

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LACCASE TỪ CHỦNG *Aspergillus nidulans* HUIB03

Đặng Thị Thanh Hà^{1*}, Nguyễn Đức Huy², Nguyễn Thị Bé²,
Lê Thị Diệu Huyền², Phạm Thị Ngọc Lan³

¹ Khoa KHTN&CN, Đại học Tây Nguyên

² Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

³ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

*Email: ngoclankh@husc.edu.vn

Ngày nhận bài: 14/7/2022; ngày hoàn thành phản biện: 18/7/2022; ngày duyệt đăng: 4/8/2022

TÓM TẮT

Laccase là enzyme có ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau đặc biệt là công nghiệp dệt, nhuộm và xử lý ô nhiễm môi trường. Trong nghiên cứu này, chủng nấm sinh enzyme laccase được phân lập từ mùn bã thực vật trên địa bàn thành phố Huế. Qua sàng lọc tuyển chọn được chủng có khả năng sinh tổng hợp laccase mạnh, đạt 3,07 U/mL sau 15 ngày lên men. Chủng nấm được định danh là *Aspergillus nidulans* HUIB03 và có khả năng sinh tổng hợp laccase mạnh nhất ở điều kiện lên men dịch thể trong môi trường khoáng tối thiểu BSM (Basal Minimal Medium) có bổ sung 5% bột rơm, ở nhiệt độ 25°C sau 9 ngày nuôi cấy. Đây là nghiên cứu đầu tiên phân lập và xác định chủng nấm sinh tổng hợp laccase từ nguồn vật liệu thu ở địa bàn thành phố Huế. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng sản xuất laccase từ chủng *A. nidulans* HUIB03 cho các nghiên cứu thử nghiệm ứng dụng như loại màu thuốc nhuộm tổng hợp nhằm hạn chế ảnh hưởng bất lợi của chúng lên hệ sinh thái.

Từ khóa: *Aspergillus nidulans*, hoạt tính, laccase, nấm sợi, phân lập.

1. MỞ ĐẦU

Ngày nay, tốc độ ô nhiễm môi trường đang gia tăng do việc thải các chất thải vào môi trường không được 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 rằng enzyme có nhiều khả năng và triển vọng trong vấn đề xử lý ô nhiễm môi trường. Enzyme có thể hoạt động trên các chất ô

nh 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 với nhiều ưu điểm như: 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 về 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 thuộc lớp oxidoreductase và hydrolase có khả năng phân hủy các hợp chất được nêu trên rất cao [1].

Laccase (EC 1.10.3.2, p-diphenol oxidase) cùng với manganese peroxidase, lignin peroxidase và versatile peroxidase thuộc nhóm enzyme có khả năng phân giải lignin. Laccase được phân nhóm oxidase với ion đồng nằm ở trung tâm phản ứng, xúc tác quá trình oxy 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 oxygen phân tử làm chất nhận điện tử nên enzyme này được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, xử lý phụ phẩm nông nghiệp, công nghiệp dệt nhuộm, cảm biến sinh học, dược học sinh tổng hợp chất hữu cơ và phục hồi sinh học [6], [9]. Laccase được sinh tổng hợp trong quá trình sinh trưởng và phát triển của nhiều sinh vật khác nhau từ thực vật đến vi khuẩn, côn trùng. Tuy nhiên, laccase chủ yếu được tìm thấy ở nấm sợi. Trong tự nhiên, laccase tham gia vào quá trình chuyển hóa lignin, chống chịu ngoại cảnh bất lợi, xâm nhiễm vào vật chủ và nhiều quá trình sinh lý khác như tạo bào tử, phân hóa giới tính, phát triển quả thể của nấm. Nhiều báo cáo cho thấy nhiều loài nấm khác nhau có khả năng sinh tổng hợp laccase như: *Melanocarpus*, *Cerrena*, *Magnaporthe*, *Trametes*, *Trichoderma*, *Fusarium* và *Aspergillus* [2-5, 8, 12, 14].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả phân lập và đánh giá khả năng sinh tổng hợp laccase từ chủng nấm *Aspergillus nidulans* HUIB03 phân lập trên địa bàn thành phố Huế.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Mùn bã thực vật lấy từ một số khu vực trên địa bàn thành phố Huế.

2.2. Phương pháp

Phân lập *Aspergillus* sinh tổng hợp laccase

Mẫu mùn bã thu nhận trên địa bàn thành phố Huế được chứa trong các túi nilon có khóa kéo, bảo quản lạnh khi đem về phòng thí nghiệm. Mẫu được cân với khối lượng 1 g cho vào bình tam giác chứa 9 mL nước cất vô trùng, lắc đều và làm lắng cặn bằng cách để yên bình tam giác trong 5 phút. Sau đó hút 1 mL dịch nổi chuyển qua

bình tam giác chứa 9 mL nước cất vô trùng và trộn đều. Tiếp tục như vậy để có độ pha loãng 10^{-4} . Sử dụng mẫu pha loãng để cấy trải lên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), 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. Các khuẩn lạc có hình thái đặc trưng của *Aspergillus* với hệ khuẩn ty phân tán đều, bào tử trần khá lớn được đánh dấu tròn trên thể bình sẽ được cấy chuyển sang môi trường chọn lọc laccase. Nấm được nuôi cấy trên môi trường khoáng tối thiểu BSM (Basal Minimal Medium) có bổ sung 0,01% guaiacol làm chất chỉ thị [13]. Hoạt tính laccase được đánh giá sau 24 ngày nuôi cấy trên môi trường chọn lọc với sự xuất hiện của vùng màu đỏ hình thành từ sản phẩm oxy hóa guaiacol bao quanh khuẩn lạc nấm.

Định danh chủng *Aspergillus* phân lập

DNA tổng số của chủng nấm cho hoạt tính laccase ngoại bào mạnh nhất được tách chiết dựa trên phương pháp tách chiết DNA tổng số dùng đệm cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) như mô tả của Sambrook và cs (2001) [11] với một số điều chỉnh nhỏ. Sợi nấm được nuôi trong 5 mL môi trường PD (Potato Dextrose) trong 3 ngày ở 30°C . Sinh khối tươi được thu hồi bằng ly tâm lạnh 4°C trong 5 phút với tốc độ 14.000 vòng/phút. Sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy và tái huyền phù trong 500 μL đệm CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β -mercaptoethanol). Tế bào được phá vỡ bằng sóng siêu âm ở tần số 60 Hz, khoảng ngắt quãng 6 giây trong 5 phút bằng thiết bị siêu âm VC-130 (Sonics, Mỹ) kết hợp ủ 65°C trong 30 phút. Dịch chiết tế bào chứa DNA tổng số được thu hồi bằng ly tâm lạnh 4°C trong 5 phút với tốc độ 14.000 vòng/phút. DNA tổng số được tách chiết và tinh sạch sử dụng 500 μL hỗn hợp phenol: chloroform: isopropanol (tỷ lệ 25:24:1), trộn đều bằng vortex và phân tách bằng ly tâm lạnh 4°C trong 10 phút với tốc độ 14.000 vòng/phút. Hút 400 μL hỗn hợp pha trên, chuyển sang ống 1,5 mL mới và DNA tổng số được kết tủa với 2 lần thể tích ethanol tinh khiết, rửa kết tủa bằng ethanol 70% và hòa tan trong 50 μL nước cất vô trùng. Để định danh phân tử chủng nấm phân lập, trình tự nucleotide của vùng bảo thủ ITS1-4 được khuếch đại và sử dụng primer ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) và ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCG G) [10]. Phản ứng PCR được tiến hành ở thể tích 25 μL chứa 40 ng DNA tổng số, 10 pmol ITS1, 10 pmol ITS4, 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, Mỹ). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự nucleotide thông qua công ty Firstbase (Malaysia). Trình tự được hoàn chỉnh bằng BLAST trên NCBI để đánh giá mức độ tương đồng của vùng bảo thủ ITS1-4, từ đó tìm ra loài tương đồng nhất với trình tự cần nghiên cứu. Cây phả hệ di truyền của chủng nấm được so sánh và phân tích bằng phần mềm MEGA X với độ lặp lại bootstrap 500 lần [7].

Khảo sát điều kiện sinh tổng hợp laccase ngoại bào

Hoạt độ laccase ngoại bào được khảo sát từ chủng chọn lọc thông qua nuôi cấy

trên môi trường tối thiểu BSM có bổ sung bột rom (kích thước ≤ 2 mm) hoặc bột gỗ. Nấm được nuôi cấy giống trong 5 mL môi trường PD lỏng (2% peptone, 20% dịch chiết khoai tây) ở 30°C trong 3 ngày với tốc độ lắc 180 vòng/phút. Dịch nuôi được cấy chuyển qua bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường có 0,2 g/L KH_2PO_4 , 0,05 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,033 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,043 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 10% bột rom (môi trường bán rắn MF1) hoặc 10% bột gỗ (môi trường bán rắn MF2) hoặc 5% bột rom (môi trường dịch thể MF3) hoặc 5% bột gỗ (môi trường dịch thể MF4). Quá trình nuôi cấy được tiến hành ở 30°C trong 18 ngày với tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau mỗi 3 ngày, dịch nuôi cấy được thu nhận và xác định hoạt độ enzyme.

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp laccase được khảo sát với các khoảng nhiệt độ từ 25°C đến 35°C. Sợi nấm được nuôi sinh khối trên môi trường PD trong 3 ngày ở 30°C, lắc 180 vòng/phút. Sau đó sinh khối được cấy chuyển sang môi trường sản xuất laccase (môi trường MF3 và MF4). Dịch nuôi cấy được thu nhận sau mỗi 3 ngày và xác định hoạt độ enzyme.

Xác định hoạt độ enzyme laccase

Hoạt độ laccase được xác định dựa trên sự oxy hóa ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) tạo thành hợp chất được hấp thụ ánh sáng mạnh tại bước sóng 420 nm [13]. Một lượng dung dịch chứa enzyme được ủ với 1 mM ABTS trong đệm sodium acetate 100 mM, pH 4,5 trong thể tích phản ứng 1 mL. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ ủ 40°C trong 10 phút. Sau đó, dung dịch phản ứng được đo ở bước sóng 420 nm ($\epsilon_{420} = 36,0 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$) bằng máy quang phổ U-2910 spectrophotometer (Hitachi, Nhật Bản). Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1 μM sản phẩm từ ABTS trong thời gian 1 phút, ở điều kiện thí nghiệm.

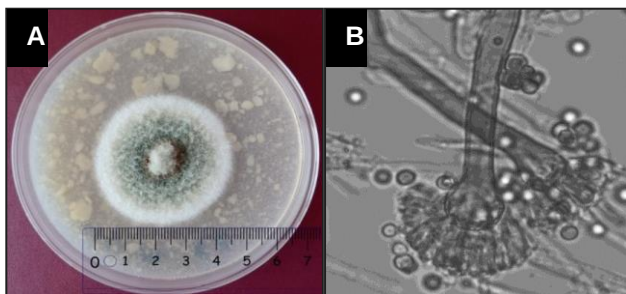
Phương pháp xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc chủng nấm có hoạt tính laccase

Từ các nguồn mẫu thu nhận đã lựa chọn được chủng nấm có các đặc điểm hình thái đặc trưng của chi *Aspergillus* và được kí hiệu là chủng F8.



Hình 1. Hình thái của chủng nấm F8. (A) Sự phát triển trên môi trường PDA đĩa thạch

(B) Hình thái sợi nấm dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40 lần.

Sau 3 đến 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, khuẩn lạc chủng F8 có đường kính khoảng 4,5 cm, dạng sợi dày, mọc dài, bề mặt nhung mướt, mép khuẩn lạc mỏng, bìa rễ cây. Khuẩn ty khí sinh có màu trắng và chuyển dần sang màu xanh rêu khi sợi nấm già (màu của bào tử), khuẩn ty cơ chất mọc sâu, có màu trắng. Quan sát hiển vi thấy sợi nấm dài, phân nhánh mạnh, có bào tử bọc dạng lớn. Cuống sinh bào tử phát sinh từ khuẩn ty khí sinh không phân nhánh, phần phình ở đỉnh cuống tròn, thể bình sơ cấp, bào tử trần dạng chuỗi hạt mọc tròn (hình 1).

Chủng F8 được cấy chuyển lên môi trường BSM có bổ sung chất chỉ thị màu guaiacol (0,01%) sau 24 ngày nuôi cấy cho thấy có vòng oxy hóa guaiacol với màu chuyển nâu đỏ (hình 2). Sự xuất hiện của màu oxy hóa này chứng tỏ chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp peroxidase trong đó có laccase. Do vậy, chủng nấm được lựa chọn để khảo sát khả năng sinh tổng hợp laccase ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau.



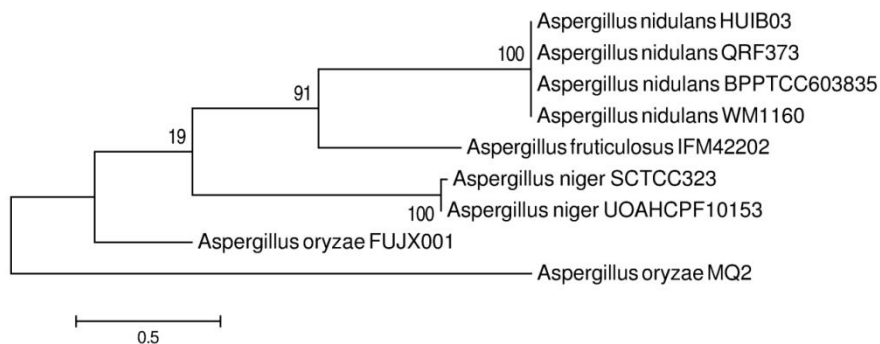
Hình 2. Sàng lọc chủng nấm F8 sinh tổng hợp laccase trên môi trường chọn lọc có bổ sung guaiacol 0,01%.

3.2. Định danh chủng nấm phân lập

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGC
GCCCAACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCC
CCAGGGGCGAGCCGCGGGGACCACTGAACCTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGT
CTGAGCCTGAATACAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGG
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCG
TCGTCCCCCCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGTGTCCGGTC
CTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTAGGGCCGGCCGGGCGCCAG
CCGGCGTCTCCAACCTTATTTTCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC
CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Hình 3. Trình tự nucleotide đoạn ITS1-4 của chủng nấm F8

Trình tự nucleotide đoạn ITS1-4 của chủng nấm F8 được so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen GenBank. Kết quả so sánh chỉ ra chủng F8 tương đồng cao 100% với chủng nấm *Aspergillus nidulans* như chủng *A. nidulans* WM 11.60 (mã số: KP131596), *A. nidulans* NRRL 2395 (mã số: AY373888), *A. nidulans* RGT-S3 (mã số: HQ674655) (hình 4). Do đó, chủng nấm F8 được đặt tên là *A. nidulans* HUIB03, trình tự nucleotide đã được đăng ký trên ngân hàng Genbank với mã số: KY425597.

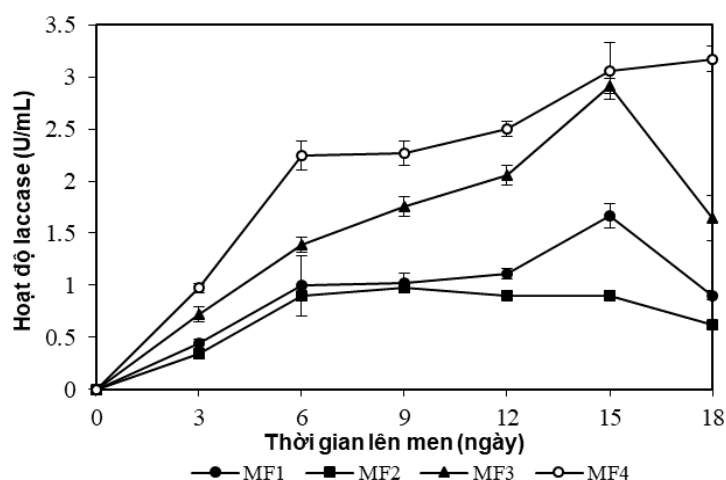


Hình 4. Cây phả hệ di truyền của chủng nấm *Aspergillus nidulans* HUIB03 so với một số chủng nấm đăng ký trên ngân hàng gen GenBank

3.3. Ảnh hưởng môi trường và nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt độ laccase của chủng *Aspergillus nidulans* HUIB03

Môi trường nuôi cấy là một trong những yếu tố rất quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp laccase. Khả năng tích lũy enzyme laccase được khảo sát ở kiện nuôi cấy lên men bán rắn (bổ sung 10% cơ chất) và lên men dịch thể (bổ sung 5% cơ chất). Ở mỗi điều kiện thí nghiệm, môi trường BSM được bổ sung thêm cơ chất có nguồn gốc từ sinh khối thực vật là bột rom và bột gỗ. Kết quả khảo sát khả năng tích lũy laccase của

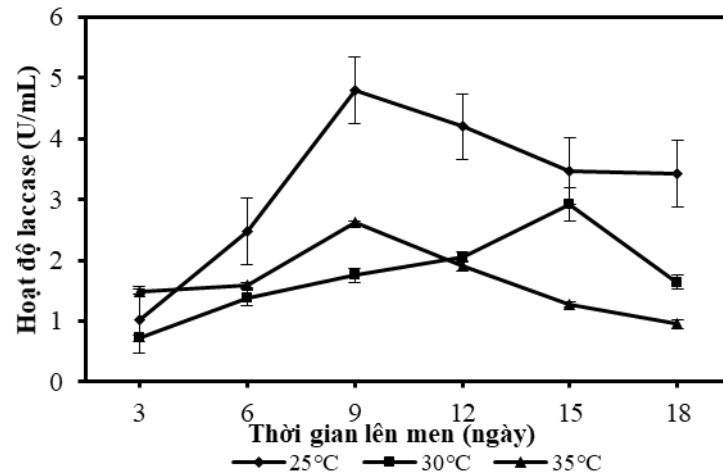
chúng nấm trên 4 loại môi trường lên men là MF1, MF2, MF3 và MF4 qua 18 ngày nuôi cấy được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Khả năng tích lũy laccase của chủng *Aspergillus nidulans* HUIB03 ở 4 môi trường lên men

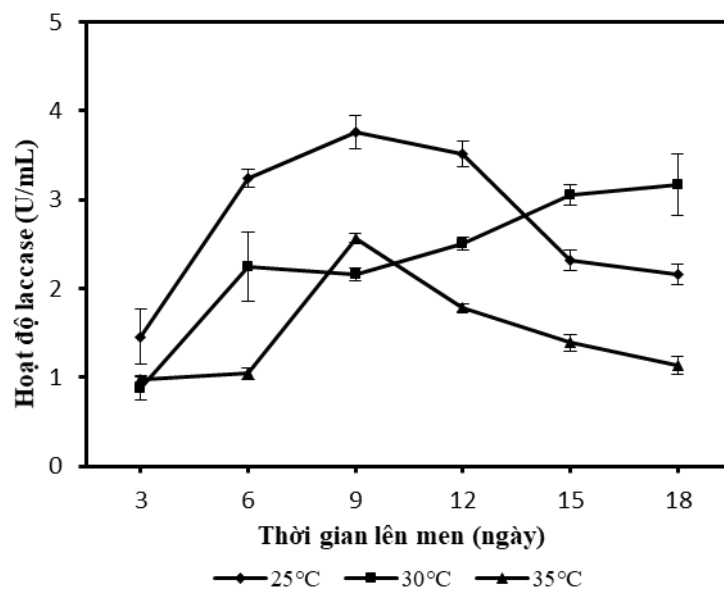
Qua thí nghiệm cho thấy, hoạt độ enzyme thu nhận đạt giá trị cao nhất vào ngày thứ 15 của quá trình lên men với giá trị 1,67 U/mL; 0,9 U/mL, 2,92 U/mL và 3,07 U/mL tương ứng với các môi trường MF1, MF2, MF3 và MF4. Khả năng tích lũy laccase của chủng *A. nidulans* HUIB03 trong môi trường lên men MF2 là thấp nhất, chỉ đạt 0,97 U/mL sau 9 ngày lên men và không có sự thay đổi nhiều qua 18 ngày lên men. Môi trường lên men MF4 là thích hợp nhất cho sinh tổng hợp laccase của chủng *A. nidulans* HUIB03. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Xu C. và cộng sự (2015) về nấm mục trắng. Khi lên men sản xuất enzyme trong môi trường bổ sung cơ chất là rom lúa mạch, chủng *Trametes versicolor* BBEL0970 tích lũy laccase đạt cực đại 10,3 U/mL, tăng 58,5% so với môi trường bổ sung glucose (đạt 5,2 U/mL) sau 20 ngày lên men [13].

Qua khảo sát cho thấy, chủng *A. nidulans* HUIB03 có khả năng sinh enzyme laccase ngoại bào trong điều kiện lên men dịch thể cao hơn so với lên men bán rắn. Vì vậy đánh giá khả năng tích lũy laccase ngoại bào được thực hiện ở 3 mức nhiệt độ 25°C; 30°C và 35°C trong điều kiện lên men dịch thể. Kết quả khảo sát trên chủng *A. nidulans* HUIB03 với môi trường MF3 và MF4 cho kết quả môi trường lên men MF3 ở 25°C là tốt nhất cho sự sinh tổng hợp laccase, với hoạt độ enzyme thu nhận đạt giá trị cực đại 4,8 U/mL sau 9 ngày lên men. Khi tiến hành nuôi cấy ở 30°C và 35°C, hoạt độ enzyme thu nhận được có giá trị thấp hơn đáng kể so với mức nhiệt độ 25°C, đạt cực đại tương ứng 2,92 U/mL và 2,62 U/mL (hình 6).



Hình 6. Khả năng tích lũy laccase của chủng *Aspergillus nidulans* HUIB03 ở 3 mức nhiệt độ trong môi trường lên men MF3

Với môi trường lên men MF4 cho kết quả không có sự thay đổi lớn về khả năng tích lũy laccase với 3 mức nhiệt độ nuôi cấy. Ở nhiệt độ 25°C cho kết quả tốt nhất với hoạt độ enzyme laccase thu nhận sau 9 ngày nuôi cấy đạt giá trị 3,76 U/mL. Ở mức nhiệt độ 30°C, khả năng tích lũy enzyme tăng đều qua các ngày và kéo dài lên đến 18 ngày đạt 3,17 U/mL (hình 7).



Hình 7. Khả năng tích lũy laccase của chủng *Aspergillus nidulans* HUIB03 ở 3 mức nhiệt độ trong môi trường lên men MF4

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập và sàng lọc được chủng nấm thuộc chi *Aspergillus* có khả năng sinh tổng hợp laccase mạnh với hoạt độ đạt 3,07 U/mL. Kết quả định danh phân tử xác định chủng nấm thuộc loài *Aspergillus nidulans*. Điều kiện thích hợp cho chủng nấm *A. nidulans* HUIB03 sinh tổng hợp laccase là môi trường lên men dịch thể bổ sung 5% cơ chất bột rom sau 9 ngày lên men ở nhiệt độ 25°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 30(2): 215-242. DOI 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
- [2]. Cazares-Garcia, S.V., M. Arredondo-Santoyo, G. Vazquez-Marrufo, M. Soledad Vazquez-Garciduenas, V.A. Robinson-Fuentes and V.M. Gomez-Reyes (2016). Typing and selection of wild strains of *trichoderma* spp. Producers of extracellular laccase. *Biotechnol Progr*, 32(3): 787-798. DOI 10.1002/btpr.2237.
- [3]. Glyer, and B.B. Chattoo (2003). Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *magnaporthe grisea*. *FEMS microbiology letters*, 227(1): 121-126.
- [4]. Kallio, J.P., S. Auer, J. Janis, M. Andberg, K. Kruus, J. Rouvinen, A. Koivula and N. Hakulinen, (2009). Structure-function studies of a *melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds. *Journal of molecular biology*, 392(4): 895-909. DOI 10.1016/j.jmb.2009.06.053.
- [5]. Khan, R. and M.H. Fulekar (2017). Mineralization of a sulfonated textile dye reactive red 31 from simulated wastewater using pellets of *Aspergillus bombycis*. *Bioresour Bioprocess*, 4(1): 23. DOI 10.1186/s40643-017-0153-9.
- [6]. Kudanga, T., G.S. Nyanhongo, G.M. Guebitz and S. Burton (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme Microb Tech*, 48(3): 195-208. DOI 10.1016/j.enzmictec.2010.11.007.
- [7]. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018), MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol Biol Evol*, 35(6), pp. 1547-1549
- [8]. Kwiatos, N., M. Ryngajlo and S. Bielecki (2015). Diversity of laccase-coding genes in *fusarium oxysporum* genomes. *Front Microbiol*, 6: 933. DOI 10.3389/fmicb.2015.00933.
- [9]. Majeau, J.A., S.K. Brar and R.D. Tyagi (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour technol*, 101(7): 2331-2350. DOI 10.1016/j.biortech.2009.10.087.
- [10]. Manter D.K., Vivanco J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis, *J Microbiol Methods*, 71(1), pp. 7-14.
- [11]. Sambrook, J., MacCallum, P., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press: NY.

- [12]. Songulashvili, G., D. Spindler, G.A. Jimenez-Tobon, C. Jaspers, G. Kerns and M.J. Penninckx (2015). Production of a high level of laccase by submerged fermentation at 120-l scale of *Cerrena unicolor* c-139 grown on wheat bran. *C R Biol*, 338(2): 121-125. DOI 10.1016/j.crvi.2014.12.001.
- [13]. Xu, C., D. Singh, K.M. Dorgan, X. Zhang and S. Chen (2015). Screening of ligninolytic fungi for biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Can J Microbiol*, 61(10): 745-752. DOI 10.1139/cjm-2015-0156.
- [14]. Zeng, S., J. Zhao and L. Xia (2017). Simultaneous production of laccase and degradation of bisphenol a with *Trametes versicolor* cultivated on agricultural wastes. *Bioproc Biosyst Eng*, 40(8): 1237-1245. DOI 10.1007/s00449-017-1783-1.

ASSESSMENT OF LACCASE PRODUCTION FROM *Aspergillus nidulans* HUIB03

Dang Thi Thanh Ha^{1*}, Nguyen Duc Huy², Nguyen Thi Be³,
Le Thi Dieu Huyen³, Pham Thi Ngoc Lan³

¹ Faculty of Natural Sciences & Technology, Tay Nguyen University

² Institute of Biotechnology, Hue University

³ University of Sciences, Hue University

ABSTRACT

Laccases have been widely applied in various industries, especially in textile and bioremediation. In this study, a fungus *Aspergillus nidulans* HUIB03 was isolated from wood decay in Hue city. Strong laccase biosynthesis were selected, reaching 3.07 U/mL after 15 days of fermentation. The isolate exhibited highest laccase production in BSM (Basal Minimal Medium) was supplemented with 5% rice straw at temperature of 25°C after 9 days of fermentation. This is the first report on isolation of the *A. nidulans* which produces laccase from materials in Hue city. The results also indicated that the *A. nidulans* has promising application for synthetic dye decolouration, reducing the harmful effect of these substances on ecology system.

Keywords: *Aspergillus nidulans*, activity, basidiomycete, isolation, laccase.



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 2022 học Nghiên cứu sinh chuyên ngành Công nghệ sinh học tại Trường 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.



Nguyễn Đức Huy tốt nghiệp đại học năm 2006, chuyên ngành Công nghệ sinh học tại Đại học Bách Khoa Đà Nẵng, 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.



Nguyễn Thị Bé tốt nghiệp đại học năm 2016 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, chuyên ngành Công nghệ sinh học.



Lê Thị Diệu Huyền sinh ngày 10/10/1983, tốt nghiệp đại học năm 2016 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, chuyên ngành Công nghệ sinh học.



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. Hiện 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.

