

O-GE10: EXPRESSION OF A RECOMBINANT LACCASE IN *PICCHIA PASTORIS* AND APPLICATION ON SYNTHETIC DYES REMOVAL

Le Thi Kim Thoa¹, Trinh Thi Phuong Thao¹, Nguyen Duc Huy¹,
Le My Tieu Ngoc¹, Nguyen Bao Hung¹, Dang Thi Thanh Ha², Truong Thi Be³

¹ Institute of Biotechnology, Hue University

² Tay Nguyen University, Buon Ma Thuot, Daklak

³ QUATEST 2

SUMMARY

Laccase is an enzyme in the lignin-degrading enzyme system, a group of multicellular oxidizing enzymes nucleus copper that catalyzes, the reduction of 4 oxygen electrons to form water. It applied to treat various kinds of agricultural and industrial wastes worldwide. In this research, the laccase of *Fusarium oxysporum* was optimized the enzyme activity in *Pichia pastoris*. As the result, the *Folac1* gene was examined with a pair of primers AOX1 with size is 2,2 kb and 2,4 kb, leading the recombinant laccases protein (*Folac1*) was produced in *Pichia* successfully. SDS-PAGE indicated the molecular mass of Lac1 was 76 kDa approximately. *P. pastoris* recombinant laccase biosynthesis was highest when cultured at 25°C, 210 rpm, initial cell density OD₆₀₀ = 1, methanol 2%. The obtained enzyme specific activity reached 66538 U/mg after 4 culture date and protein concentration was 0.9 µg/µl. Besides, enzyme reach to maximum activity at day 4th (944,8 U/L); optimal pH 4.5; optimal temperature 55°C; Cu²⁺ promoted the enzyme activity to 131.8% compared to control samples without Cu²⁺ supplement. The kinetic parameters of the laccase is Km 13,58 mM and Vmax 59,88 µM/min with ABTS showing its highly catalytic ability. *Folac1* was applied for decolorize the various kind of dye including basic dyes, acid dyes, reactive dyes, azoic dyes. The results showed that most of cases, the enzyme have able to decolorize about 50% of dye after 24hours of reaction. Especially *Folac1* can decolorize 82.7 % and 88.4 % in the case of Indigo carmine and Remazol brilliant blue R respectively. To study the effect of mediator on the efficient of decolonization, we added syringaldehyde (1mM), HOBT (1mM), vanaline (1mM) as mediators to the reaction, the result indicated that syringaldehyde was significant improved the active of *Folac1* to decolorize bromothymol blue (55.73%) and reactive black (75.43%); while HOBT was significantly improved the active of *Folac1* to decolorize orange II (34.01%); and vanaline was promoted the active of *Folac1* in the case of methylene blue (40,22%), crytal violet (46.88%), and evans blue (89,50%).

Keywords: Folac1, laccase, *Pichia pastoris*, synthetic dyes.

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN LACCASE TÁI TỔ HỢP TRONG *PICCHIA PASTORIS* VÀ ỨNG DỤNG PHÂN HỦY THUỐC NHUỘM TỔNG HỢP

Lê Thị Kim Thoa¹, Trịnh Thị Phương Thảo¹, Nguyễn Đức Huy¹,
Lê Mỹ Tiểu Ngọc¹, Nguyễn Bảo Hưng¹, Đặng Thị Thanh Hà², Trương Thị Bé³

¹ Viện Công nghệ sinh học Huế, Đại học Huế

² Trường Đại học Tây Nguyên, Buon Ma Thuot, Đắk Lắk

³ QUATEST 2

TÓM TẮT

Laccase là một enzyme trong hệ thống enzyme phân hủy lignin, thuộc nhóm các enzyme oxy hóa đa nhân đồng xúc tác, phản ứng khử 4 điện tử oxy tạo thành nước. Nó được ứng dụng để xử lý các loại chất thải nông nghiệp và công nghiệp trên toàn thế giới. Trong nghiên cứu này, laccase của *Fusarium oxysporum* đã được tối ưu hóa hoạt động của enzyme trong *Pichia pastoris*. Kết quả là gen *Folac1* được kiểm tra với cặp mồi AOX1 có kích thước lần lượt là 2,2 kb và 2,4 kb, cho thấy protein tái tổ hợp (*Folac1*) đã biểu hiện ở *Pichia*. Kết quả SDS-PAGE cho thấy khối lượng phân tử của *Folac1* xấp xỉ 76 kDa. Quá trình sinh tổng hợp laccase tái tổ hợp ở *P. pastoris* cao nhất khi được nuôi cấy ở 25°C, 210 vòng / phút, mật độ tế bào ban đầu OD₆₀₀ = 1, methanol 2%. Hoạt độ riêng của enzyme thu được đạt 66538 U/mg sau 4 ngày nuôi cấy và nồng độ protein là 0,9 µg/µl. Bên cạnh đó, enzyme hoạt động tối đa ở ngày thứ 4 (944,8 U/L); pH tối ưu 4,5; nhiệt độ tối ưu 55°C; Cu²⁺ thúc đẩy hoạt tính của enzym lên 131,8% so với mẫu đối chứng không bổ sung Cu²⁺. Các thông số động học của laccase là Km 13,58 mM và Vmax 59,88 µM / phút với cơ chất ABTS cho thấy khả năng xúc tác của nó rất cao. *Folac1* được ứng dụng để khử màu cho nhiều loại thuốc nhuộm khác nhau bao gồm thuốc nhuộm basic, thuốc nhuộm acid, thuốc nhuộm reactive, thuốc nhuộm azoic. Kết quả cho thấy hầu hết các trường hợp, enzyme khử màu được khoảng 50% thuốc nhuộm sau 24 giờ phản ứng. Đặc biệt *Folac1* có thể khử màu lần lượt là 82,7% và 88,4% trong trường hợp màu Indigo carmine và Remazol brilliant blue R. Để nghiên cứu ảnh hưởng của các chất

mediator đối với hiệu quả khử ion, chúng tôi đã bổ sung thêm syringaldehyde (1mM), HOBT (1mM), vanaline (1mM) làm chất trung gian cho phản ứng, kết quả chỉ ra rằng syringaldehyde đã cải thiện đáng kể hoạt tính của *Folac1* để khử màu bromothymol blue (55,73%) và reactive black (75,43%); trong khi HOBT được cải thiện đáng kể hoạt tính của *Folac1* trong quá trình khử màu orange II (34,01%) và vanaline đã thúc đẩy hoạt tính của *Folac1* trong trường hợp khử màu methylene blue (40,22%), crystal violet (46,88%), và evans blue (89,50%).

Từ khóa: *Folac1*, laccase, *Pichia pastoris*, thuốc nhuộm tổng hợp.