

## NGHIÊN CỨU ĐỊNH LOẠI VÀ ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP LACCASE CỦA CHỦNG NẤM MỤC TRẮNG *Trametes polyzona* TĐ16

Nguyễn Thị Hồng Liên, Trần Thị Hương,  
Nguyễn Văn Hiếu, Đặng Thị Nhung, Phan Thị Hồng Thảo \*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: pthongthao@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 18.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 26.12.2023

### TÓM TẮT

Nấm mục trắng có khả năng phân hủy lignin trong gỗ hiệu quả. Laccase là enzyme có vai trò quan trọng trong quá trình phân cắt lignin và được ứng dụng rộng rãi trong một số ngành công nghiệp. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu định danh chủng nấm mục trắng TĐ16 được thu từ Vườn quốc gia Tam Đảo và lựa chọn một số điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp laccase của chủng. Chủng TĐ16 được nghiên cứu một số đặc điểm sinh học về hình thái quả thể, khuẩn lạc, khả năng sinh trưởng, sinh enzyme ngoại bào và phân tích trình tự vùng ITS - rDNA. Quả thể nấm TĐ16 có dạng vỏ sò, mép trơn, nằm ngang sát với thân cây. Mặt trên của quả thể nấm màu nâu đậm với các vân tròn đồng tâm. Lớp bào tử của quả thể nấm có màu nâu trắng, sần sùi. Trên môi trường MEA, khuẩn lạc chủng nấm TĐ16 bông xốp, màu trắng tuyết, tỏa tròn đều. Chủng TĐ16 có tốc độ sinh trưởng khá nhanh (282,16  $\mu\text{m}$ /giờ) và sinh các enzyme ngoại bào như laccase, lignin peroxidase, amylase, protease. Chủng TĐ16 được xếp vào loài *Trametes polyzona* và được đặt tên là *Trametes polyzona* TĐ16. Chủng TĐ16 cho hoạt tính laccase cao nhất, đạt 8,135 U/ml trên môi trường MT2 chứa 0,0625mM  $\text{CuSO}_4$  sau 7 ngày nuôi cấy ở 37°C và pH 5,0.

Từ khóa: *Trametes polyzona*, điều kiện nuôi cấy, định tên, ITS-rDNA, laccase.

### Study on Identification and Culture Condition for Biosynthesis of Laccase by *Trametes polyzona* TĐ16

### ABSTRACT

White-rot fungi are capable of degrading wood lignin by extracellular lignin modifying enzyme system, in which laccase plays an important role in ligninolysis and is widely used in some industries. This study was carried out with the objective of identifying the white rot fungus TD16 and selected suitable conditions for the biosynthesis of laccase to apply in the biopulping. The strain TD16 was studied for biological characteristics and sequence of the ITS - rDNA gene analyzed. The fruiting bodies have a scalloped shape and the edges are smooth. The upper surface of fruiting bodies is dark brown with concentric circular veins. The hymenium layer is white-brown and rough. On MEA medium, the colonies of TD16 fungal strain are fluffy, snow white, and evenly circular. The strain TD16 has a relatively fast growth rate and can produce extracellular enzymes. The strain TD16 was identified as *Trametes polyzona* and named as *Trametes polyzona* TD16. The optimal culture conditions for enhanced laccase biosynthesis were investigated. *Trametes polyzona* TD16 showed the highest laccase activity of upto 8.135 U/ml on MT2 medium containing 0.0625mM  $\text{CuSO}_4$  after 7 days of fermentation at 37°C and pH of 5.0.

Keywords: *Trametes polyzona*, cultivation condition, identification, ITS-rDNA, laccase.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Laccase (EC 1.10.3.2, p-benzenediol: oxy oxyreductase) thuộc họ oxydase chứa bốn nguyên tử đồng trong trung tâm xúc tác và xúc tác quá trình khử bốn điện tử của oxy thành

nước (Patel & cs., 2016). Laccase có thể oxy hóa cả các hợp chất phenol và không phải phenolic cũng như các hợp chất gây ô nhiễm môi trường khác, vì vậy chúng đã được sử dụng thành công trong tẩy trắng thuốc nhuộm dệt, khử trùng trong sản xuất giấy và bột giấy, khử độc cho

nhiều chất thải công nghiệp, xử lý đất và nước bị ô nhiễm, tẩy rửa sản xuất bột, biến đổi steroid và kháng sinh trong thiết kế cảm biến sinh học và công nghệ nano (Chen & cs., 2022). Laccase có trong thực vật, côn trùng và vi khuẩn, nhưng nguồn quan trọng nhất sinh tổng hợp enzyme này là nấm mục trắng. Có một số loại nấm mục trắng *Basidiomycetes* như *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes hirsuta*, *Theiophora terrestris*, *Lenzites betulina*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *T. gibbosa*, *T. Trogii*... có thể sinh tổng hợp laccase cao (Cardullo & cs., 2022; Naz & cs., 2022; Dong & cs., 2023). Chi *Trametes* Fr. (Polyporales, Basidiomycota) là một chi nấm được đặc trưng bởi quả thể dạng phiến, bào tầng có lỗ xốp, hệ sợi nấm hai loại (dimitic) và ba loại (trimitic) và các bào tử đảm nhẵn (Ryvarden, 1991). Có khoảng 50 loài nấm thuộc chi *Trametes* được phân bố rộng rãi, thường thấy trên nhiều loại cây gỗ cứng trong hầu hết các hệ sinh thái rừng (Kirk & cs., 2008; Justo & Hibbett, 2011). Chi nấm này có tiềm năng lớn đối với việc xử lý và phân hủy sinh học, đem lại giá trị cả về mặt sinh thái và kinh tế.

Việc phân lập và định danh nấm mục trắng sinh tổng hợp laccase, có vai trò quan trọng trong việc phát hiện và ứng dụng nấm và enzyme trong xử lý môi trường và công nghệ sinh học (Upadhyay & cs., 2016). Hoạt tính laccase thay đổi tùy theo loài và chủng nhưng phần lớn các chủng vi sinh vật được phân lập từ tự nhiên có hoạt tính laccase thấp, do đó sau khi sàng lọc chủng, cần tối ưu môi trường và các điều kiện nuôi cấy để nâng cao khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng (Yang & cs., 2017). Laccase là sản phẩm trao đổi chất của nấm mục trắng nên chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau, từ môi trường dinh dưỡng (nguồn cacbon, nitơ, chất cảm ứng) đến các thông số điều kiện như nhiệt độ, pH ban đầu của môi trường, tỷ lệ cung cấp oxy (độ thông khí) và thời gian nuôi cấy (Viswanath & cs., 2014).

Trong bài báo này, chúng tôi mô tả định danh chủng TĐ16 và lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp laccase từ chủng nấm này.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Chủng nấm TĐ16 được phân lập từ thân cây gỗ mục ở Vườn quốc gia Tam Đảo (Vĩnh Phúc) vào tháng 10 năm 2016, hiện đang được lưu giữ tại Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường cao malt (MEA) (g/l): cao malt 20; glucose 10; agar 20; pH 6,0 (Bardi & cs., 2022). Môi trường khoai tây (g/l): glucose 20; nước chiết khoai tây 1 lít; pH 6,0 (Egorov, 1976). Môi trường Hansen (g/l): glucose 20; trypton 10; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2; agar 20; pH 6,0 (Almeida & cs., 2005).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân loại TĐ16 bằng đặc điểm hình thái và phân tích trình tự vùng ITS-rDNA

Một số đặc điểm về hình thái như hình thái quả thể nấm (hình dáng, màu sắc của mặt trên quả thể, lớp bào tầng, cuống nấm), hình thái khuẩn lạc, hệ sợi nấm trên môi trường cao malt được đánh giá theo phương pháp của Trịnh Tam Kiệt (2011) và Schwantes & Saltler (1971).

DNA tổng số của chủng TĐ16 được tách chiết theo mô tả của Sambrook & Russell (2001). Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 để khuếch đại vùng gen ITS-rDNA (Gardes & Bruns, 1993), giải trình tự trên máy ABI PRISM 3100 và sử dụng phần mềm BioEdit để xử lý trình tự nhận được. So sánh độ tương đồng giữa gen vùng ITS-rDNA của chủng nấm TĐ16 với trình tự tương ứng của các chủng trong ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) bằng công cụ BLAST.

#### 2.2.2. Điều kiện nuôi cấy sinh tổng hợp laccase

Chủng TĐ16 lên men sinh tổng hợp laccase trong 5 môi trường sau: MT 1 (g/l): glucose 20; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5; CaCl<sub>2</sub> 0,37; ZnSO<sub>4</sub> 0,3; MgSO<sub>4</sub> 0,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1; cao nấm men 5 and pepton 2 (Cupul & cs., 2014), MT 2 (g/l): cao malt 2,0; glucose 2,0; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,26; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,26; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,0625mM;

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,006; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005 (Dhakar & cs., 2013), MT 3 (g/l): glucose 10; Soy-tone 6; ethanol 30ml, CuSO<sub>4</sub> 350μM (Dhouib & cs., 2005), MT 4 (g/l): Bột gạo 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,2; cao nấm men 0,1; CaCl<sub>2</sub> 0,01, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,001; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001 và MnSO<sub>4</sub> 0,001 (Chawachart & cs., 2003), MT 5 (g/l): Glycerol 15; pepton 3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,125; cao nấm men 4 (Kenkebaschivilli & cs., 2012) trong khoảng từ 25 đến 42°C với pH ban đầu từ 3 đến 8. Bình nón thủy tinh dung tích 250ml chứa 50ml môi trường sau khi được khử trùng ở 121°C trong 20 phút, làm nguội đến nhiệt độ phòng, được cấy 3 khoanh nấm (đường kính 6mm) lấy từ đĩa môi trường thạch có chủng TĐ16 đã nuôi cấy 4 ngày. Trong tất cả các thí nghiệm, các bình nuôi cấy được thực hiện trên máy lắc tròn với tốc độ 150 vòng/phút trong 7 ngày.

Hoạt lực của laccase được xác định theo phương pháp của Brakova & cs. (2016) bằng cách sử dụng 0,216mM syringaldazine (tan trong metanol) làm cơ chất ở 37°C. Hỗn hợp phản ứng bao gồm dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH 4,5), dung dịch cơ chất và dung dịch enzyme. Quá trình oxy hóa cơ chất của enzyme tạo sản phẩm có màu hồng, hấp thụ cực đại ở bước sóng 530nm trên máy quang phổ Spectro Sc. (Labomed, inc.). Một đơn vị hoạt độ laccase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết xúc tác chuyển hóa cơ chất syringaldazine, làm thay đổi 0,01 đơn vị giá trị đo mật độ quang (OD) trong một phút ở điều kiện phản ứng.

#### 2.2.4. Phân tích thống kê

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần. Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai (ANOVA) kết hợp xác định sự khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa giữa các nhóm (Least significant difference - LSD) ở mức ý nghĩa P < 0,05 trên phần mềm Excel.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đặc điểm sinh học của chủng TĐ16

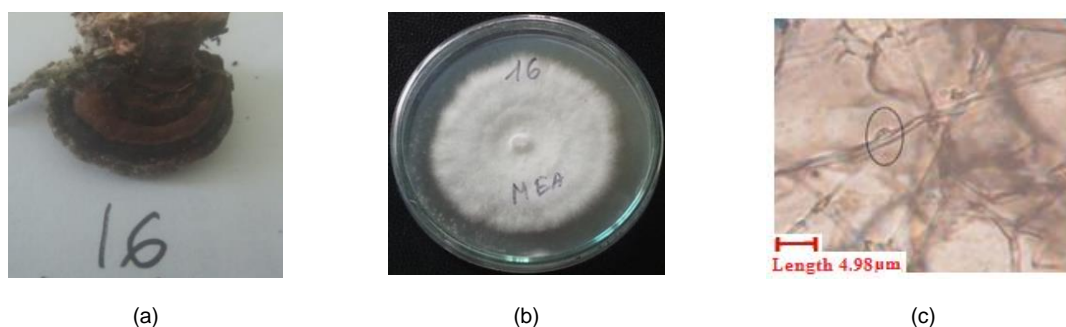
Quả thể của chủng nấm TĐ16 có dạng vỏ sò mọc sát vào giá thể. Mặt trên của quả thể có màu

nâu đậm với các vân tròn đồng tâm, mép quả thể trơn. Kích thước của quả thể: 17 × 27mm, độ dày 3-12mm. Lớp bào tầng có màu nâu hơi trắng, sần sùi. Cuống quả thể ngắn, bám chắc vào cây. Thịt nấm khá cứng (Hình 1a). Chủng TĐ16 có thể sinh trưởng tốt trên nhiều môi trường như cao malt (MEA), Hansen và nước chiết khoai tây với tốc độ ăn lan của sợi nấm khoảng 282,16 μm/giờ. Khuẩn lạc nấm có màu trắng tuyết, sợi nấm dài, mảnh phân nhánh nhiều, bông xốp tạo vòng tròn trên bề mặt khuẩn lạc (Hình 1b). Nhiều sợi nấm trong hệ sợi có khóa (cầu nối - clamp connection) (Hình 1c). Cầu nối này là cơ quan đặc trưng cho ngành phụ nấm đảm Basidiomycotina, được hình thành giữa hai nhân khác tính trong quá trình phân chia của khuẩn ty bậc hai (Hood, 2006).

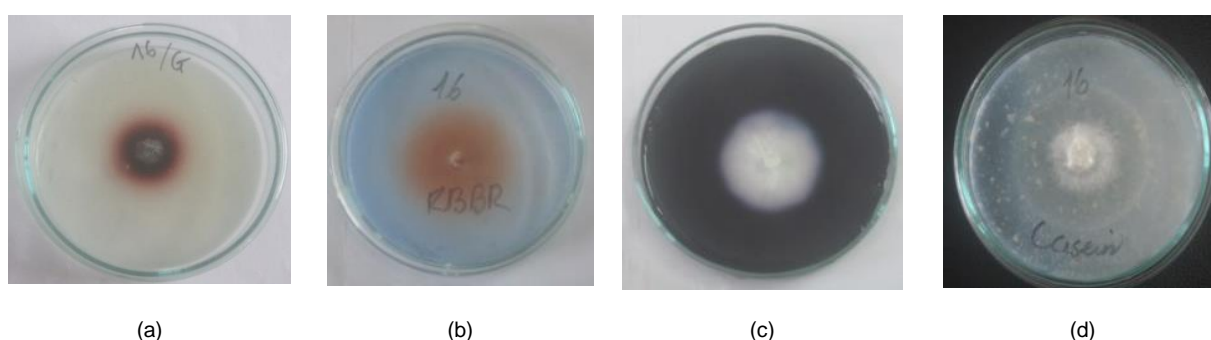
Chủng nấm TĐ16 có khả năng sinh nhiều enzyme ngoại bào như laccase phân huỷ Guaiacol (φ vòng phân giải = 12mm) (Hình 2a), lignin peroxidase phân huỷ Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (φ vòng phân giải = 27mm) (Hình 2b), amylase phân huỷ tinh bột (φ vòng phân giải = 22mm) (Hình 2c), protease phân huỷ casein (φ vòng phân giải = 30mm) (Hình 2d), giúp nấm thích nghi sinh trưởng trong nhiều môi trường cơ chất. Bên cạnh đó, chủng TĐ16 sinh trưởng tốt trong điều kiện nhiệt độ khá mát, 25-30°C và trong môi trường có pH từ axit nhẹ đến trung tính (pH 4-7).

#### 3.2. Phân tích trình tự vùng ITS-rDNA của nấm TĐ16

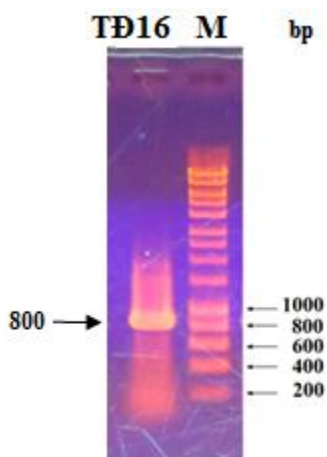
Vùng ITS-rDNA được lồng vào bên trong đoạn lặp rDNA, có thể cho phép định danh các loài nấm mà ngay cả hệ thống phân loại trước đó không thể làm được (Jebapriya & cs., 2014). Tiến hành điện di kiểm tra sản phẩm của phản ứng PCR khuếch đại vùng gen ITS-rDNA của chủng TĐ16 xuất hiện một băng duy nhất có kích thước khoảng 800bp (Hình 3). Phân tích trình tự gen nhận được bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy: gen vùng ITS-rDNA của chủng TĐ16 tương đồng cao (99%) với gen ITS-rDNA của chủng *Trametes polyzona* BPSM12 (KJ865842) (Hình 4). Kết hợp với các đặc điểm sinh học, chủng TĐ16 có thể xác định thuộc loài *Trametes polyzona* và đặt tên chủng TĐ16 là *Trametes polyzona* TĐ16.



Hình 1. Nấm TĐ16: Trong tự nhiên (a); Trên môi trường MEA: Khuẩn lạc (b) và hệ sợi nấm với khóa (khoanh tròn) (c)



Hình 2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng nấm TĐ16 (a: Laccase; b: Lignin peroxidase; c: Amylase; d: Protease)



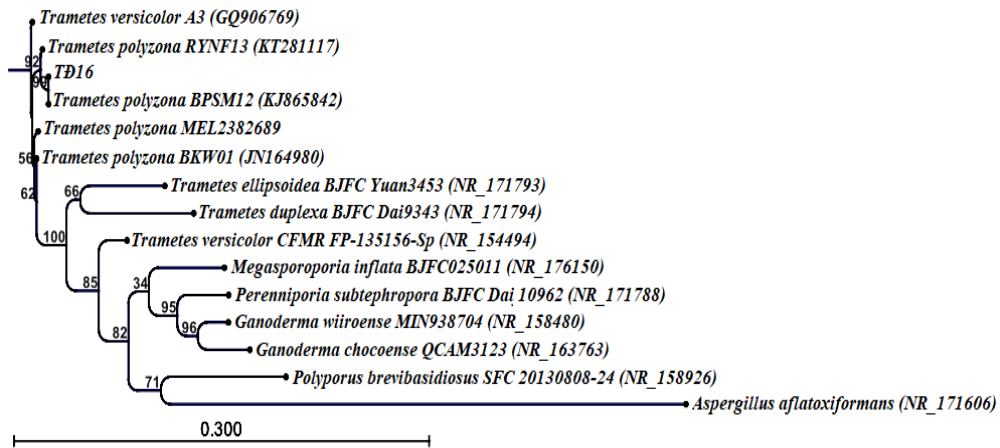
Ghi chú: M: Thang DNA chuẩn; TĐ16: Sản phẩm PCR của chủng TĐ16.

Hình 3. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen ITS-rDNA của chủng TĐ16

### 3.3. Lựa chọn môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh laccase của *Trametes polyzona* TĐ16

Các môi trường lên men ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến khả năng sinh laccase của

chủng *T. polyzona* TĐ16 (Hình 5). Sau 168 giờ lên men, ngoại trừ môi trường MT5 cho hoạt tính laccase khá thấp (khoảng 4 U/ml), 4 môi trường còn lại đều giúp chủng nấm TĐ16 sinh laccase tốt (đạt hơn 5,0 U/ml), trong đó hoạt độ laccase đạt cao nhất trên môi trường MT2 (7,552 U/ml).



**Hình 4. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng TĐ16 với các loài nấm mục trắng họ hàng gần**

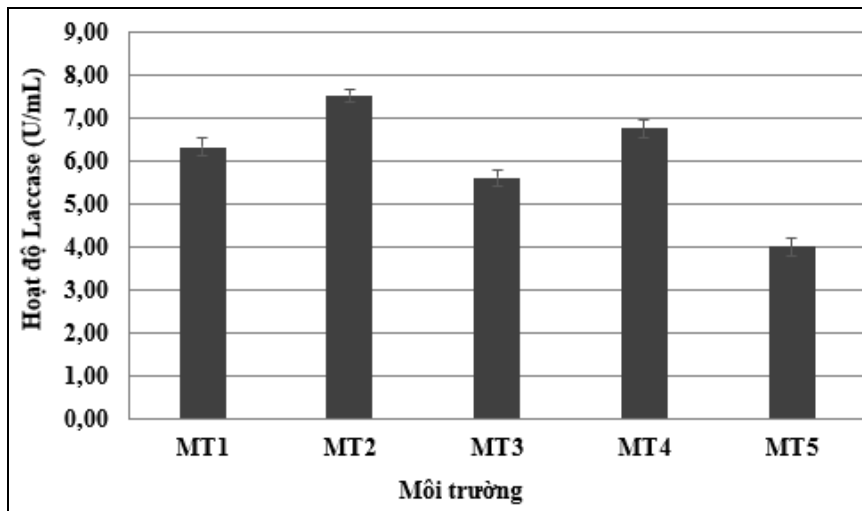
Độ pH của môi trường nuôi cấy có vai trò quan trọng trong việc sản xuất enzyme của vi sinh vật. Đa số các báo cáo chỉ ra mức độ pH ban đầu được đặt trong khoảng từ pH 4 đến 6 trước khi cấy, nhưng pH không được kiểm soát trong phần lớn các quá trình lên men (Naz & cs., 2022).

Hoạt lực laccase của chủng nấm *T. polyzona* TĐ16 ở các pH ban đầu là khác nhau có ý nghĩa thống kê. pH ban đầu của môi trường từ 5-6 là phù hợp để chủng TĐ16 sinh laccase và đạt hoạt độ cao nhất (7,898 U/ml) sau 168 giờ lên men trong môi trường MT2 với pH ban đầu 5,0 (Hình 6), cao hơn có ý nghĩa thống kê so với hoạt độ laccase được sinh ra trong môi trường có pH khác. Một số tác giả khác cũng cho rằng nấm mục trắng (*Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Corioloopsis gallica*, and *Pleurotus ostreatus*) sinh trưởng và sinh tổng hợp laccase tối ưu đều trong điều kiện pH từ 5,0 đến 6,0 (Kenkebashvilli & cs., 2012; Wakil & cs., 2017; Sayyed & cs., 2020).

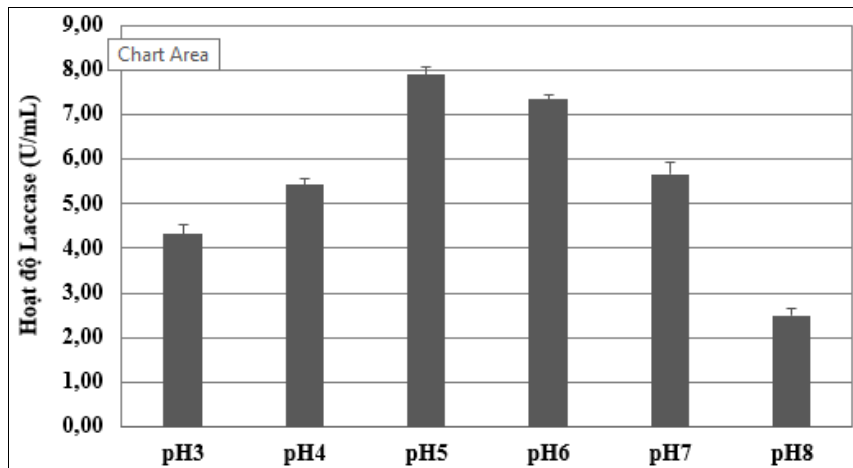
Chủng nấm *T. polyzona* TĐ16 sinh trưởng tốt trong dải nhiệt độ từ 25 đến 30°C, nhưng nhiệt độ tối ưu cho lên men sinh laccase lại cao hơn một chút. Sau 168 giờ lên men, hoạt độ laccase cao nhất (8,135 U/ml) đạt được ở 37°C (Hình 7), cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các nhiệt độ nuôi cấy khác. Nhiệt độ nuôi cấy cao hơn (42°C) không phù hợp cho việc sinh tổng hợp laccase, vì hoạt tính enzyme ở 42°C khá thấp, giảm khoảng 27% so với nhiệt độ 37°C.

Theo nghiên cứu của Strong (2011) và Dhakar & Pandey (2013), hoạt độ laccase của *Trametes pubescens* MB89 và *T. hirsuta* MTCC 11397 đạt được cao nhất ở nhiệt độ 28°C, trong khi nhiệt độ tối ưu cho *T. versicolor* sinh laccase là 35°C sau 6 ngày và pH 5,0 (Snajdr & Baldrian, 2007), *T. trogii* LK13 sinh tổng hợp laccase tốt nhất ở 37°C (Yan & cs., 2015). Qua đó có thể thấy nhiệt độ tối ưu cho sinh tổng hợp laccase của các loài nấm thuộc chi *Trametes* là tương đối khác nhau.

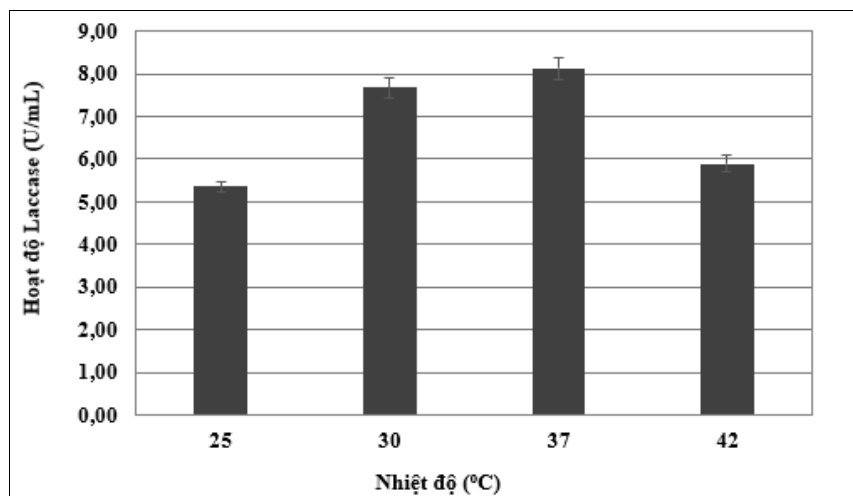
Nhiều loài nấm mục trắng trong môi trường lên men cần được bổ sung  $\text{Cu}^{2+}$  làm chất cảm ứng chính, kích thích sinh tổng hợp laccase như *Trametes versicolor*, *Neurospora crassa*, *Pleurotus sajor-caju*, *Panus osteratus* (Soden & Dobson, 2001), *Trametes trogii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes* (Cavallazzi, & cs., 2005), *Paecilomyces* sp. WSH-L07, *Pleurotus florida* NCIM 1243 (Palvannan & Sathishkumar, 2010), *Shiraia bambusicola* GZ11K2 (Du & cs., 2012) *T. hirsuta* (Dhakar & Pandey, 2013). Môi trường MT2 chứa  $\text{CuSO}_4$  thường được sử dụng cho sinh tổng hợp laccase từ nấm mục trắng nhưng với nồng độ  $\text{CuSO}_4$  được bổ sung vào khác nhau (0,1-2mM) (Shraddha, 2011). Vì vậy, cần tiếp tục nghiên cứu lựa chọn nồng độ  $\text{CuSO}_4$  và thời điểm bổ sung thích hợp để nâng cao hơn nữa khả năng sinh tổng hợp laccase của *T. polyzona* TĐ16.



Hình 5. Hoạt độ laccase của chủng *T. polyzona* TĐ16 trong các môi trường lên men



Hình 6. Khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *T. polyzona* TĐ16 ở pH ban đầu khác nhau



Hình 7. Khả năng sinh tổng hợp laccase của chủng *T. polyzona* TĐ16 ở các nhiệt độ

#### 4. KẾT LUẬN

Chủng nấm TĐ16 được phân lập từ Vườn quốc gia Tam Đảo có hoạt tính laccase cao. Khuẩn lạc nấm màu trắng tuyết, sợi nấm dài, mảnh, bông xốp, Chủng có tốc độ sinh trưởng khá nhanh và sinh enzyme ngoại bào tốt. Nấm TĐ16 sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 25-30°C, pH 4-7. Chủng nấm TĐ16 thuộc loài *Trametes polyzona* và được đặt tên là *Trametes polyzona* TĐ16. Khi nuôi cấy trên máy lắc sử dụng môi trường MT2 (g/l): cao malt 2,0; glucose 2,0; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,26; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,26; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,01; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,006; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005 ở pH ban đầu 5,0 và nhiệt độ 37°C, chủng nấm *T. polyzona* TĐ16 sinh laccase cao nhất (8,135 U/ml) sau 168 giờ. Cần có nghiên cứu sâu hơn về chất cảm ứng sinh tổng hợp laccase, tinh chế, xác định cấu trúc laccase và thử nghiệm ứng dụng enzyme.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài ĐT.05.18/CNSHCB thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020 của Bộ Công thương.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Almeida A.C.S., Araujo L.C., Costa A.M., Abreu C.A.M., Lima M.A.G.A. & Pahla M.L.A.P.F.P. (2005). Sucrose Hydrolysis Catalyzed by Auto-immobilized Invertase into Intact Cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8(1): 54-62.
- Bardi A., Ciummei Y., Spennati F., Moga I.C., Di Gregorio S., Petroni G., Munz G. (2022). Comparing carriers as a support media of white-rot fungi in natural tannins removal. *Environmental Advances*. 9: 100311.
- Brazkova M., Mercati A., Hristova I., Lante A. & Krastanov A. (2016). Isolation, Purification and Characterization of Laccase from the White-rot Fungus *Trametes versicolor*. *Scientific works of university of food technologies*. 63(1): 155-162.
- Cardullo N., Muccilli V. & Tringali C. (2022). Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues, *RSC Chemical Biology*. 3: 614-647.
- Cavallazzi J.R.P., Kasuya C.M. & Soares M.A. (2005). Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36(4): 383-387.
- Chawachart N., Khanongnuch C., Watanabe T. & Lumyong S. (2003). Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3, *Fungal Diversity*. pp. 23-32.
- Chen Z., Oh W.D. & Yap P.S. (2022). Recent advances in the utilization of immobilized laccase for the degradation of phenolic compounds in aqueous solutions: A review. *Chemosphere*. 307(3): 135824.
- Cupul W.C., Abarca G.H., Carrera D.M. & Vázquez R.R. (2014). Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima*-*Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett-Burman experimental design. *Electronic Journal Biotechnology*. (17): 114-121.
- Dhakar K. & Pandey A. (2013). Laccase Production from a Temperature and pH Tolerant Fungal Strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). *Enzyme Research*. 9p.
- Dhouib A., Hamza M., Zouari H., Mechichi T., H'midi R., Labat M., Martínez M.J. & Sayadi S. (2005). Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. *African Journal of Biotechnology*. 4(5): 431-436.
- Dong C.D., Tiwari A., Anisha G.S., Chen C.W., Singh A., Haldar D., Patel A.K. & Singhania R.R. (2023). Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation, *Environmental Pollution*. 319.
- Du W., Sun C. & Yu J. (2012). Effect of synergistic inducement on the production of laccase by a novel *Shiraia bambusicola* strain GZ11K2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 168(8): 2376-2386.
- Egorov N.X. (1976). *Thực tập vi sinh vật học* (Nguyễn Lâm Dũng dịch). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Gardes M. & Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. (2): 113-118.
- Hood I.A. (2006). The mycology of the Basidiomycetes. *Proceedings of a workshop held in Yogyakarta, Indonesia, Canberra, ACIAR Proceedings*. (124): 34-45.
- Jebapriya G.R. & Gnanadoss J.J. (2014). Screening and molecular characterization of white rot fungi capable of laccase production and dye decolourization. *International Journal of Life Science & Pharma research*. 4(2): 12-20.

- Justo A. & Hibbett D.S. (2011). Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon*. 60(6): 1567-1583.
- Kenkebashvili N., Elisashvili V. & Wasser S.P. (2012). Effect of Carbon, Nitrogen Sources, and Copper Concentration on the Ligninolytic Enzyme Production by *Corioloropsis gallica*. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology*. 1(2): 22-27.
- Kirk PM., Cannon PF., Minter DW. & Stalpers JA. (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). Wallingford, UK: CAB International. p. 695.
- Naz S., Gupta S. & Chatterjee T. (2022). A Review: Optimization of Fungal Laccase Production and their Potential Application in Effluents Treatment. *Journal of Scientific Research*. 66(1): 86-102.
- Palvannan T. & Sathishkumar P. (2010). Production of laccase from *Pleurotus florida* NCIM 1243 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Journal of Basic Microbiology*. 50(4): 325-335.
- Patel H. & Gupte A., (2016). Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP. *Bioresources and Bioprocessing*. 3: 11.
- Ryvarden L. (1991). *Genera of polypores: Nomenclature and taxonomy*. Synopsis Fungorum 5. Oslo: Fungiflora.
- Sambrook J. & Russell D.W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sayyed R.Z., Bhamare H.M., Marraiki, N., Elgorban A.M. Syed, A. Ali, H. & Enshasy E. (2020). Tree bark scrape fungus: A potential source of laccase for application in bioremediation of non-textile dyes, *PLOS ONE*. 15(6): 1-17.
- Schwantes H.O. & Salttler P.W. (1971). Methoden zur messung der Wachstumsgeschwindigkeit von Pilzmycelien. *Oberhess Naturwiss Zeitschr*. 38: 5-18.
- Shraddha S., Shekher R., Sehgal S., Kamthania M. & Kumar A. (2011). Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*. p. 217861.
- Snajdr J. & Baldrian P. (2007). Temperature affects the production, activity, and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Folia Microbiologica (Praha)*. 52(5): 498-502.
- Soden D.M. & Dobson A.D.W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*. 147(7): 1755-1763.
- Strong P.J. (2011). Improved Laccase Production by *Trametes pubescens* MB89 in Distillery Wastewaters. *Enzyme Research*. 2011: 1-8.
- Trịnh Tam Kiệt (2011). *Nấm lớn ở Việt Nam (Tập 1 (tái bản lần thứ 2))*. Nhà xuất bản. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
- Upadhyay P., Shrivastava R. & Agrawal P.K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*. 6: 15.
- Viswanath B., Rajesh A., Janardhan, Kumar A.P. & Narasimha G. (2014). *Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation*, *Enzyme Research*. 21p.
- Wakil S.M., Adebayo-Tayo B.C., Odeniyi O.A., Salawu. K, Eyiolawi S. & Onilude A.A. (2017). Production, Characterization, and Purification of Laccase by Yeasts Isolated from Ligninolytic Soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 11(2): 847-869.
- Yan J., Chen Y., Niu J., Chen D., Chagan I. (2015). Laccase produced by a thermotolerant strain of *Trametes trogii* LK13, *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(1): 59-65.
- Yang J., Li W., Bun N.T., Deng X., Lin J. & Ye X. (2017) Review: Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation, *Frontiers in Microbiology*. 8(832): 1-24.