng, hoạt độ enzyme vẫn cao hơn so với ngày nuôi cấy thứ 1

3.3.4.2. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng, mật độ tế bào, nhiệt độ và tốc độ lắc

* Ảnh hưởng của mật độ tế bào

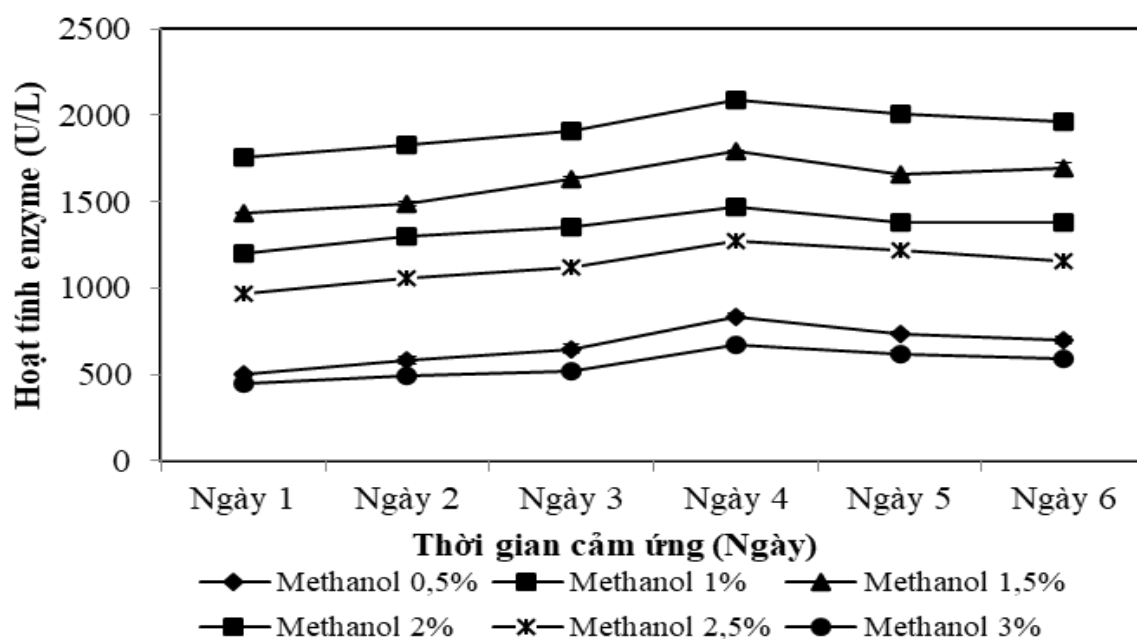
rFolac1 được nuôi trong môi trường cảm ứng YPM bằng cách bổ sung methanol tại các thời điểm OD₆₀₀ là 0,5; 1; 1,5; 2 và duy trì nồng độ methanol 1% trong 6 ngày để sản xuất laccase. Từ kết quả cho thấy, giá trị OD = 0,5, OD = 1, OD = 1,5 và OD = 2 hoạt động laccase đều có sự tăng hoặc giảm rõ rệt giữa các khoảng thời gian



Hình 3.21. Ảnh hưởng của mật độ tế bào

***Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng (methanol)**

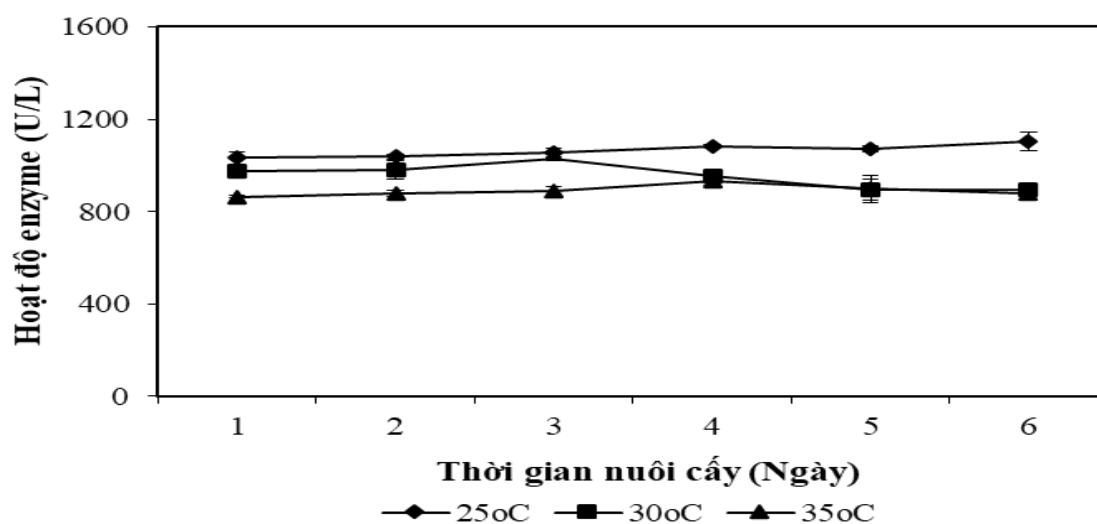
Tại nồng độ methanol 2% hoạt động enzyme laccase cao nhất vào ngày thứ tư là 2093,6 U/mL. Methanol tại các nồng độ 1% và 1,5% thì hoạt tính laccase không ổn định từ sau ngày thứ tư. Hoạt tính enzyme từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 5 giảm và sau đó tăng lại từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 6.



Hình 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng methanol

***Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy**

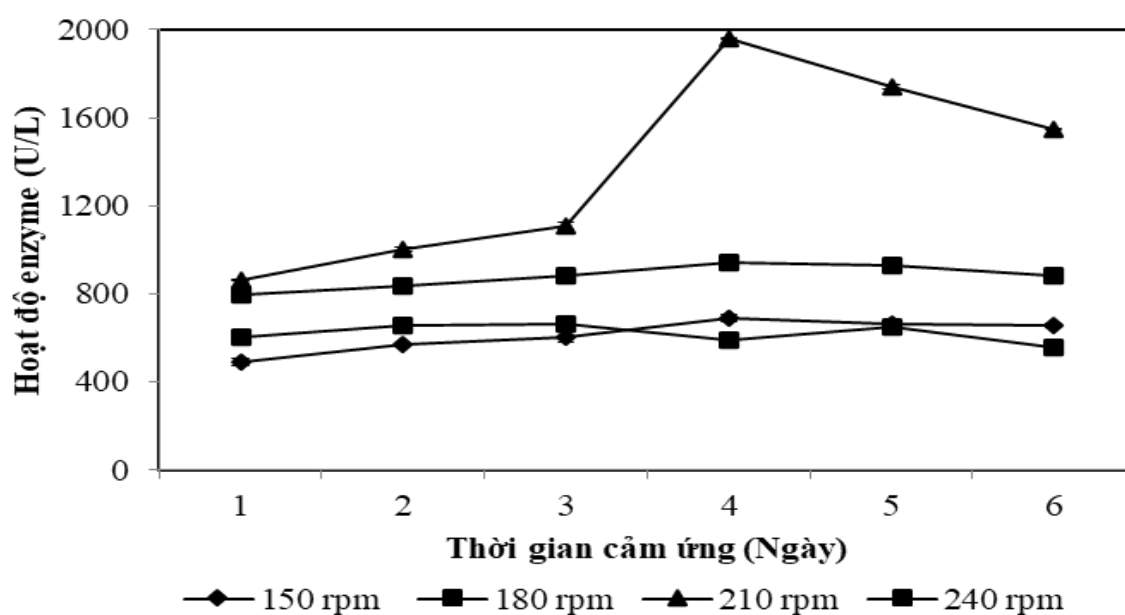
Hoạt độ enzyme laccase tăng chậm từ ngày thứ 1 (1032 U/mL) đến ngày thứ 6 (1102,5 U/mL), chỉ ở ngày thứ 5 thì hoạt động enzyme laccase giảm nhẹ (1069,9 U/mL). Đối với 30°C, thì hoạt động enzyme cao nhất ở ngày thứ 3 (1028,8 U/mL). Hoạt động enzyme tăng dần từ ngày thứ 1 (975,6 U/mL) đến ngày thứ 3 (1028,8 U/mL) và sau ngày thứ 3 thì hoạt động enzyme giảm. Hoạt độ enzyme ở ngày thứ 6 thấp hơn so với ngày đầu tiên



Hình 3.23. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy

*Ảnh hưởng của tốc độ lắc

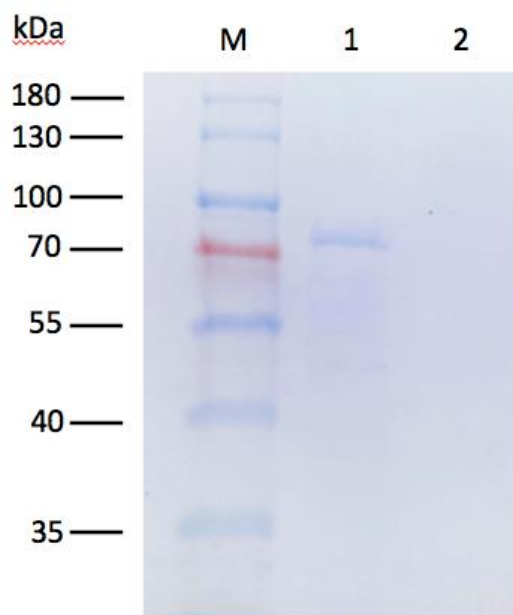
Tốc độ lắc 150 rpm, 180 rpm và 240 rpm thì hoạt tính laccase không thay đổi nhiều giữa các ngày cảm ứng. Tuy nhiên, ở tốc độ lắc 210 rpm thì cho thấy hoạt tính laccase tăng dần từ ngày thứ nhất (860,7 U/mL) đến ngày thứ 3 (1106,5 U/ml), ở ngày thứ 4 thì tăng mạnh và sau ngày thứ 4 thì hoạt tính enzyme giảm dần. Hoạt tính laccase ở ngày thứ 6 cao hơn so với ngày thứ nhất.



Hình 3.24. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

3.3.5. Tinh sạch enzyme

Khối lượng phân tử của *Folac1* được tinh sạch là khoảng 76 kDa. bao gồm khối lượng phân tử của enzyme khoảng 74 kDa và peptide tín hiệu khoảng 2,7 kDa khi được bổ sung methanol 1%.



Hình 3.25. Kết quả hình ảnh điện di SDS – PAGE của protein laccase

M: Thang phân tử protein có kích thước từ 35 kDa đến 180 kDa (hãng Thermo Sciencetific);

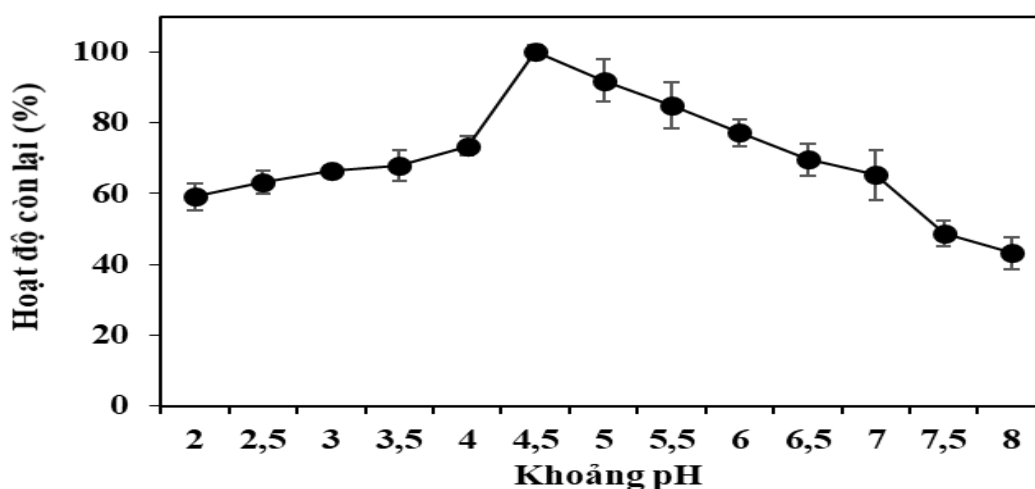
1: Chủng *P.pastoris* mang gen *Folac1* cảm ứng methanol,

2: Chủng *P. pastoris* mang gen *Folac1* không cảm ứng methanol.

3.3.6. Khảo sát đặc điểm enzyme tái tổ hợp

3.3.6.1. Ảnh hưởng của pH đến enzyme

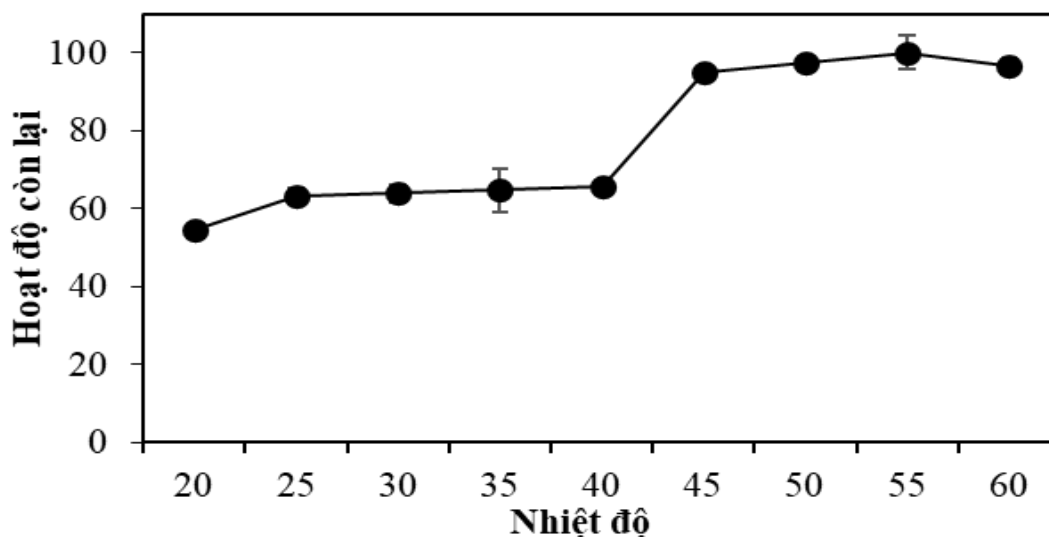
Laccase bền ở pH từ 4 đến 7, hoạt tính laccase còn lại 59% - 43%. Enzyme không bền trong các đệm kiềm pH > 7,5. Ở pH 7,5 hoạt tính còn lại chỉ bằng ½ hoạt tính ban đầu và ở pH 8 hoạt tính chỉ còn lại chỉ đạt < 50% hoạt tính ban đầu.



Hình 3.26. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của laccase

3.3.7.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên enzyme

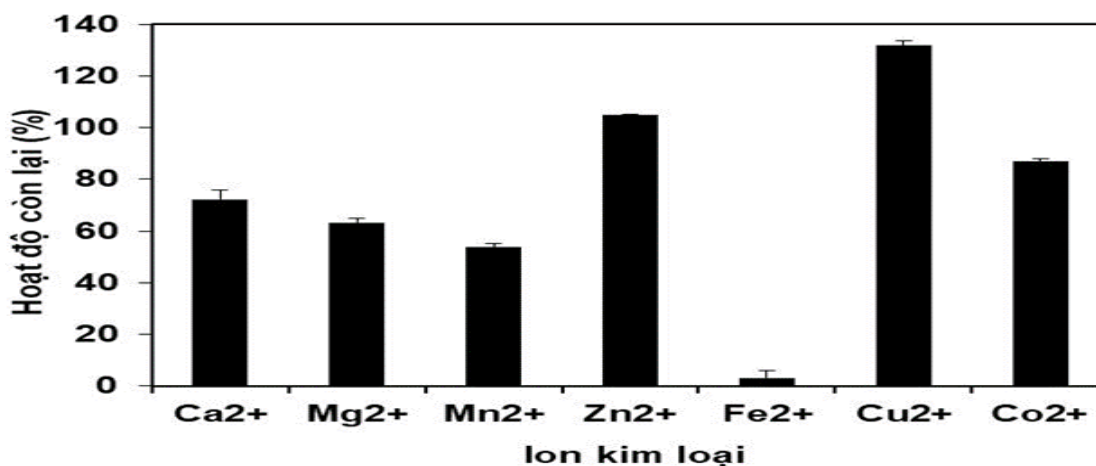
Sau 1 giờ ủ từ 20°C đến 40°C hoạt tính laccase tăng dần từ 54% đến 65,65%. Hoạt động enzyme tăng mạnh từ 40°C đến 60°C



Hình 3.27. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền của enzyme

3.3.7.3. Ảnh hưởng của ion kim loại lên enzyme

Hoạt tính của enzyme đã được tăng khi có Cu^{2+} ở nồng độ 1 mM, Ca^{2+} ở nồng độ 2 mM, Zn^{2+} ở nồng độ 1 mM và Co^{2+} ở nồng độ 1 mM. Trong đó, ion Cu^{2+} làm tăng mạnh hoạt động của enzyme lên đến 132%.



Hình 3.28. Ảnh hưởng của ion kim loại đến độ bền của laccase

3.4. THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG PHÂN HỦY THUỐC NHUỘM CÔNG NGHIỆP CỦA LACCASE TỰ NHIÊN VÀ LACCASE TÁI TỔ HỢP

3.4.1. Khả năng phân hủy thuốc nhuộm công nghiệp của laccase tự nhiên

Khả năng phân hủy thuốc nhuộm tổng hợp của *F. oxysporum* HUIB02 tự nhiên được thể hiện trong bảng sau

Bảng 3.2. Tỷ lệ khử màu thuốc nhuộm tổng hợp của *F. oxysporum* HUIB02

Thuốc nhuộm tổng hợp	Hiệu suất phân hủy thuốc nhuộm (%)				
	Thời gian nuôi cấy (ngày)				
	3	6	9	12	15
Bromothymol blue	99.22 ^b	99.67 ^a	99.74 ^a	99.73 ^a	99.68 ^a

Methylene blue	19.48 ^c	25.07 ^b	30.02 ^a	31.76 ^a	32.32 ^a
Methyl orange	94.63 ^b	96.14 ^b	99.20 ^a	99.39 ^a	99.56 ^a
Crystal violet	4.26 ^c	6.21 ^b	8.73 ^a	8.98 ^a	9.33 ^a
Remazol brilliant blue R	96.48 ^b	98.77 ^a	98.93 ^a	98.71 ^a	98.66 ^a
Aniline blue	29.36 ^d	33.94 ^c	38.24 ^b	41.25 ^{ab}	43.97 ^a
Evans blue	23.15 ^d	35.99 ^c	49.34 ^b	55.65 ^a	57.64 ^a
Reactive black	11.09 ^b	12.85 ^b	13.95 ^{ab}	14.26 ^{ab}	18.06 ^a
Indigo carmine	76.93 ^c	77.88 ^c	90.53 ^b	95.10 ^{ab}	97.75 ^a
Orange II	8.01 ^b	10.04 ^a	9.81 ^a	9.95 ^a	9.76 ^a
Malachite green	56.16 ^c	65.58 ^b	68.58 ^{ab}	74.36 ^a	75.47 ^a

Dữ liệu được biểu thị trung bình của ba lần lặp lại và được phân tích bằng ANOVA một chiều với $p < 0,05$. Các chữ cái a,b,c, d trong mỗi hàng chỉ ra sự khác biệt đáng kể

F. oxysporum HUIB02 loại bỏ thuốc nhuộm tổng hợp ở mức độ khác nhau. Hiệu ứng khử màu được thể hiện tối đa trên các màu như Bromothymol blue, Methyl orange, Remazol brilliant blue R, Indigo carmine với hiệu suất gần 100%. Bên cạnh đó, *F. oxysporum* HUIB02 cũng đã loại bỏ trên 50% các loại thuốc nhuộm như evans blue và malachite green. Còn đối với một số thuốc nhuộm như: Crystal violet, Reactive black, Orange II thì khả năng xử lý không đạt hiệu quả cao.

3.4.2. Khả năng phân hủy thuốc nhuộm công nghiệp của laccase tái tổ hợp

Bảng 3.3. Tỷ lệ khử màu thuốc nhuộm tổng hợp của laccase tái tổ hợp

Thuốc nhuộm tổng hợp	Hiệu suất phân hủy thuốc nhuộm (%)			
	Thời gian phân hủy (giờ)			
	4	8	12	24
Bromothymol blue	39.2 ^b	41.5 ^b	43.3 ^b	50.0 ^a
Methylene blue	24.7 ^c	26.9 ^{bc}	29.9 ^b	31.2 ^a
Methyl orange	43.5 ^b	45.4 ^b	45.1 ^b	50.9 ^a
Crystal violet	30.4 ^b	36.0 ^b	41.2 ^b	48.2 ^a
Remazol brilliant blue R	65.1 ^c	76.5 ^{bc}	86.0 ^{ab}	88.4 ^a
Aniline blue	27.1 ^c	45.5 ^b	56.0 ^a	57.9 ^a
Evans blue	27.7 ^b	27.9 ^b	30.0 ^b	46.1 ^a
Reactive black	34.2 ^b	52.4 ^a	56.1 ^a	58.5 ^a

Indigo carmine	29.5 ^c	40.0 ^c	77.9 ^b	82.7 ^a
Orange II	13.7 ^d	17.5 ^c	20.4 ^a	27.3 ^a
Malachite green	34.5 ^b	43.5 ^b	54.0 ^a	61.4 ^a

Dữ liệu được biểu thị trung bình của ba lần lặp lại và được phân tích bằng ANOVA một chiều với $p < 0,05$. Các chữ cái a, b, c, d trong mỗi hàng chỉ ra sự khác biệt đáng kể.

Enzyme có khả năng khử màu khoảng 50% thuốc nhuộm sau 24 giờ phản ứng. Đặc biệt *Folac1* có thể khử màu 82,7% và 88,4% trong trường hợp Indigo carmine và Remazol brilliant blue R. Khi so sánh với hoạt tính khử màu trong *Fusarium oxysporum* HUIB02, *Folac1* tái tổ hợp cho thấy sự cải thiện đáng kể 38,87%, 13,93%, 40,44% và 17,54% trong trường hợp màu Crystal violet, Aniline blue, Evans blue và Orange II.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM MỐC CÓ HOẠT TÍNH LACCASE

Chúng tôi chọn được 3 chủng F4, F5 và F8 có khả năng phân hủy lignin, trong đó chủng F4 có khả năng sinh tổng hợp laccase mạnh nhất, đạt 186 U/L sau 12 ngày lên men. So sánh với các kết quả đã được nghiên cứu trong và ngoài nước, chủng *F. oxysporum* HUIB02 có hoạt tính laccase rất cao, có thể tạo ra nhiều tiềm năng ứng dụng trong việc xử lý môi trường, đặc biệt xử lý thuốc nhuộm tổng hợp.

4.1.1. Môi trường

Sản xuất laccase với nguồn carbon là rơm rạ thay vì sử dụng glucose có ý nghĩa lớn về mặt thương mại. Hoạt tính laccase của *T. versicolor* BBEL0970 được tăng cường khi sử dụng rơm làm nguồn cơ chất, đạt tới 1030 U/g, cho thấy tiềm năng cao để sản xuất laccase từ rơm rạ.

4.1.2. Xác định một số đặc tính của laccase tự nhiên

* pH

Hầu hết các laccase nấm hoạt động ở các giá trị pH acid hoặc trung tính nhưng mất hoạt tính trong điều kiện kiềm. Laccase từ *F. oxysporum* HUIB02 cũng hoạt động tối ưu ở pH5, tương tự với các laccase ở các chủng khác của nhiều nghiên cứu trên thế giới.

* Nhiệt độ

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của laccase từ *F. oxysporum* HUIB02 là 45°C, mức nhiệt độ này cũng nằm trong khoảng nhiệt độ tối ưu chung của các laccase có nguồn gốc khác nhau.

* Ion kim loại

Hoạt tính laccase được tăng cường bởi các ion kim loại như Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} và Zn^{2+} ở nồng độ thấp 1mM. Tăng nồng độ của các ion kim loại ngoại trừ Cu^{2+} và Zn^{2+} lên đến 5 mM trở lên làm giảm hoạt động của enzyme.

4.2. PHÂN LẬP CÁC GEN MÃ HÓA LACCASE

Khi so sánh với các kết quả nghiên cứu khác như của Jing Wu và cs cho thấy, các gen mã hóa laccase từ *F. oxysporum* HUIB02 tương đồng cao và có các đặc tính của một laccase điển hình.

4.3. BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA EMZYME *FOLAC1* TRONG *P. PASTORIS*

4.3.1. Biểu hiện gen *Folac1*

Laccase nấm thường được glycosyl hóa, với khối lượng tăng 10% -25%, tuy nhiên một số laccase có mức tăng hơn 30%. Phần carbohydrate của laccase đã được chứng minh để đảm bảo sự ổn định về hình dạng và bảo vệ enzyme khỏi sự phân giải protein và bị bất hoạt bởi các gốc tự do vì thế, gen *Folac1* được biểu hiện trong *P.pastoris* có nguồn gốc phân lập từ *Fusarium oxysporum* HUIB02 cũng nằm trong quy luật này.

4.3.2. Khảo sát đặc tính enzyme tái tổ hợp

Khi biểu hiện gen *lac4* Psc từ *Pleurotus sajor caju* trong *P.pastoris*, với ABTS làm cơ chất, enzyme hiển thị hoạt động tối ưu tại 35°C và pH 3,5; enzyme bị ức chế mạnh bởi sodium azide và acid thioglycolic. Trong nghiên cứu của chúng tôi, *Folac1* tái tổ hợp biểu hiện trong *P. pastoris* có nhiệt độ hoạt động tối ưu là 55°C tại pH 5,5.

4.3.3. Tối ưu hóa sự biểu hiện laccase tái tổ hợp

Trong nghiên cứu laccase từ cDNA của *P. sanguineus* biểu hiện thông qua *P. pastoris*, 0,8% alanine được sử dụng trong môi trường tăng trưởng BMM và pH duy trì khoảng 6,5 trong quá trình nuôi cấy.

4.4. THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG PHÂN HỦY THUỐC NHUỘM CÔNG NGHIỆP CỦA LACCASE TÁI TỔ HỢP

Sự khác biệt về hiệu quả của quá trình khử màu có thể do sự khác biệt về cấu trúc phân tử của thuốc nhuộm. Laccase thể hiện hiệu quả rất cao trong việc khử màu của thuốc nhuộm anthraquinone RBBR, tương tự như laccase tinh khiết từ *P. sanguineus*. Ngược lại, laccase tái tổ hợp đã được tinh chế từ *P. methanolica* cần 16 giờ để phân hủy khoảng 90% RBBR dưới hoạt tính laccase cao hơn 25 U/mL với sự hiện diện của các chất mediator, sự khử màu của indigo carmine bằng laccase có thể được tăng cường đáng kể.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi rút ra các kết luận như sau:

1. Đã phân lập được chủng *F. oxysporum* có khả năng sinh tổng hợp laccase mạnh đạt 186 (U/L) sau 12 ngày lên men.
2. Tạo dòng thành công gen *cFolac1*, *cFolac2*, *cFolac3* và *cFolac4* vào vector pGEM® T-Easy. Các gen đã được giải trình tự nucleotide thành công và đăng ký trên ngân hàng gen Genbank với mã số: *cFolac1* (MT362052); *cFolac2* (KY825237); *cFolac3* (KY825238) và *cFolac4* (KY825239).
3. Kiểm tra sự có mặt gen *Folac1* trong hệ gen của chủng *P. Pastoris*.
4. Chủng *P. pastoris* tái tổ hợp sinh tổng hợp laccase cao nhất khi được nuôi cấy ở 25°C, tốc độ lắc 210 rpm, mật độ tế bào ban đầu OD₆₀₀ = 1. Hoạt độ riêng enzyme là 66538 U/mg sau 4 ngày nuôi cấy và nồng độ protein là 0,9 µg/µl. Laccase tái tổ hợp có khối lượng phân tử khoảng 76 kDa, có khoảng nhiệt độ tối ưu là 55°C, pH tối ưu là 4,5, Ion Cu²⁺ tăng hoạt tính enzyme trong khi ion Fe²⁺ ức chế sự hoạt động của laccase.
5. Laccase tái tổ hợp có khả năng khử màu khoảng 50% thuốc nhuộm sau 24 giờ phản ứng. Đặc biệt

Folac1 có thể khử màu 82,7% và 88,4% trong trường hợp Indigo carmine và Remazol brilliant blue R. Khi so sánh với hoạt tính khử màu trong *F. oxysporum* HUIB02, *rFoLac1* cho thấy sự cải thiện đáng kể 38,87%, 13,93%, 40,44% và 17,54% trong trường hợp màu Crystal violet, Aniline blue, Evans blue và Orange II.

KIẾN NGHỊ

1. Biểu hiện và tối ưu biểu hiện gen *cFolac2*, *cFolac3* và *cFolac4* trong hệ thống biểu hiện tái tổ hợp trong *P. pastoris*.
2. Thử nghiệm laccase tái tổ hợp trong điều kiện phòng thí nghiệm và thực tế để xử lý nhiều hợp chất gây ô nhiễm như kim loại nặng, các chất kháng sinh (trong nước thải y tế), các thuốc nhuộm tổng hợp.

1. **Đặng Thị Thanh Hà**, Lê Kim Tuấn, Đinh Thị Kim Thiện, Phạm Thị Ngọc Lan, Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Nguyễn Đức Huy, (2018), *Sản xuất và tạo dòng gen Folac3 mã hóa laccase từ nấm Fusarium oxysporum*, Tạp chí Khoa học, Đại học Huế. Tập 127, số 1C, 2018; ISSN 1859-1388.

2. **Đặng Thị Thanh Hà**, Dương Thị Hải Ninh, Thị Lê Kim Tuấn, Đỗ Trần Hương Duyên, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Đức Huy (2020), *Phân lập gen mã hóa laccase4 từ nấm Fusarium oxysporum*, Tạp chí Khoa học, Trường ĐH Tây Nguyên. Số 40, tháng 2– 2020, ISSN:1859-4611.

3. Nguyen Duc Huy, **Dang Thi Thanh Ha**, Kuan Shiong Khoo, Pham Thi Ngoc Lan, Hoang Tan Quang, Nguyen Hoang Loc, Seung-Moon Park, Ashokkumar Veeramuthu, Pau Loke Show (2020), “*Synthetic dyes removal by Fusarium oxysporum HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation*”, Environment Technology & Innovation 19 (2020) 101027.

4. **Đặng Thị Thanh Hà**, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Nguyễn Thị Mỹ Lê, Nguyễn Bảo Hưng, Lê Kim Tuấn, Lê Thị Kim Thoa, Trần Thị Hương Giang, Phạm Thị Ngọc Lan, Trần Thúy Lan, Lê Thị Kim Thoa, Trịnh Thị Phương Thảo, Vũ Đức Hoàng, Nguyễn Đức Huy, (2020), *Nhân dòng và phân tích trình tự gen mã hóa laccase 2 từ Fusarium oxysporum HUIB02 tạo nguồn nguyên liệu di truyền biểu hiện tái tổ hợp*, Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc 2020, NXB Đại học Huế.

Ministry of Education and Training

Hue University

University of sciences

DANG THI THANH HA

**STUDY ON THE PRODUCTION OF RECOMBINANT LACCASE
AND APPLICATION FOR INDUSTRIAL DYES DECOLOURATION**

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Major: Biotechnology

Code: 9420201

Academic supervisors: Assoc. Prof. Dr Pham Thi Ngoc Lan

Dr. Nguyen Duc Huy

Hue, 2022

The work was completed at: Faculty of Biology, Hue University of Sciences,
Hue University

Academic supervisors: Assoc. Prof. Dr Pham Thi Ngoc Lan
Dr. Nguyen Duc Huy

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The thesis will be defended in front of the thesis committee of Hue University at
Hue University at ... hour .., date ... month ... 2022

The thesis can be found at:

- Library of University of Sciences, Hue University
- National Library of Vietnam

INTRODUCTION

1. The necessity of the study

Biotechnology has been changing the world. That is why many organizations and experts around the world have affirmed that the 21st century is the century of biotechnology and it has really become an indispensable tool, making practical and effective contributions in many fields such as industry, agriculture, medicine - pharmacy, materials, etc... with the creation of new varieties of plants and animals with high yield, quality and high economic efficiency, enzymes have created bio-products for disease treatment, and microbial products for environmental remediation.

With the increasing rate of environmental pollution due to the uncontrolled discharge of wastes into the environment today, it is increasingly difficult to use conventional chemical and biological methods to achieve the necessary levels to remove pollutants. Therefore, it is imperative to develop effective treatment methods that do not cause secondary pollution. Recent studies have demonstrated that enzymes have many possibilities and prospects for solving the problem of environmental pollution. Enzymes act on particularly difficult pollutants to remove them by precipitation, conversion, and decomposition of pollutants into other forms.

In addition, enzymes change the properties of wastes to make them easier to handle or turn into more valuable products. The enzyme treatment method has the following advantages: applied to difficult biological substances, effective even in areas of high concentration of environmental pollutants, a number of specific enzymes have a wide range of effects, pH, temperature, ... without causing abnormal changes, without breaking the ecological balance. As is known, toxic substances in the environment are usually aromatic organic substances such as phenol compounds, cyclic amines or phosphorus compounds. To achieve the purpose of environmental treatment, it is necessary to destroy or remove those toxins. Among enzymes, the redox enzyme class 1 (oxidoreductase) and the enzyme catalyze hydrolysis reaction class 3 (hydrolase) have a very high ability to degrade the compounds mentioned above.

Laccase is a particularly common and versatile enzyme that is widely and diversely produced in nature from plants, fungi, bacteria, and insects. Laccase (EC 1.10.3.2, p-diphenol oxidase) belongs to the group of oxidase enzymes, namely phenol oxidase, which catalyzes the oxidation of many organic compounds including diphenols, polyphenols, diamines, aromatic amines, benzenethiol and a number of inorganic compounds such as iodine... Laccase has strong oxidizing properties, has a diverse substrate spectrum and uses molecular oxygen as an electron acceptor, so this enzyme is widely used in industry, in the treatment of industrial and agricultural by-products and

polluted wastewater. Besides, laccase is also an environmentally friendly enzyme because in the laccase reaction, it only needs to take oxygen from the air and the only byproduct formed after the reaction is water.

With such important applications and advantages, we chose to research the topic: "***Study on the production of recombinant laccase and application for industrial dyes decolouration***" for the purpose of creating recombined laccase to degrade persistent organic compounds that pollute the environment.

2. Objectives of study

Theoretical objectives

- To isolate fungi with strong extracellular laccase production.
- To study laccase expression from *Fusarium oxysporum* in *Pichia pastoris* for improvement of enzyme production.
- To successfully decolorize synthetic dyes by recombinant laccase.

Practical objectives: Produce recombinant laccase for degradation of persistent organic compounds that pollute the environment.

3. Research scopes and contents

Research contents

- Isolation of fungi for laccase production;
- Cloning expression laccase gene in *P. pastoris*;
- Production of recombinant laccase in *P. pastoris*;
- Purification and characterization of the recombinant laccase;
- Investigation of the possibility of using recombinant laccase to degrade synthetic dyes.

Research scope

Isolation of laccase production fungi, laccase gene cloning and expression, purification and characterization of recombinant laccase, synthetic dyes removal by recombinant laccases were carried out at the Laboratory of the Faculty of Biology, University of Sciences and Institute of Biotechnology, Hue University.

4. Novelty of dissertation

- Isolated a strain named *F. oxysporum* HUIB02 with strong extracellular laccase production. This was the first study in Vietnam on laccase production from *F. oxysporum*.
- Cloned and sequenced 04 genes encoding laccase from DNA and cDNA of *F. oxysporum* HUIB02. The genes with high similarity to the laccase gene of other

F. oxysporum strains isolated from other regions indicating high conservation among in the laccase gene group in general and in *F. oxysporum* in particular.

- Expressed gene encoding laccase from *F. oxysporum* HUIB02 in *P. pastoris*. The recombinant enzyme characterization provided detailed data on the laccase properties from *F. oxysporum*.

- Natural laccase and recombinant laccase have the capacity to remove color from many synthetic dyes with an efficiency of more than 90%. These results demonstrate that laccase can degrade persistent organic compounds that pollute the environment.

5. Dissertation structure

The thesis is presented in 110 A4 pages (excluding references), in which Introduction is 3 pages, Literature review is 29 pages, Objects and Methods are 15 pages, Research results are 47 pages, Discussions is 14 pages, Conclusions and Recommendations are 1 page, List of publications is 1 page, References are 15 pages with 138 references in English and Vietnamese. The thesis has 7 tables and 49 figures.

Chapter 1. LITERATURE REVIEW

The thesis has consulted and summarized 3 main issues with the following contents: (1) General introduction of laccase; (2) *Pichia pastoris* expression system; (3) Industrial dyes and treatments

Chapter 2. MATERIALS AND METHODOLOGY

2.1. MATERIALS

Fungi those were isolated from wood decay in Thua Thien Hue and Dak Lak provinces.

2.2. METHODOLOGY

2.2.1. Isolation of fungi strains with laccase activity

2.2.2. Determination of laccase enzyme activity.

2.2.3. Determination of extracellular protein by Bradford method

2.2.4. Determination of some properties of laccase such as influence of pH, temperature and metal ions.

2.2.5. Molecular identification of the fungal strain with the strongest laccase activity

2.2.5.1. Total DNA extraction

2.2.5.2. ITS 1-4 sequence amplification

- 2.2.5.3. Sequencing and building a phylogenetic tree
- 2.2.6. Isolation of genes encoding laccase
 - 2.2.6.1. cDNA biosynthesis and gene amplification from cDNA
 - 2.2.6.2. Amplification of *Folac1*, *Folac2*, *Folac3*, *Folac4* genes by PCR reaction with specific primers
 - 2.2.6.3. Attachment of the PCR product to the cloning vector
 - 2.2.6.4. Transformation into *E. coli* TOP10 and selection of the transformed variant
 - 2.2.6.5. Sequencing the laccase gene
- 2.2.7. Expression of gene encoding the enzyme *Folac1* in *P. pastoris*
 - 2.2.7.1. Cloning in the expression vector pPICZ α A
 - 2.2.7.2. Transformation into *P. pastoris*
 - 2.2.7.3. Laccase gene expression
- 2.2.8. Determination of recombinant enzyme activity
- 2.2.9. Investigation of factors affecting recombinant laccase expression
- 2.2.10. Purification of recombinant protein
- 2.2.11. SDS – PAGE analysis
- 2.2.12. Investigation of some factors affecting recombinant laccase activity
- 2.2.13. Testing of the ability to degrade industrial dyes of natural and recombinant laccases
- 2.2.14. Statistical processing

CHAPTER 3. RESULTS

3.1. Isolation of laccase production fungi

3.1.1. Isolation and screening of lignin degrading fungi

Wood decay samples were collected from different locations, diluted and used 10^{-4} for spreading on PDA agar. After 3 to 5 days of culture at 30°C, we observe and select strains of white filamentous fungi with strong growth colonies, conduct a qualitative test for laccase production on BSM medium supplemented with guaiacol (0.01%) as a color indicator substrate for laccase reactions. Through testing and comparing the color resolution area on the agar plate, we selected 3 strains of fungi F4; F5 and F8, which have a darker color region and are superior in their ability to degrade guaiacol, for further research (Figure 3.1).



Figure 3.1. Screening for peroxidase production strains on selective medium supplemented with guaiacol

3.1.2. Morphological characteristics of F4; F5 and F8 strains

Fungal strains F4, F5 and F8 were grown on PDA medium after 3 to 5 days due to measured colony diameter, observed colony color with naked eyes and observed colony morphology under optical microscope. (Figure 3.2).

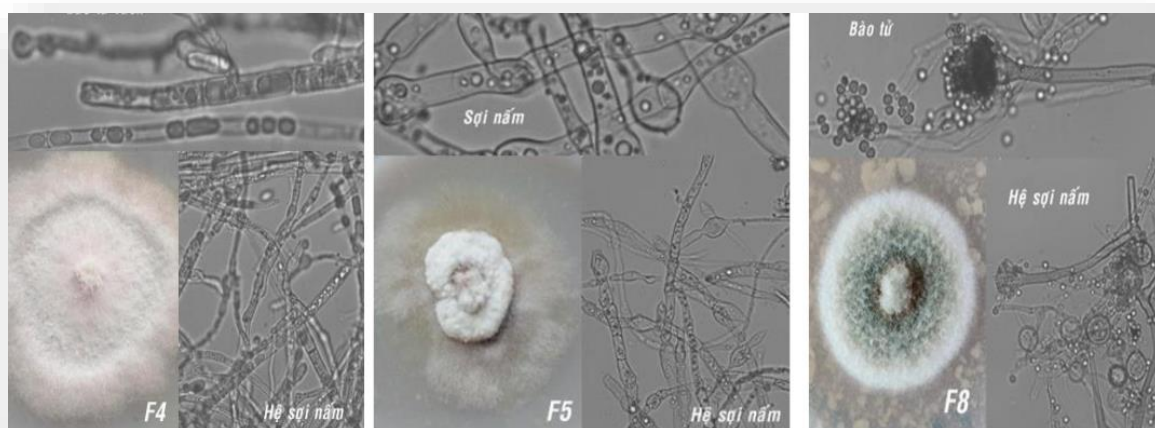


Figure 3.2. Mycelial colonies of strains F4, F5, F8 strains

3.1.3. Evaluation of laccase production of fungi F4; F5 and F8 strains

3.1.3.1. Effect of culture conditions on laccase production

To investigate the ability to accumulate laccase enzyme, we chose 2 culture conditions: semi-solid fermentation (10% substrate) and liquid fermentation (5% substrate). On each condition, we selected 2 types of BSM medium supplemented with substrates: straw and wood pulp.

The results of investigation on laccase accumulation ability of strains F4, F5 and F8 on 4 fermentation conditions are MF1, MF2, MF3 and MF4 over 18 days of culture, shown in Figures 3.3, 3.4, and 3.5, respectively.

Table 3.1. The ability to accumulate laccase of strain F4 in 4 fermentation media

Fermentatio n media	Time (day)					
	3	6	9	12	15	18
MF1	0,97±0,12	2,07±0,19	3,09±0,07	3,30±0,19	2,52±0,07	2,55±0,14
MF2	1,97±0,05	2,08±0,09	2,43±0,12	2,89±0,07	3,47±0,07	3,22±0,21
MF3	1,60±0,36	2,52±0,07	1,67±0,05	1,18±0,21	0,90±0,10	0,76±0,07
MF4	30,97±5,52	95,69±4,75	148,61±4,18	186,25±6,50	179,86±3,48	170±5,86

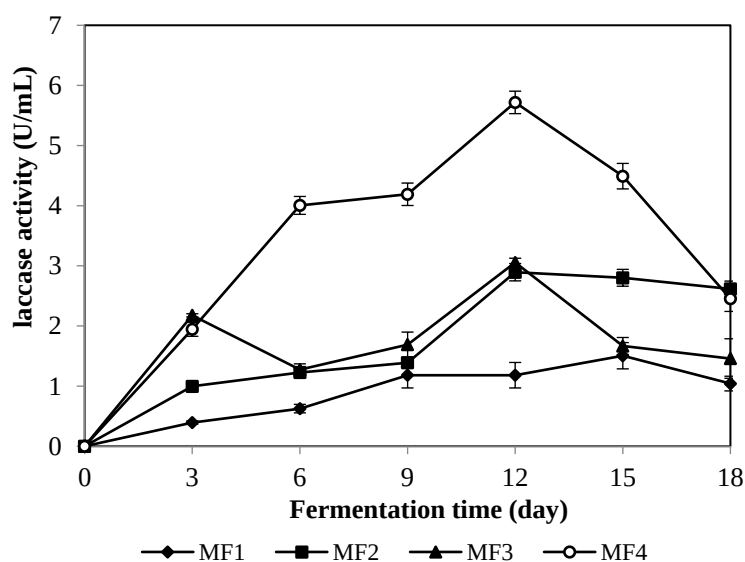


Figure 3.3. The ability to accumulate laccase of strain F5 in 4 fermentation media

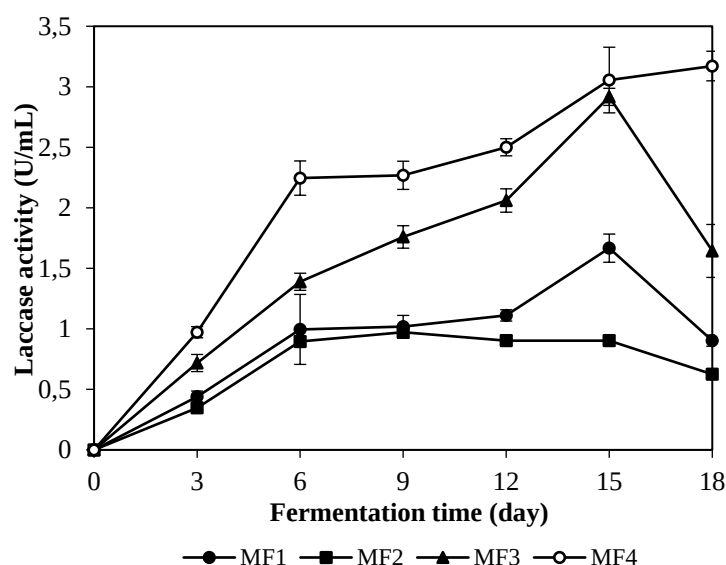


Figure 3.4. The ability to accumulate laccase of strain F8 in 4 fermentation media

Thus, straw is a potential substrate for the production of laccase - an inexpensive and efficient source of raw materials

3.1.4.2. Effect of temperature on laccase production

Strain F4; F5 and F8 have higher ability to produce extracellular laccase enzyme under liquid fermentation conditions than semi-solid fermentation. Therefore, we continued to investigate the ability to accumulate laccase over 3 fermentation temperature ranges of 25°C; 30°C and 35°C under liquid fermentation conditions

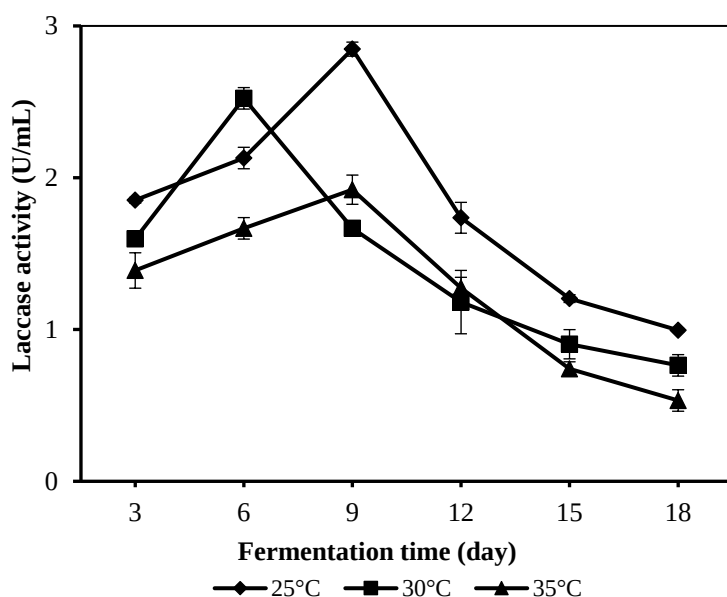


Figure 3.5. The ability to accumulate laccase of strain F4 using MF3 culture medium at different temperatures.

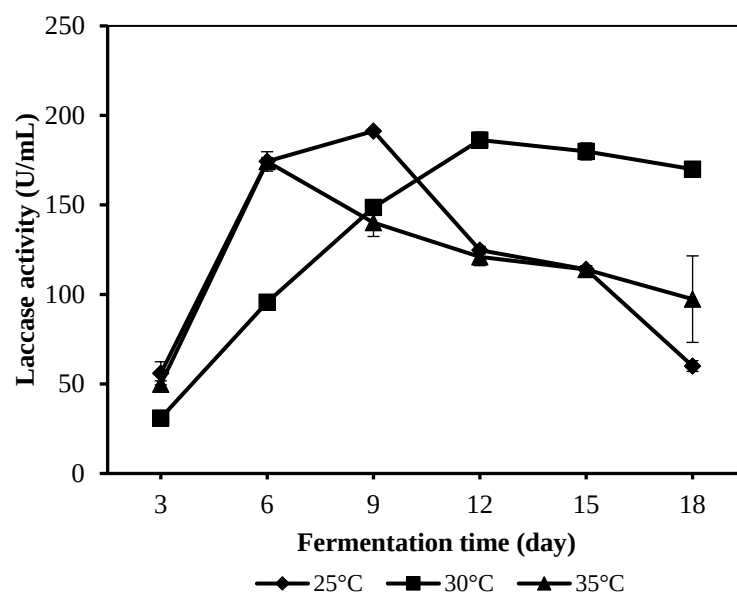


Figure 3.6. The ability to accumulate laccase of strain F4 using MF4 culture medium at different temperatures

Strain F5 was grown at different temperatures on two types of media, MF3 and MF4, and the results were evaluated in 18 days of fermentation.

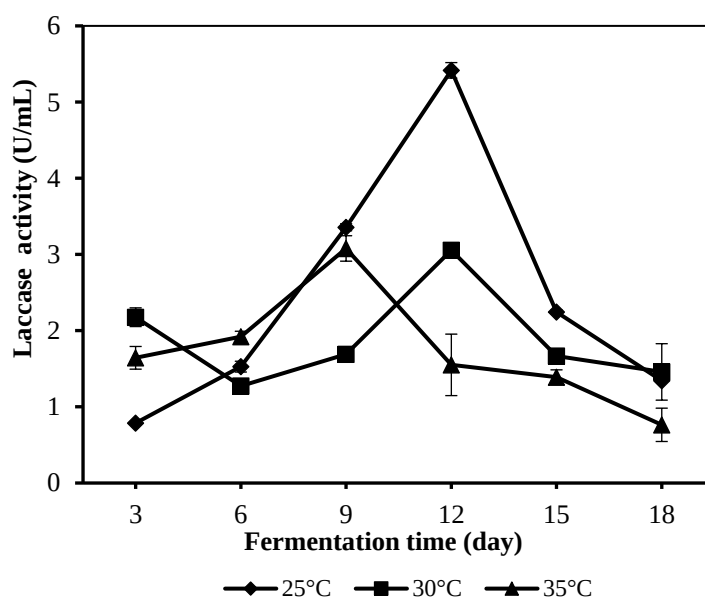


Figure 3.7. The ability to accumulate laccase of strain F5 using MF3 culture medium at different temperatures.

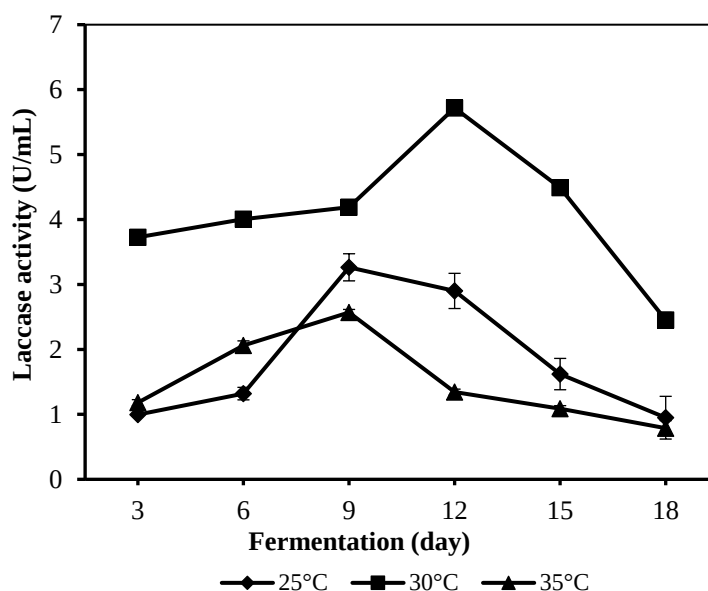


Figure 3.8. The ability to accumulate laccase of strain F5 at 3 different fermentation temperatures in MF4 . fermentation medium

The strain F8 was grown at different temperatures on two types of media, MF3 and MF4, and the results were evaluated in 18 days of fermentation

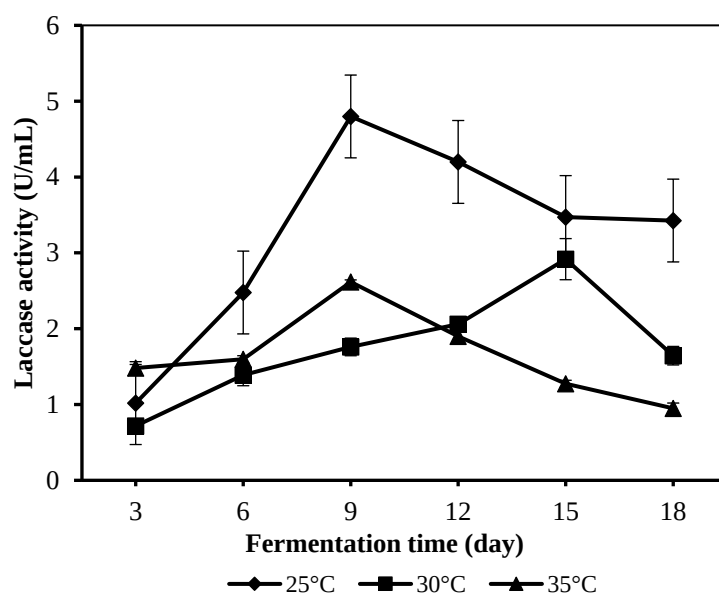


Figure 3.9. The ability to accumulate laccase of strain F5 using MF4 culture medium at different temperatures

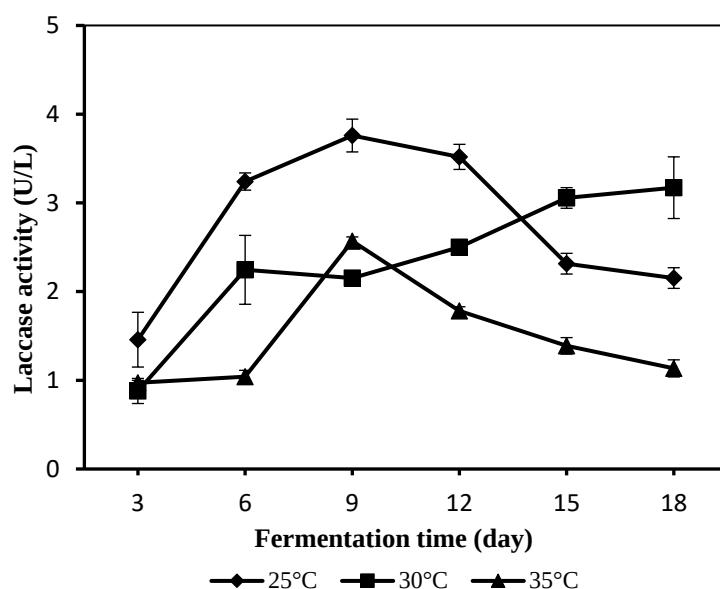


Figure 3.10. The ability to accumulate laccase of strain F8 at 3 different fermentation temperatures in MF4 fermentation medium

3.1.4.3. Total protein content and enzyme purity

Table 3.2. Protein content and laccase activity of F4, F5, F8 strains

Strain	Total Protein ($\mu\text{g/mL}$)	Activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)
F4	45,70 $\pm$ 0.68	186,25 $\pm$ 6,50	4,0 $\pm$ 0,13
F5	59,00 $\pm$ 2.0	5,72 $\pm$ 0,07	0,1 $\pm$ 0,003
F8	25,70 $\pm$ 0.62	4,8 $\pm$ 0,25	0,19 $\pm$ 0,05

Specific activity is the number of enzyme units/1mg protein (U/mg). Based on Table 3.2, the laccase from strain F4 has a much higher purity than strain F5 and F8.

3.1.4. Characterization of natural laccase

3.1.5.1. Effect of pH

The laccase enzyme produced by F4 has the strongest catalytic activity in the pH range from 4 to 6, when increasing the pH from 3 to 5, the enzyme activity also increases from 72.1% (145 U/L) to 100%, this laccase works optimally around pH5, where laccase activity is measured up to 201.1 U/L. The activity decreased slightly when increasing to pH 6 to 89.5% (180 U/L), then decreased sharply when increasing pH to 8 to only 33.1% (66.7 U/L).

3.1.5.2. Effect of temperature

When the temperature gradually increased from 20°C to 45°C, the laccase activity produced by strain F4 also increased gradually from 66.4% (139.4 U/L) to 100% (208.8 U/L), the most suitable temperature for laccase to work is about 45°C (208.5 U/L) and decreases when the temperature is increased to 50°C to 74.7% (155.7 U/L).

3.1.5.3. Effect of metal ions

Enzyme was completely inactivated when adding 5mM Fe^{2+} ions to the reaction mixture and the activity decreased by 96.7% compared to the control, Cu^{2+} ; Mg^{2+} and Co^{2+} slightly increased laccase activity by 5%; 15%; 4% respectively compared with the control, but also not significant.

3.1.5. Identification of microorganisms

ITS sequence of F4 was determined to include 514 nitrogen base pairs, compared with 18S rRNA gene sequences of fungal strains published in Genbank, EMBL data banks, showing that strain F4 has a high level of similarity with fungal strains of the genus *Fusarium*, species *F. oxysporum*

3.2. CLONING LACCASE GENES FROM *FUSARIUM OXYSPORUM*

The results of PCR amplification of *Folac1*, *Folac2*, *Folac3* and *Folac4* genes with specific primers *Folac1F/Folac1R*; *Folac2F/Folac2R*; *Folac3F/Folac3R*; *Folac4F/Folac4R* is shown in Figure 3.12

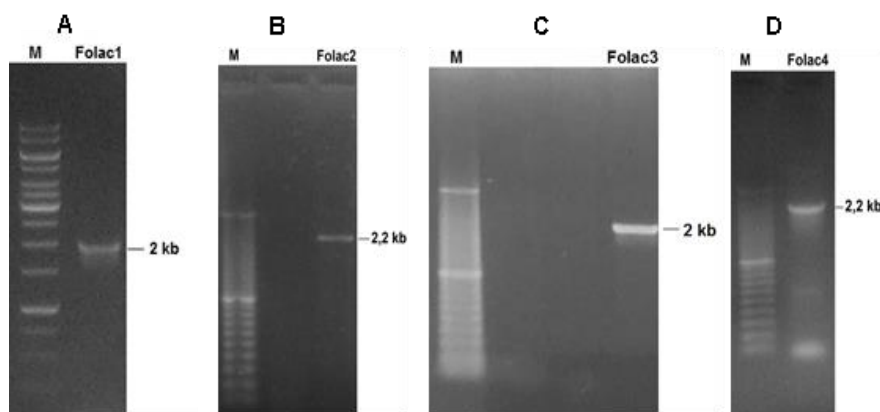


Figure 3.11. The PCR product amplifies the laccase-coding genes.

M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA),

A. *Folac1* gene PCR product, M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific),

B. *Folac2* gene PCR product, M: 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad),

C. *Folac3* gene PCR product, M: 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad),

D. *Folac4* gene PCR product, M: 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad).

PCR product on 1% agarose gel appeared clear band, no by-products, about 2 kb in size for *Folac1* and *Folac3*, 2.2 kb gene size for *Folac2* and *Folac4*,

equivalent to the size of the laccase gene of *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4278 was published in NCBI

3.2.2. Clone genes encoding the enzyme laccase in the pGEM®T-Easy vector

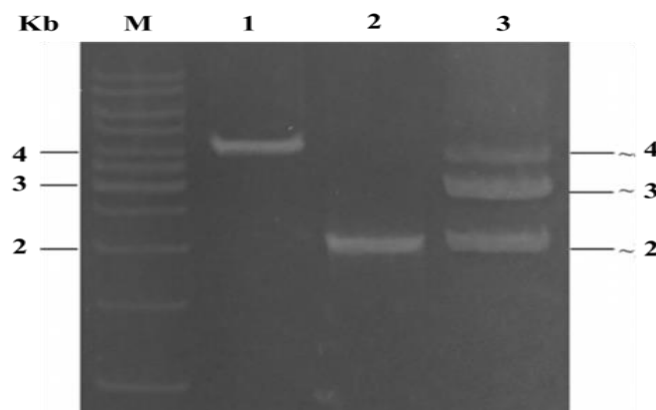


Figure 3.12. Restriction product by EcoRI recombinant plasmid pGEM®T-Easy-Folac1.

M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

1: Recombinant plasmid pGEM®T-*Folac1* isolated from *E. coli* TOP10;

2: The *Folac1* gene PCR product on the template DNA is the recombinant plasmid pGEM®T-*Folac1*;

3: Recombinant plasmid cleavage product pGEM®T-*Folac1* by EcoRI enzyme.

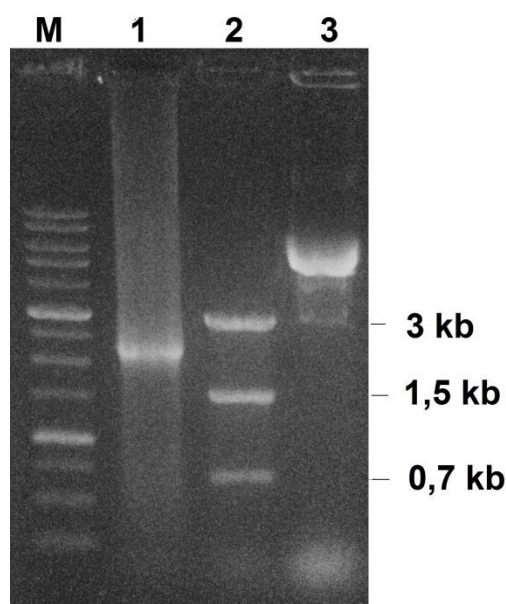


Figure 3.13. Restriction product by EcoRI recombinant plasmid pGEM®T-Easy-Folac2.

M: PreciGene 1 kb DNA Ladder (BioPioneer),

1: The *Folac2* gene PCR product on template DNA is the recombinant plasmid pGEM®T-*Folac2*;

- 2: Recombinant plasmid cleavage product pGEM®T-Folac2 by EcoRI enzyme;
 3: Recombinant plasmid pGEM®T-Folac2 isolated from *E. coli* TOP10.

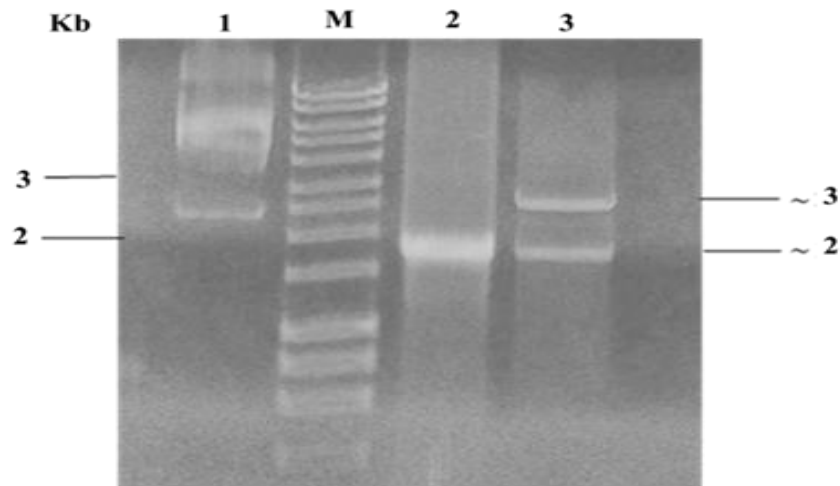


Figure 3.14. Restriction product by EcoRI recombinant plasmid pGEM®T-Easy-Folac3.

M: PreciGene 1 kb DNA Ladder;

- 1: The *Folac3* gene PCR product on the template DNA is the recombinant plasmid pGEM®T-Folac3;
 2: Recombinant plasmid cleavage product pGEM®T-Folac3 by EcoRI enzyme;
 3: Recombinant plasmid pGEM®T-Folac3 isolated from *E. coli* TOP10EcoRI

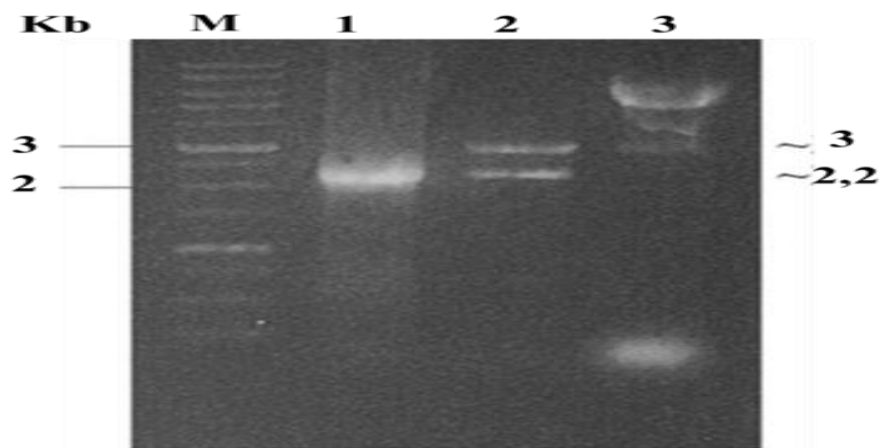


Figure 3.15. Restriction product by EcoRI plasmid recombinant pGEM®T-Easy- Folac4

M: PreciGene 1 kb DNA Ladder (BioPioneer)

- 1: PCR product of *Folac4* gene using recombinant vector pGEM®T-Folac4 as template DNA;
 2: Recombinant vector cutting reaction product pGEM®T-Folac4 by EcoRI enzyme;

3: Recombinant plasmid pGEM®T- Folac4 isolated from E. coli TOP10

3.2.3. Sequencing the laccase gene

Plasmid carrying recombinant vector of each gene *Folac1*, *Folac2*, *Folac3* and *Folac4* was sent for nucleotide sequencing by FIRST BASE company (Malaysia).

3.2.3.1. Folac1 gene sequence

The Folac1 gene was cloned from cDNA with size 2064 nucleotides in the obtained nucleotide sequence without introns.

3.2.3.2. Folac2 gene sequence

The Folac2 gene has a length of 2229 nucleotides and contains 5 non-coding regions with the lengths of regions of 52 nucleotides, 48 nucleotides, 52 nucleotides, 55 nucleotides, 47 nucleotides, which have been registered on Genbank with code KY825237.

3.2.3.3. Folac3 gene sequence

The Folac3 gene has a length of 1957 nucleotides equal to the size of the Folac3 gene template of strain *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287. The complete sequence of the *Folac3* gene is registered on the Genbank gene bank with code KY825238.

3.2.3.4. Folac4 gene sequence

The Folac4 gene has a length of 2238 nu and contains 5 non-coding regions with the lengths of the regions being 53 nucleotides, 50 nucleotides, 59 nucleotides, 52 nucleotides, 47 nucleotides, respectively. Nucleotide sequences were registered on the GenBank gene bank with code KY825239.

3.3. LACCASE GENE EXPRESSION IN *P. PASTORIS*

3.3.1. Cloning cFolac1 into pGEM®T-Easy and transformation into *E. coli* Top10

We choose cFolac1 to further study the production of recombinant laccase through the host *P. pastoris*

3.3.2. Clone into the expression vector pPICZαA

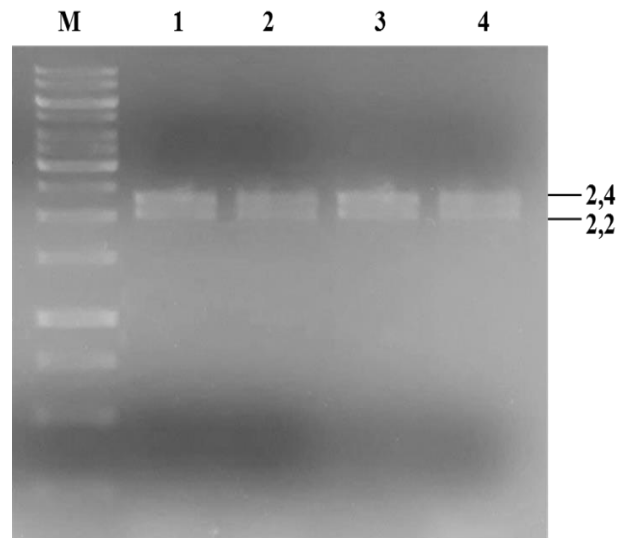


Figure 3.16. PCR product cFolac1 using primer pair AOX1.

M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder,

1-4: cFolac1 PCR product from total DNA of recombinant *P. pastoris*

3.3.3. Folac1 gene expression in *P. pastoris*

Determination of recombinant laccase activity

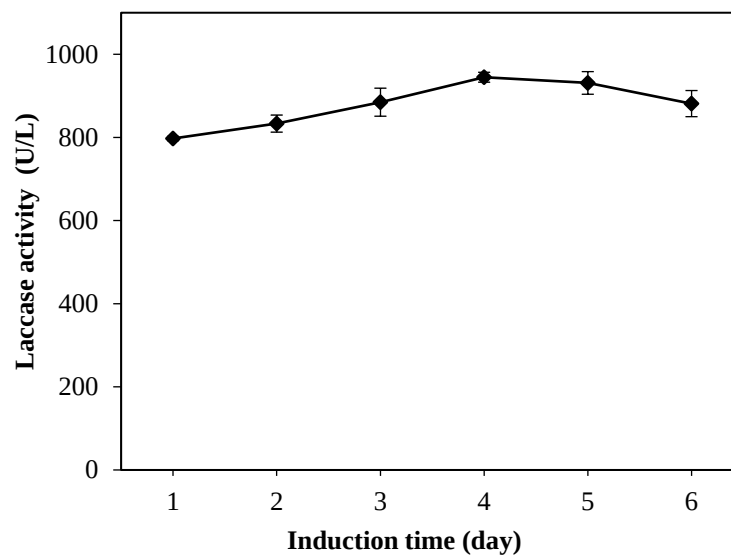


Figure 3.17. Recombinant Folac1 activity over induction time.

3.3.4. Optimization of recombinant laccase expression

3.3.4.1. Effect of induction time

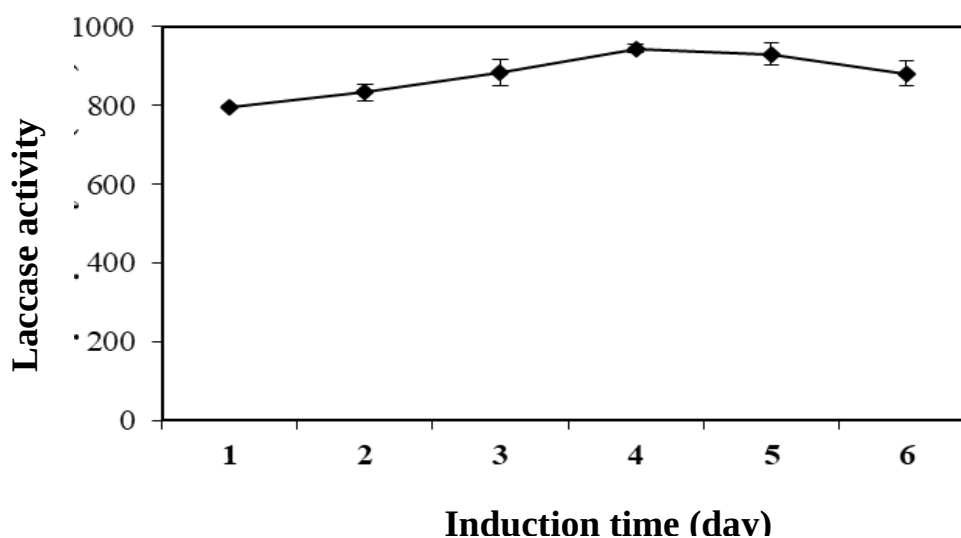


Figure 3.18. Recombinant Folac1 activity over induction time.

The activity of rFolac1 gradually increased and reached a maximum of 944.8 U/L on day 4. Laccase started to accumulate in 1% methanol-induced medium on day 1 of culture. Laccase activity started to decrease on day 5; however, on the last day of culture, enzyme activity was still higher than on day 1 of culture

3.3.4.2. Effect of inducer concentration, cell density, temperature and shaking speed

* Effect of cell density

rFolac1 was grown in YPM-inducible medium by the addition of methanol at time points of OD₆₀₀ of 0.5; 1; 1.5; 2 and maintained at a concentration of 1% methanol for 6 days for laccase production. From the results, the OD = 0.5, OD = 1, OD = 1.5 and OD = 2 values of laccase activity all had a marked increase or decrease between time periods

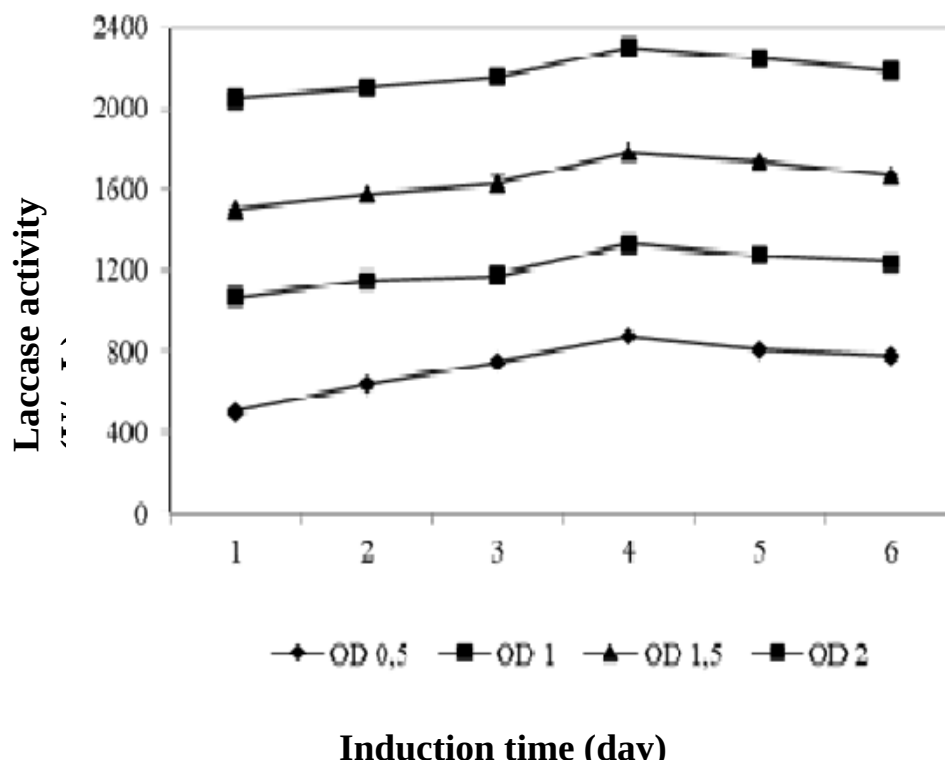


Figure 3.19. Recombinant Folac1 activity according to cell density

Effect of inducer concentration (methanol)

At 2% methanol concentration, the highest laccase enzyme activity on day four was 2093.6 U/mL. Methanol at 1% and 1.5% concentrations, the laccase activity was unstable after the fourth day. Enzyme activity from day 4 to day 5 decreased and then increased again from day 5 to day 6

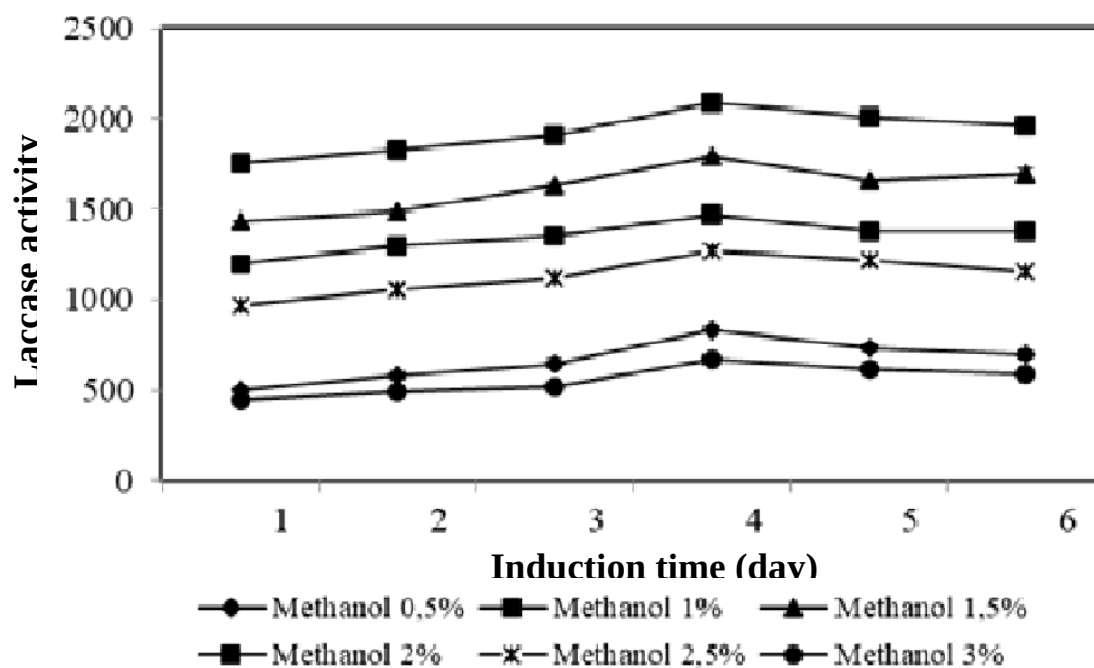


Figure 3.20. Recombinant Folac1 activity according to methanol cam inducer concentration

Effect of incubation temperature

Laccase enzyme activity increased slowly from day 1 (1032 U/mL) to day 6 (1102.5 U/mL), only on day 5, laccase enzyme activity decreased slightly (1069.9 U/mL). For 30°C, enzyme activity was highest at day 3 (1028.8 U/mL). Enzyme activity gradually increased from day 1 (975.6 U/mL) to day 3 (1028.8 U/mL) and after day 3, enzyme activity decreased. Enzyme activity on day 6 was lower than on day 1

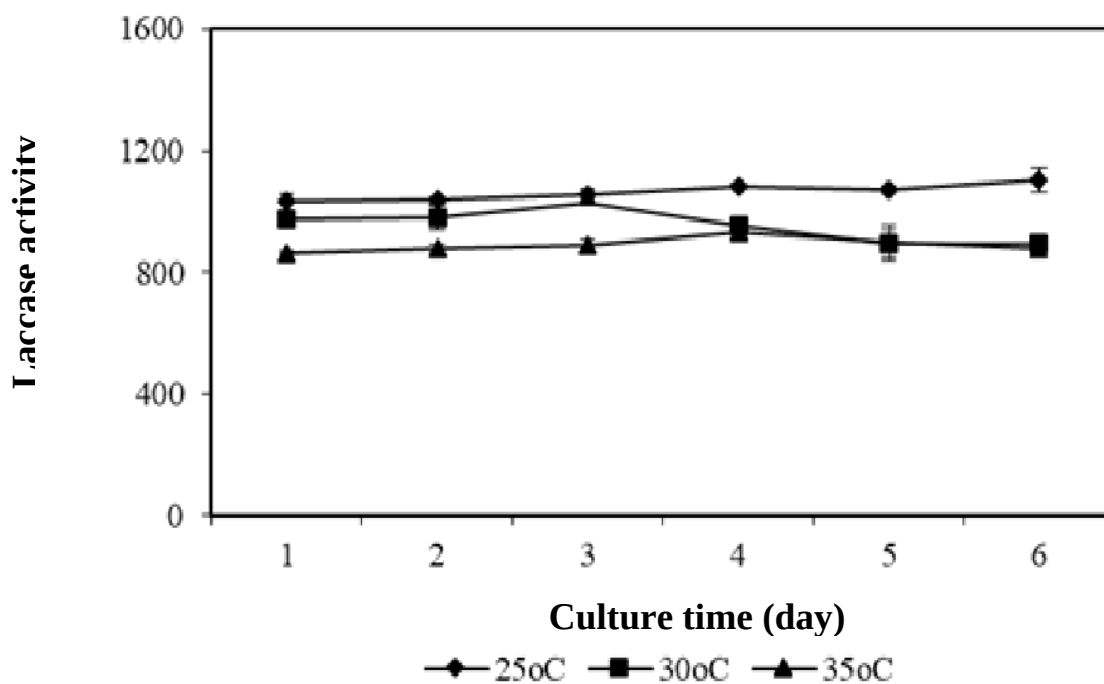


Figure 3.21. Recombinant Folac1 activity according to culture temperature
Effect of shaking speed

With shaking speeds of 150 rpm, 180 rpm and 240 rpm, laccase activity did not change much between induction days. However, at shaking speed of 210 rpm, it was shown that laccase activity increased gradually from day 1 (860.7 U/mL) to day 3 (1106.5 U/ml), on day 4 it increased sharply and after day 4, the enzyme activity gradually decreased. Laccase activity at day 6 was higher than that of day 1.

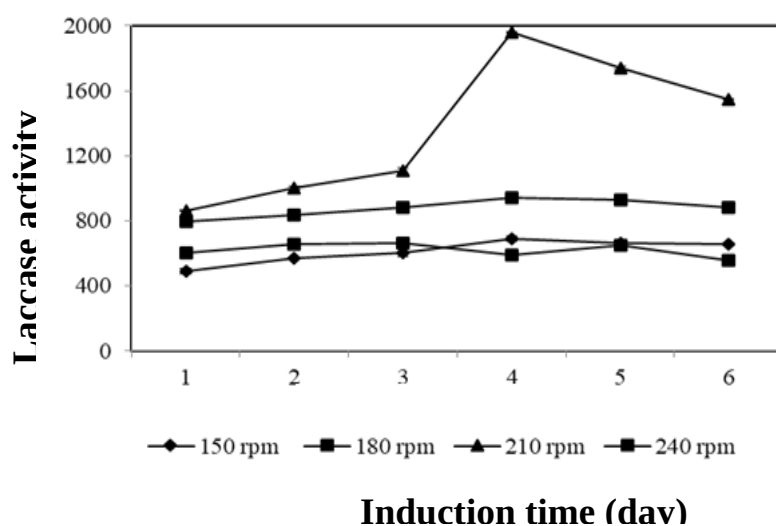


Figure 3.22. Recombinant Folac1 activity according to shaking speed

3.3.5. Enzyme purification

The molecular weight of purified Folac1 is about 76 kDa including an enzyme molecular mass of about 74 kDa and a signal peptide of about 2.7 kDa when supplemented with 1% methanol.

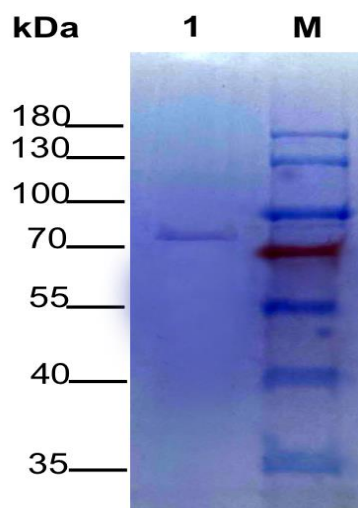


Figure 3.23. Electrophoresis of the recombinant protein product of rFolac1

M: PageRuler™ Prestained Protein (Thermo Scientific),

1: *P. pastoris* strain carrying the methanol-inducible Folac1 gene

3.3.6. Characterization of recombinant enzymes

3.3.6.1. Effect of pH on enzymes

Laccase is stable at pH 4 to 7, remaining laccase activity 59% - 43%. Enzymes are unstable in alkaline buffers with pH > 7.5. At pH 7.5 the remaining activity is only ½ of the original activity and at pH 8 the remaining activity is only < 50% of the original activity.

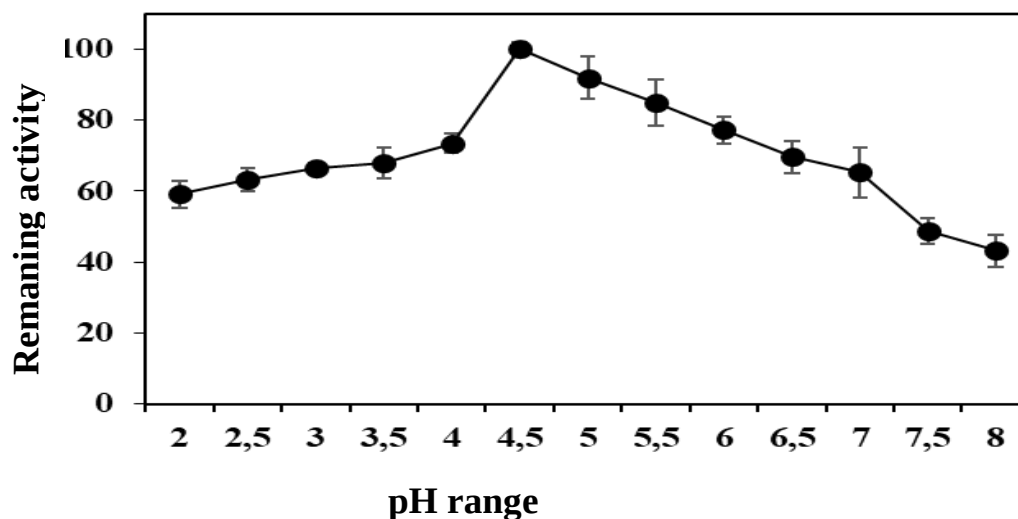


Figure 3.24. Effect of pH on the stability of recombinant laccase

3.3.7.2. Effect of temperature on enzymes

After 1 hour incubation from 20°C to 40°C laccase activity increased gradually from 54% to 65.65%. Enzyme activity increased sharply from 40°C to 60°C

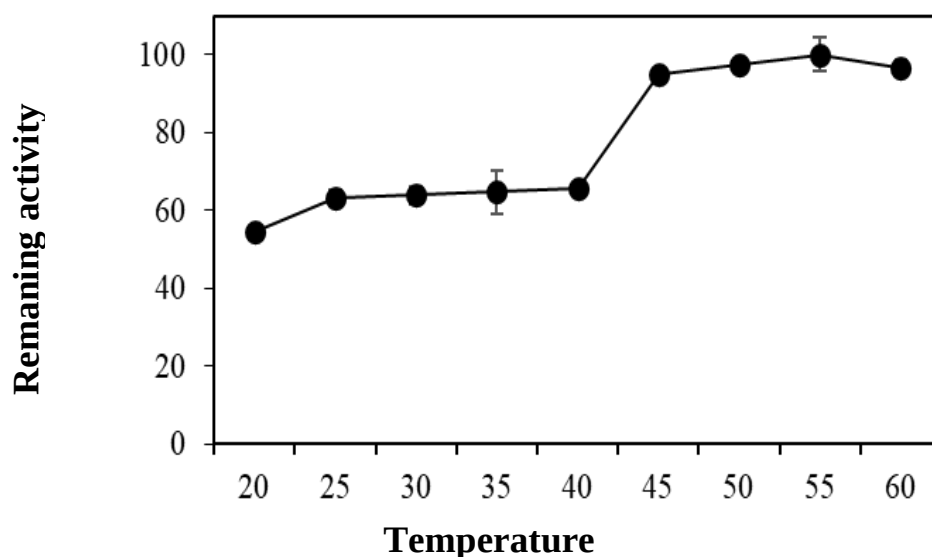


Figure 3.25. Effect of temperature on the stability of recombinant laccase

3.3.7.3. Effect of metal ions on enzymes

Enzyme activity was increased in the presence of Cu^{2+} at a concentration of 1 mM, Ca^{2+} at a concentration of 2 mM, Zn^{2+} at a concentration of 1 mM and Co^{2+} at a concentration of 1 mM. In which, Cu^{2+} ions strongly increase enzyme activity up to 132%.

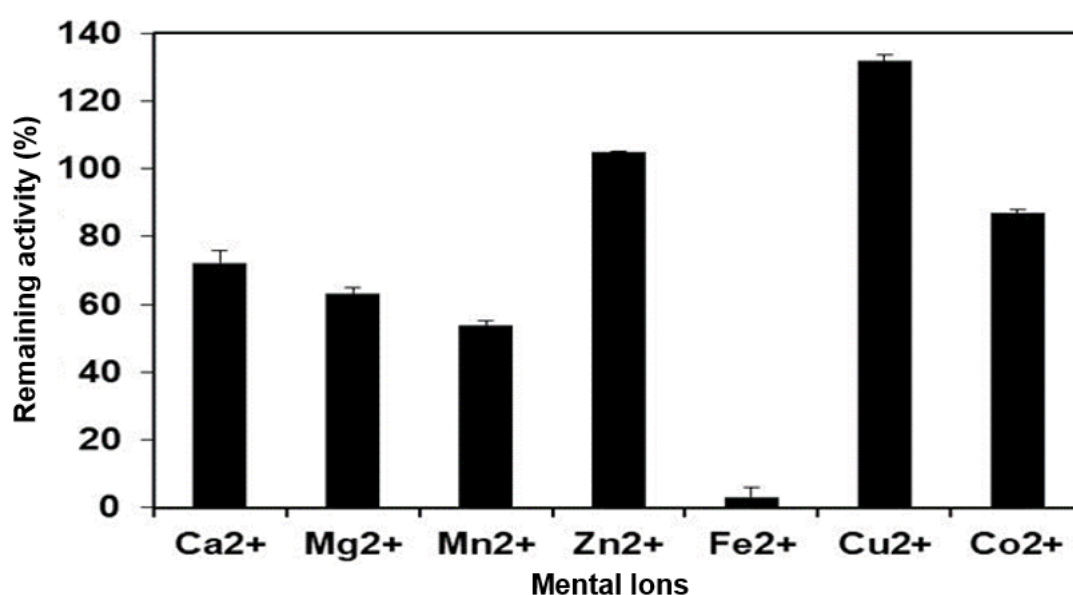


Figure 3.26. Effect of metal ions on the stability of recombinant laccase.

3.4. Evaluation the application of laccase

3.4.1. Synthetic dyes degradation by recombinant laccase

Table 3.3. Synthetic dye decolorization rate of recombinant laccase

Synthetic dyes	Dye degradation efficiency (%)
----------------	--------------------------------

	Decomposition time (hour)			
	4	8	12	24
Bromothymol blue	39.2 ^b	41.5 ^b	43.3 ^b	50.0 ^a
Methylene blue	24.7 ^c	26.9 ^{bc}	29.9 ^b	31.2 ^a
Methyl orange	43.5 ^b	45.4 ^b	45.1 ^b	50.9 ^a
Crystal violet	30.4 ^b	36.0 ^b	41.2 ^b	48.2 ^a
Remazol brilliant blue R	65.1 ^c	76.5 ^{bc}	86.0 ^{ab}	88.4 ^a
Aniline blue	27.1 ^c	45.5 ^b	56.0 ^a	57.9 ^a
Evans blue	27.7 ^b	27.9 ^b	30.0 ^b	46.1 ^a
Reactive black	34.2 ^b	52.4 ^a	56.1 ^a	58.5 ^a
Indigo carmine	29.5 ^c	40.0 ^c	77.9 ^b	82.7 ^a
Orange II	13.7 ^d	17.5 ^c	20.4 ^a	27.3 ^a
Malachite green	34.5 ^b	43.5 ^b	54.0 ^a	61.4 ^a

Data were expressed as the mean of three replicates and were analyzed by one-way ANOVA with $p < 0.05$. The letters a, b, c, d in each row indicate a significant difference.

Enzymes have the ability to decolorize about 50% of dyes after 24 hours of reaction. In particular, Folac1 was able to decolorize 82.7% and 88.4% in the case of Indigo carmine and Remazol brilliant blue R. When compared with the decolorization activity in *Fusarium oxysporum* HUIB02, recombinant Folac1 showed a significant improvement including 38.87%, 13.93%, 40.44% and 17.54% in the case of Crystal violet, Aniline blue, Evans blue and Orange II colors.

Chapter 4. DISCUSSION

4.1. ISOLATION OF LACCASE ACTIVE MOLD STRATEGY

We selected 3 strains F4, F5 and F8 capable of degrading lignin, in which strain F4 had the strongest ability to biosynthesize laccase, reaching 186 U/L after 12 days of fermentation. Compared with the results studied at home and abroad, the strain *F. oxysporum* HUIB02 has very high laccase activity, which can create many potential applications in the treatment of the environment, especially the treatment of synthetic dyes.

4.1.1. Substrate

Producing laccase with the carbon source of rice straw instead of using glucose is of great commercial significance. The laccase activity of *T. versicolor*

BBEL0970 was enhanced using straw as a substrate source, reaching 1030 U/g, indicating a high potential for laccase production from rice straw.

4.1.2. Determination of some properties of natural laccases

*** pH**

Most fungal laccases are active at acidic or neutral pH values but lose activity under alkaline conditions. Laccase from *F. oxysporum* HUIB02 also works optimally at pH5, similar to laccases in other strains of many studies around the world.

*** Temperature**

In our study, the optimal temperature for laccase activity from *F. oxysporum* HUIB02 was 45°C, which is also within the general optimum temperature range of laccases of different origin.

*** Metal ions**

Laccase activity was enhanced by metal ions such as Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} at a low concentration of 1mM. Increasing the concentration of metal ions except Cu^{2+} and Zn^{2+} to 5 mM or more reduces enzyme activity.

4.2. Isolation of laccase coding genes

When compared with other research results such as that of Jing Wu et al., the laccase-coding genes from *F. oxysporum* HUIB02 are highly homologous and have the characteristics of a typical laccase.

4.3. Enzyme folac1 encoding gene expression in *P. pastoris*

4.3.1. Folac1 gene expression

Fungal laccases are usually glycosylated, with a mass increase of 10% - 25%, however some laccases have an increase of more than 30%. The carbohydrate fraction of laccase has been shown to ensure conformational stability and to protect the enzyme from proteolysis and inactivation by free radicals, so the Folac1 gene is expressed in *P.pastoris*-derived isolated from *Fusarium oxysporum* HUIB02 is also in this rule

4.3.2. Investigation of recombinant enzyme properties

When expressing the lac4 Psc gene from *Pleurotus sajor caju* in *P.pastoris*, with ABTS as the substrate, the enzyme displayed optimal activity at 35°C and pH 3.5; The enzyme is strongly inhibited by sodium azide and thioglycolic acid. In our study, recombinant Folac1 expressed in *P. pastoris* had an optimal operating temperature of 55°C at pH 5.5.

4.3.3. Optimization of recombinant laccase expression

In the study of laccases from cDNA of *P. sanguineus* expressed through *P. pastoris*, 0.8% alanine was used in BMM growth medium and pH was maintained around 6.5 during culture.

4.4. Testing about recommended laccase industrial dyes

The difference in decolorization efficiency may be due to differences in the molecular structure of the dyes. Laccase exhibits very high efficiency in decolorization of anthraquinone dye RBBR, similar to purified laccase from *P. sanguineus*. In contrast, the recombinant laccase purified from *P. methanolica* required 16 h to degrade about 90% of RBBR under laccase activity higher than 25 U/mL in the presence of mediators, decolorization of indigo carmine by laccase can be significantly enhanced.

CONCLUSION

From the research results, we draw the following conclusions:

1. Isolation high laccase production *F. oxysporum* strain with production level of 186 U/mL after 12 days of fermentation.
2. Clonning *cFolac1*, *cFolac2*, *cFolac3* and *cFolac4* genes into pGEM® T-Easy vector. The nucleotide of these genes have been sequenced and registered on the Genbank with accession code of: *cFolac1* (MT362052); *cFolac2* (KY825237); *cFolac3* (KY825238) and *cFolac4* (KY825239).
3. Recombinant expression *cFolac1* in *P. pastoris*.
4. The recombinant *P. pastoris* strain produced highest laccase under culture conditions included temperature of 25°C, shaking speed of 210 rpm, initial cell density OD₆₀₀ = 1. Specific enzyme activity reached 66538 U/mg after 4 days culture and the protein concentration was 0.9 µg/µL. The recombinant laccase had molecular weight of 76 kDa optimal temperature of 55°C, optimal pH of 4.5; Cu²⁺ ions increased enzyme activity while Fe²⁺ ions inhibited laccase activity.
5. Recombinant laccase removed color of different synthetic dyes after 24 hours of reaction. Especially, rFolac1 decolorized 82.7% and 88.4% Indigo carmine and Remazol brilliant blue R, respectively. In compared with the decolorization ability by native strain *F. oxysporum* HUIB02, rFolac1 showed an improvement on crystal violet, aniline blue, evans blue and orange II degradation, reaching 38.87%, 13.93%, 40.44% and 17.54% color removal, respectively.

SUGGESTION

1. Optimization and production of rFolac1 at the scale of 5 L fermenter to increase recombinant enzyme production.

2. Test the application of recombinant laccase under laboratory and practical conditions to treat many contaminant compounds such as heavy metals, antibiotics (in medical wastewater), synthetic dyes

LIST OF PUBLICATIONS

1. Dang Thi Thanh Ha, Le Kim Tuan, Dinh Thi Kim Thien, Pham Thi Ngoc Lan, Hoang Tan Quang, Tran Thuy Lan, Nguyen Duc Huy (2018), Cloning and sequencing of laccase 3 (Folac3) gene from *Fusarium oxysporum*, Journal of Science, Hue University. Episode 127, No. 1C, 2018; ISSN 1859-1388.
2. Dang Thi Thanh Ha, Duong Thi Hai Ninh, Thi Le Kim Tuan, Do Tran Huong Duyen, Le My Tieu Ngoc, Pham Thi Ngoc Lan, Nguyen Duc Huy (2020), Isolation of the gene encoding laccase4 from *Fusarium oxysporum*, Journal of Science, Tay Nguyen University. Issue 40, February 2020, ISSN: 1859-4611.
3. Nguyen Duc Huy, Dang Thi Thanh Ha, Kuan Shiong Khoo, Pham Thi Ngoc Lan, Hoang Tan Quang, Nguyen Hoang Loc, Seung-Moon Park, Ashokkumar Veeramuthu, Pau Loke Show (2020), Synthetic dyes removal by *Fusarium oxysporum* HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation, Environment Technology & Innovation 19: 101027.
4. Dang Thi Thanh Ha, Le My Tieu Ngoc, Nguyen Thi My Le, Nguyen Bao Hung, Le Kim Tuan, Le Thi Kim Thoa, Tran Thi Huong Giang, Pham Thi Ngoc Lan, Tran Thuy Lan, Le Thi Kim Thoa, Trinh Thi Phuong Thao, Vu Duc Hoang, Nguyen Duc Huy, (2020), Cloning and sequence analysis of the gene encoding laccase 2 from *Fusarium oxysporum* HUIB02 to generate genetic material for recombinant expression, Conference Scientific Report National Biotechnology 2020, Hue University Publishing.