

**P-HP07: NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA LACCASE TÁI TỔ HỢP TRONG NẤM MEN *PICHIA PASTORIS***Nguyễn Bảo Hưng<sup>1</sup>, Lê Thị Kim Thoa<sup>1</sup>, Lê Mỹ Tiểu Ngọc<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Huy<sup>1</sup><sup>1</sup> Phòng thí nghiệm công nghệ Enzyme-Protein, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Việt Nam<sup>2</sup> Khoa Sinh học Phân tử, Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Jeonbuk, Hàn Quốc**TÓM TẮT**

Laccase (EC 1.10.3.2) là một enzyme trong hệ enzyme phân giải lignin và là một polyphenol oxidase. Laccase được sinh ra từ chủng vi sinh vật tự nhiên thường có lượng thấp và chứa các thành phần không mong muốn. Chúng tôi đã phân lập và biểu hiện thành công gen mã hóa laccase từ nấm *Fusarium oxysporum* HUIB02 trong nấm men *Pichia pastoris*. Trong nghiên cứu này, Laccase tái tổ hợp được chúng tôi tối ưu điều kiện biểu hiện. Laccase tái tổ hợp được xác định chính xác bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide với kích thước 76 kDa, hoạt tính riêng đạt 66553 U/mg, nồng độ protein tinh sạch là 0,9 µg/µl. Laccase tái tổ hợp được cảm ứng tối ưu trong 4 ngày, mật độ tế bào đầu vào là OD600 bằng 1, chất cảm ứng methanol được bổ sung với nồng độ 2%, ở nhiệt độ nuôi cấy 25°C với tốc độ 210 rpm. Ngoài ra, laccase tái tổ hợp trong nấm men *P. pastoris* có hoạt tính cao nhất ở pH 4,5; nhiệt độ 55°C. Đối với ion Cu<sup>2+</sup> ở nồng độ 1 mM thì enzyme thu được tốt nhất nhưng ion Fe<sup>2+</sup> ở nồng độ 1 mM thì enzyme thu được kém nhất. Chiều dài của gen Folac1 là 2064 bp, mã hóa cho laccase có chiều dài 665 amino acid. Hoạt độ riêng của laccase với cơ chất ABTS (66553 U/mg) cao hơn so với hoạt độ riêng của laccase với cơ chất Guaiacol (1335 U/mg). Laccase tái tổ hợp sau khi tối ưu hoá có tiềm năng ứng dụng cao, và được chúng tôi sử dụng cho những nghiên cứu sau này.

Từ khóa: Laccase, *Pichia pastoris*, tối ưu hóa.

**OPTIMIZING THE EXPRESSION LEVEL OF RECOMBINANT LACCASE IN PICHIA PASTORIS**Nguyen Bao Hung<sup>1</sup>, Le Thi Kim Thoa<sup>1</sup>, Le My Tieu Ngoc<sup>2</sup>, Nguyen Duc Huy<sup>1</sup><sup>1</sup> Laboratory of Enzyme and Protein Technology, Institute of Biotechnology, Hue University, Hue, Vietnam<sup>2</sup> Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Jeonbuk National University, Korea**SUMMARY**

Laccase (EC 1.10.3.2) is an enzyme in the lignin-degrading enzyme system and a polyphenol oxidase. Laccase is produced from a natural microorganism strain that is often low in quantity and contains undesirable ingredients. We isolated and expressed the laccase encoding gene from *Fusarium oxysporum* HUIB02 fungus in *Pichia pastoris*. In this study, we optimized the expression conditions of the recombinant Laccase. Recombinant laccase was determined by electrophoresis on polyacrylamide gel with size of 76 kDa, specific activity reached 66553 U/mg, purified protein concentration was 0.9 µg / µl. The recombinant Laccase was optimally induced for 4 days, the input cell density was OD600 equal to 1, the methanol inducer was added at a concentration of 2%, at a culture temperature of 25°C at a shaking rate of 210 rpm. In addition, recombinant laccase in *P. pastoris* had the highest activity at pH 4.5; temperature 55°C. For Cu<sup>2+</sup> ions at 1 mM concentration, the best obtained of the enzyme was observed, and Fe<sup>2+</sup> ions at 1 mM concentration was the worst obtained of enzyme. The length of the Folac1 gene is 2064 bp, which encodes a laccase with a length of 665 amino acids. Specific activity of laccase with ABTS substrate (66553 U/mg) is higher than that of laccase with Guaiacol substrate (1335 U/mg). The optimized recombinant Laccase has a high potential for application, and used for further research.

Keywords: Laccase, *pichia pátoris*, optimization.

\* Author for corresspondence: Tel: 0906545902; Email [nguyenbaohung@hueuni.edu.vn](mailto:nguyenbaohung@hueuni.edu.vn)