

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA ENZYME LACCASE TÁCH CHIẾT TỪ MÙN TRỒNG NẤM SÒ *Pleurotus sajor caju*

Đến tòa soạn 08-08-2022

Nguyễn Thị Tâm Thư*, Nguyễn Lâm Anh, Phạm Kiên Cường, Nguyễn Văn Hoàng

Viện Công nghệ mới/Viện KH-CN quân sự

Email: thu.n3t.cnm@gmail.com

SUMMARY

CHARACTERISTICS OF LACCASE ENZYME EXTRACTED FROM *Pleurotus sajor caju*

Extracellular enzymes such as ligninperoxidase (LiP), manganperoxidase (MnP), laccase have been shown to be capable of degrading and metabolizing persistent aromatic organic compounds such as dichlorophenol (DCP), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), dyes and dioxins. These enzymes can be produced by bacteria, actinomycetes or fungi, in which white rot fungi and fungi that are able to grow on lignin substrates produce these enzymes the most. *Pleurotus oyster* mushrooms are capable of producing the enzyme laccase with high activity and have also been shown to catalyze the degradation of dioxin isomers. In this study, some results are presented on the extraction and purification of laccase enzyme from mushroom growing humus and some characteristics of this laccase enzyme. The results showed that the laccase enzyme activity was highest at the stage of the bag is white by fungus and reached 108 U/g. The obtained laccase enzyme has a size of about 60 KDa, has a thermal stability of 30°C in 7h, the optimum temperature for the reaction is 30°C, the optimal pH is pH5 and has a stability of pH is 5 for 7h. Enzymes have an alpha helix structure, with 4 copper atoms in the molecule. This study result showed that crude enzyme was capable of degrading up to 44,79% of total toxicity of dioxin with initial concentration of 9623 pg/ml.

Keyword: Enzyme, laccase, degrade, dioxin, *Pleurotus*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Enzyme ngoại bào có khả năng phân hủy lignin như Ligninperoxidase (LiP), Manganperoxidase (MnP) và laccase là các enzyme oxidoreductase và peroxidase có phổ hoạt động cơ chất rộng nên được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực khác nhau trong đó có xử lý ô nhiễm môi trường (Patel, 2014, Rueda 2020, Ezike, 2020). Do đặc điểm của phản ứng enzyme cơ chất, tỷ lệ cơ chất cao sẽ làm cho phản ứng xảy ra nhanh hơn nên enzyme được ứng dụng để xử lý các chất ô nhiễm với nồng độ cao (nồng độ chất ô nhiễm cao có thể ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật nhưng

không ức chế phản ứng enzyme tới một nồng độ nhất định).

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu sử dụng các enzyme ngoại bào từ vi sinh vật để xử lý các chất ô nhiễm như loại màu thuốc nhuộm, phân hủy dioxin (Phùng Khắc Huy Chú 2018, Đặng Thị Cẩm Hà, 2012, Lallawmsanga, 2019), xử lý bisphenol A (Rampinelli, 2021). Enzyme ngoại bào như laccase, tương tự laccase (laccase-like) từ xạ khuẩn, nấm đảm đã được chứng minh là có khả năng loại màu thuốc nhuộm, phân hủy các hợp chất đa vòng thơm chứa và không chứa clo (Phùng Khắc Huy Chú 2018, Đặng Thị Cẩm Hà, 2012, Mahmood

2018). Nấm sò *Pleurotus pulmonarius* cũng đã được sử dụng để xử lý các chất ô nhiễm PCDD/F (Kaewlaoyoong, 2020).

Nấm sò *Pleurotus sajor caju* là một nấm sò có nguồn gốc từ Nhật Bản có hàm lượng dinh dưỡng cao. Hiện nay, nấm sò đã được trồng phổ biến ở một số nơi để cung cấp nguồn thực phẩm cho người dân. Tuy nhiên, một lượng lớn mùn trồng nấm sau khi thu hoạch vẫn còn lượng dinh dưỡng cao, hàm lượng mùn cao có thể sử dụng làm phân bón sinh học, cung cấp thêm mùn cho các vùng đất cần, ít dinh dưỡng (Đình Cát Điền, 2016). Trong mùn trồng nấm cũng chứa một lượng lớn các enzyme ngoại bào do nấm sò sinh ra nhằm chuyển hóa các cơ chất lignin trong mùn thành chất dinh dưỡng cho sự phát triển (Trần Thị Thu Hoàng, 2013). Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu về đặc điểm của các enzyme này và khả năng ứng dụng của chúng trong xử lý các chất ô nhiễm như dioxin (Kaewlaoyoong, 2019). Do đó, mục đích của nghiên cứu này là tách chiết enzyme laccase từ nấm sò và đánh giá đặc điểm của enzyme cũng như tác dụng phân hủy và chuyển hóa các hợp chất ô nhiễm chứa clo như dioxin.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mùn trồng nấm sò *Pleurotus sajor caju* được lấy từ Học viện Nông nghiệp VN, ở các giai đoạn phát triển khác nhau.

Các hóa chất như ABTS (Biobasic), các hóa chất khác để tách chiết enzyme đảm bảo độ tinh khiết PA. Gel SDS-PAGE của Biorad.

Dịch chiết đất được tách chiết từ đất có tổng độ độc khoảng 153.474 pg/ml.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Xác định hoạt tính enzyme laccase

Hoạt tính enzyme laccase được xác định bằng cách đo sự oxy hóa ABTS. Sự tăng độ hấp phụ trong 2 phút được đo bằng máy quang phổ UV-Vis ở 420nm. Hỗn hợp phản ứng chứa 600 µl đệm natri acetate (20 mM, pH 4), 200 µl dịch enzyme và 200 µl ABTS 5 mM. Một đơn vị hoạt tính enzyme được định nghĩa là một lượng enzyme phản ứng với mỗi µM cơ chất trong mỗi phút ở nhiệt độ phòng.

2.2.2. Tinh sạch enzyme

Dịch enzyme thô sau ly tâm được lọc bằng màng lọc tiếp tuyến qua màng 0,2 µm để loại bỏ phần cặn thô phía trên, phần dịch lọc được cô đặc bằng màng 10 KDa. Sau đó dịch enzyme được tinh sạch dựa trên gradient NaCl ((Xiao, 2004; Patel, 2014). Dịch tinh sạch ở các phân đoạn được xác định hoạt tính enzyme để xem phân đoạn nào có hoạt tính cao nhất. Các phân đoạn có hoạt tính cao được sử dụng để chạy SDS-page kiểm tra độ tinh sạch của các phân đoạn. Kiểm tra nồng độ protein trên máy nanodrop.

2.2.3. Xác định độ tinh sạch của enzyme bằng SDS Page

Các phân đoạn được kiểm tra độ tinh sạch bằng chạy SDS-PAGE với bản gel Tris/Glycine của BioRad với đệm Tris/Glycine/SDS. Sau khi điện di 130V trong 60 phút, bản gel được lấy ra soi dưới tia UV để kiểm tra độ tinh sạch của enzyme (Nguyễn Thị Mai Phương, 2012, Camassola, 2013).

2.2.4. Đánh giá một số tính chất của enzyme laccase

- Xác định pH tối ưu và độ bền pH: dịch enzyme tinh sạch được ủ với cơ chất ABTS pha trong dải đệm có pH từ 2 đến 6, bao gồm đệm: glycine-HCl với pH từ 2-3; sodium acetate với pH từ 4-5 và potassium phosphate với pH từ 6-7. Để đánh giá độ bền pH, laccase được ủ với các đệm có pH thay đổi từ 2-7 trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ phòng (khoảng 25°C), xác định hoạt tính enzyme còn lại để tìm ra pH tối ưu và độ bền pH của enzyme (Phùng Khắc Huy Chú, 2018, Nguyễn Thị Phương Mai, 2012).

- Xác định nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt: hỗn hợp phản ứng bao gồm dịch enzyme, cơ chất ABTS, đệm pH thích hợp được ủ ở các nhiệt độ khác nhau trong khoảng từ 30 - 90°C để tìm nhiệt độ phản ứng thích hợp. Để xác định độ bền nhiệt, enzyme đã tinh sạch được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 90°C, sau các khoảng thời gian từ 1-7 giờ. Xác định hoạt tính còn lại của enzyme để tìm ra nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của enzyme (Patel, 2014; Phùng Khắc Huy Chú, 2018).

- Xác định nhiệt độ biến tính của enzyme (Tm): Nhiệt độ biến tính được xác định trên máy CD Spectrometer (Viện INRS – Canada) khi nâng dần nhiệt độ từ 20 – 90°C và xác định sự thay đổi cấu trúc bậc 2 của enzyme (do sự biến tính duỗi xoắn của cấu trúc enzyme). Nhiệt độ biến tính được tính tự động trên máy.

- Động học enzyme: Dịch enzyme tinh sạch được cho phản ứng với cơ chất ABTS có nồng độ khác nhau: 1; 1,5; 2; 2,5; 3, 5 và 5 mM. Ứng với mỗi nồng độ cơ chất được khảo sát ở thời gian 2 phút, phản ứng được thực hiện ở 30°C, pH5, xác định hoạt tính laccase. Ở mỗi nồng độ cơ chất chọn giá trị hoạt tính cao nhất làm giá trị V. Từ đó dùng phần mềm Excel để vẽ đồ thị Lineweaver-Burk theo nồng độ cơ chất [S] và giá trị hoạt tính V tương ứng. Từ đó xác định được Km và Vmax (Patel, 2014; Phùng Khắc Huy Chú, 2018, Nguyễn Thị Mai Phương, 2012).

2.2.5. Xác định cấu trúc phân tử laccase

- Cấu trúc bậc 2 của enzyme được quan sát trên máy CD Spectrometer (Jasco J815) với bước sóng từ 250 – 200 nm với đối chứng là đệm phosphate pH6.

Số nguyên tử đồng trong phân tử laccase được xác định bằng thiết bị ICP-MS tại Viện INRS (Canada) và tính toán dựa vào kích thước của laccase, nồng độ protein của dịch enzyme gửi đi phân tích.

2.2.6. Đánh giá khả năng phân hủy/chuyển hóa dioxin của dịch chiết enzyme thô

Dịch chiết enzyme thô được dùng để đánh giá khả năng phân hủy các đồng phân của dioxin trong dịch chiết đất. 50 ml dịch chiết enzyme thô được bổ sung vào bình đựng dịch chiết đất đã làm khô dung môi để có nồng độ khoảng 9000 pg/ml. Mẫu đối chứng bổ sung dịch chiết đất và 50 ml nước đã khử trùng. Lắc để phản ứng ở 30°C trong 20 ngày, sau đó xác định hàm lượng các đồng phân dioxin còn lại trong mẫu bằng thiết bị sắc ký Agilent 7890A ghép khối phổ tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tinh sạch enzyme laccase

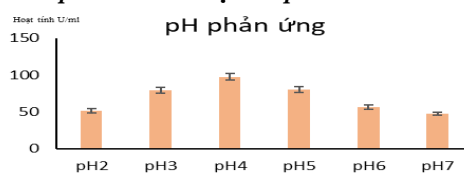
Sau khi tinh sạch enzyme laccase từ mùn trồng nấm bằng kết hợp phương pháp tinh sạch trao

đổi ion và lọc gel, enzyme tinh sạch được xác định độ tinh sạch và kích thước phân tử bằng cách điện di SDS page. Một số tính chất như động học enzyme với cơ chất ABTS, độ bền pH và độ bền nhiệt độ của laccase tinh sạch cũng được xác định.

Kết quả sau tinh sạch cho thấy mẫu enzyme tinh sạch sau 2 lần có kích thước khoảng 60KDa, tương đương với kích thước của một số loại laccase đã được công bố (Patel, 2014, Ezike 2020).

3.2. Một số tính chất của enzyme laccase

3.2.1. pH tối ưu và độ bền pH của laccase

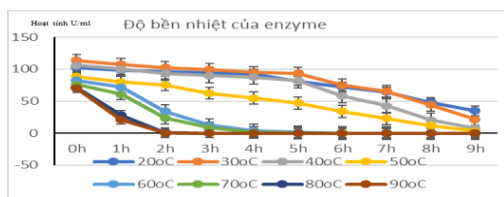


Hình 1. pH tối ưu của laccase tách chiết từ nấm *Pleurotus sajor caju*

Trong nghiên cứu này, laccase có hoạt tính cao nhất ở pH 4, đạt 98 U/ml đệm (Hình 1). Ở pH 3 và 5, hoạt tính enzyme tương đương nhau, khoảng 80 U/ml và cao hơn hẳn so với hoạt tính ở các pH 2, 6,7 nên pH tối ưu cho hoạt động của enzyme là pH 4. So sánh các giá trị pH tối ưu cho hoạt tính enzyme laccase từ các nghiên cứu khác cho thấy laccase sinh ra từ nấm *Pleurotus sajor caju* có giá trị pH tối ưu là 3,0 – 4,0 (Sahay 2008, Bettin 2011, Rampinell 2021), từ nấm sò *Pleurotus ostreatus* có giá trị pH tối ưu từ 3,0 – 4,5 (Rampinell 2021).

Đối với nghiên cứu đánh giá độ bền pH của laccase cũng cho thấy enzyme laccase tách chiết từ *Pleurotus sajor caju* trong nghiên cứu này có độ bền trong 5 giờ và ở pH 4 có hoạt tính cao nhất. Sau 5 giờ ở pH4, hoạt độ enzyme giảm mạnh. Ở các pH khác, hoạt độ enzyme thấp hơn và cũng giảm dần theo thời gian. Đến thời điểm 9 giờ, hoạt tính enzyme gần như không còn ở tất cả các pH. Do đó, có thể khẳng định pH 4 là pH tối ưu cho phản ứng của enzyme laccase và ABTS và enzyme có thể bền trong pH này trong 5 giờ trong thí nghiệm này.

3.2.2. Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của enzyme

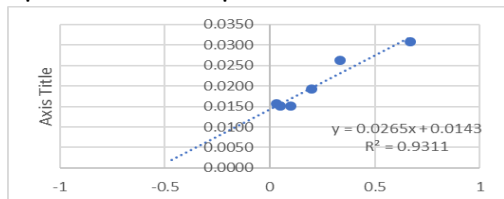


Hình 2. Độ bền nhiệt của enzyme trong các khoảng thời gian khác nhau

Trong nghiên cứu này, enzyme laccase có nhiệt độ hoạt động tối ưu là 20 – 40°C và bền nhiệt trong 6 giờ ở khoảng nhiệt độ này. Sau 7 giờ, hoạt tính laccase giảm mạnh. Ở nhiệt độ 20°C, hoạt tính laccase tương đương với ở 30°C nhưng độ bền nhiệt được lâu hơn, đến 9 giờ vẫn còn 20%. Ở nhiệt độ 50°C, hoạt tính giảm dần sau 2 giờ và mất hẳn hoạt tính sau 9 giờ. Ở nhiệt độ 60 - 70°C trở lên, hoạt tính giảm sau 1 giờ và mất hoàn toàn hoạt tính ở giờ thứ 4 trong khi ở nhiệt độ 80, 90°C, hoạt tính enzyme mất hoàn toàn sau 2 giờ (Hình 2).

Động học enzyme

Dựa vào các nồng độ cơ chất phản ứng với enzyme, ta tính được giá trị $K_m = 1,06 \text{ mM}$ và $V_{max} = 76,33 \text{ mM/phút}$. Theo nghiên cứu của Phùng Khắc Huy Chú, giá trị K_m của laccase từ chủng *Sporothrix carnis* CPF-05 là $0,0316 \text{ mM}$ và tốc độ phản ứng là $7,94 \text{ mM/phút}$. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai Phương (2012), giá trị K_m của laccase tái tổ hợp đối với ABTS là $1,35 \mu\text{M}$, nhỏ hơn nhiều lần giá trị K_m của laccase tự nhiên.

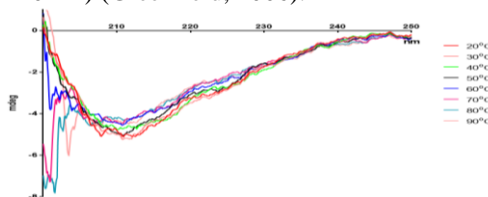


Hình 3. Xác định giá trị K_m và V_{max} của laccase đối với cơ chất ABTS

Theo nghiên cứu của Rampinelli (2021), giá trị K_m của enzyme laccase của nấm *Pleurotus sajor caju* là $0,1 \text{ mM}$ và giá trị V_{max} là $1,25 \text{ mM/phút}$. Một số nấm sò khác sinh laccase với giá trị K_m từ $0,014 - 0,607 \text{ mM}$ và V_{max} đạt $0,00033 - 1,25 \text{ mM/phút}$ (với cơ chất ABTS). Giá trị K_m trong nghiên cứu này là phù hợp so với một số nghiên cứu khác. Tuy nhiên, đây là enzyme tự nhiên từ nấm nên giá trị K_m cao hơn so với K_m của enzyme tái tổ hợp. Theo Nguyễn Thị Phương Mai (2012), sau khi tái tổ hợp enzyme, nồng độ enzyme tăng lên và ái lực liên kết của enzyme với cơ chất cũng tăng lên nhiều lần.

Cấu trúc của enzyme laccase

Kết quả quan sát trên hệ thống CD cho thấy mẫu chỉ có 1 pic ở bước sóng 210 nm với khoảng -5 mdeg cho thấy băng này sạch trên 95% và mẫu protein có cả cấu trúc xoắn alpha. Kết quả quan sát trên máy quang phổ lưỡng sắc tròn (Circular Dichroism – CD spectrometer) cho thấy protein thu được có cấu trúc xoắn α -helix (với đỉnh nằm ở bước sóng 210 nm) (Greenfield, 2006).



Hình 4. Hình ảnh quan sát cấu trúc của protein trên máy CD spectrometer ở các nhiệt độ

Hình ảnh phổ CD (Hình 4) cũng cho thấy enzyme laccase chưa bị duỗi xoắn hoàn toàn (không xác định được T_m) khi nâng dần nhiệt độ đến 90°C. Tuy nhiên, nghiên cứu ở trên cho thấy ở 80 - 90°C, hoạt tính của enzyme này với ABTS không còn sau 2 giờ. Điều đó có thể do enzyme này chưa bị duỗi xoắn (biến tính hoàn toàn) nhưng liên kết ái lực giữa enzyme và cơ chất ABTS không còn khi ở nhiệt độ trên 80°C (Hình 4).

3.3. Khả năng phân hủy/chuyển hóa dioxin của dịch chiết enzyme

Sau 20 ngày xử lý với dịch chiết enzyme thô, dịch xử lý được phân tích nồng độ dioxin còn lại tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga. Kết quả phân tích được trình bày trên Bảng 1. Kết quả trình bày trên Bảng 1 cho thấy sau 20 ngày xử lý với dung dịch enzyme, các đồng phân của dioxin/furan đã bị phân hủy, chuyển hóa ở các tốc độ khác nhau. Bảy đồng phân 1,2,3,6,7,8-HxCDD; 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 2,3,4,7,8-PeCDF; 1,2,3,6,7,8-HxCDF; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF; OCDF bị phân hủy nhiều nhất với tốc độ phân hủy từ 99,9-100%. Hai đồng phân bị phân hủy thấp nhất là 2,3,4,6,7,8-HxCDF; 1,2,3,7,8-PeCDF chỉ phân hủy/chuyển hóa tương ứng 15,24 % và 20,96%. Các đồng phân khác có mức độ phân hủy trung bình khoảng 50-70% là 1,2,3,4,7,8-HxCDD (52,68%); 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (71,09%); OCDD (50,44%); 1,2,3,4,7,8-HxCDF (54,37%). Đồng phân 1,2,3,7,8,9-HxCDF không phát hiện ở cả mẫu ban đầu và mẫu sau phản ứng có thể do đất sử dụng để chiết các đồng phân dioxin không

chứa đồng phân này. Hai đồng phân độc nhất là 2,3,7,8-TCDD và 1,2,3,7,8-PeCDD phân hủy tương ứng là 42,36% và 64,31%. Tuy có nhiều đồng phân của dioxin/furan bị phân hủy ở mức độ 99-100% nhưng do nồng độ các đồng phân này thấp, độ độc tương đương của các đồng phân này thấp nên chúng làm giảm tổng độ độc trong mẫu nghiên cứu không nhiều, tổng độ độc chung của mẫu sau xử lý giảm 44,79% sau 20 ngày xử lý. Kết quả xử lý này là tương đối nhanh so với tốc độ phân hủy của vi sinh vật vì các vi sinh vật thường không sống được ở nồng độ dioxin cao. Đây là một

ưu thế của việc sử dụng enzyme để xử lý các chất ô nhiễm có nồng độ cao, độ độc lớn. Tuy nhiên, enzyme không thể phân hủy hay khoáng hóa hoàn toàn các hợp chất ô nhiễm đến sản phẩm cuối cùng là CO₂ và H₂O nên cần sử dụng kết hợp cả enzyme và vi sinh vật để phân hủy, chuyển hóa hoàn toàn các hợp chất dioxin này thành các chất không độc. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây về khả năng phân hủy, chuyển hóa dioxin bởi các enzyme và vi sinh vật (Kaewlaoyoong, 2019, Đặng Thị Cẩm Hà, 2012; Phùng Khắc Huy Chú 2018).

Bảng 1. Kết quả phân hủy các đồng phân dioxin của dịch chiết enzyme thô sau 20 ngày

TT	Chất phân tích	Nồng độ ban đầu (pg/ml)	Nồng độ sau 20 ngày (pg/ml)	Hiệu suất phân hủy (%)
1	2,3,7,8-TCDD	9.212,46	5.309,913	42,36
2	1,2,3,7,8-PeCDD	6,174	2,203333	64,31
3	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,4086	0,193333	52,68
4	1,2,3,6,7,8-HxCDD	1.294,8	1,07	99,92
5	1,2,3,7,8,9-HxCDD	699	0,44	99,94
6	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	10,344	2,99	71,09
7	OCDD	217,92	107,9967	50,44
8	2,3,7,8-TCDF	49,65	3,603333	92,74
9	1,2,3,7,8-PeCDF	0,0582	0,046	20,96
10	2,3,4,7,8-PeCDF	620,4	0,216667	99,97
11	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1008	0,046	54,37
12	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,0768	KPH	100
13	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,3618	0,306667	15,24
14	1,2,3,7,8,9-HxCDF	KPH	KPH	-
15	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1359	0,556667	99,96
16	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,0756	KPH	100
17	OCDF	1156,8	0,283333	99,98
Tổng độ độc (pg/ml)		9.623,302	5.312,817	44,79
Tỉ lệ 2,3,7,8-TCDD/tổng TEQ (%)		95,73	99,95	

Theo Kaewlaoyoong (2019), nấm sò *Pleurotus pulmonarius* có thể phân hủy khoảng 47% các đồng phân PCDD/F sau 49 ngày ủ sợi nấm trên cơ chất lignin với nồng độ chất ô nhiễm ban đầu khoảng 8.457 ± 690 ng TEQ/kg. Ở mẫu đối chứng không có sợi nấm mà có các vi sinh vật bản địa thì sự thay đổi nồng độ các chất này không đáng kể. Nguyên nhân nấm có khả năng phân hủy được các đồng phân dioxin này có thể do các enzyme và các chất khác sinh ra trong quá trình phát triển của nấm là chất cảm ứng trung gian cho phản ứng phân hủy này.

4. KẾT LUẬN

- Đã đánh giá được một số tính chất của enzyme laccase tách chiết từ mùn trồng nấm sò *Pleurotus sajor caju* là nhiệt độ tối ưu cho

phản ứng là 30°C, pH tối ưu là 5, độ bền nhiệt là 50°C trong 7 giờ, độ bền pH là ở pH4 trong 7 giờ. Enzyme có hệ số Km với ABTS là 1,06 mM, Vmax 76,33 mM/phút.

- Dịch chiết enzyme thô tách từ mùn trồng nấm có khả năng phân hủy các đồng phân của dioxin/furan trong 20 ngày từ 15-100%, trong đó tổng độ độc giảm 44,79% với độ độc ban đầu là 9623 pg/ml.

Lời cảm ơn

Bài báo này được hoàn thành với sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài cấp Bộ Quốc phòng: “Nghiên cứu làm chủ công nghệ chế tạo bộ kit phát hiện nhanh chất độc hóa học/dioxin trong môi trường và công nghệ xử lý đất nhiễm chất

độc hóa học/dioxin bằng giải pháp kết hợp chế phẩm sinh học với vật liệu nano”,

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Phương Mai, Lê Quang Hòa, Tô Kim Anh. Tinh sạch và xác định đặc tính của laccase tái tổ hợp từ *Aspergillus niger* D15#26 lcc1. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 297-307 8B. 50 (3) (2012).
2. Đặng Thị Cẩm Hà. Báo cáo kết quả công trình khử độc đất nhiễm chất độc hóa học chứa dioxin tại sân bay Biên Hòa tỉnh Đồng Nai bằng công nghệ phân hủy sinh học”, Viện HLKHCNVN, (2012)
3. Phùng Khắc Huy Chú. Nghiên cứu khả năng loại màu thuốc nhuộm hoạt tính và phân hủy chất diệt cỏ/dioxin của vi sinh vật sinh enzyme laccase. Luận án tiến sĩ kỹ thuật môi trường. Học viện KH-CN (2018).
4. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nat Protoc. 1(6): 2876–2890 (2006) doi: 10.1038/nprot.2006.202.
5. Rampinelli JR, De Melo MP, Arbigaus A, Dasilveira MLL, Wagner TM, Gem RMM, Wisbeck E, Bonatti-Chaves M, Junior AF & Furlan SA. Production of *Pleurotus sajor-caju* crude enzyme broth and its applicability for the removal of bisphenol A. An Acad Bras Cienc (2021) 93(1).
6. Patel H, Gupte S, Gahlout M, Gupte A. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. Biotechnology, 4, 77-84 (2014).
7. Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shi YY, Xiao YZ, Wu J, Hong YZ, Wang YP Selective induction, purification and characterization of a laccase isoenzymes from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. Mycologia 96:26–35 (2004).
8. Mahmood BF, Aziz GM, Buniya HK. Purification and characterization of caccase extracted from *Cladophora* sp. and its role in decolonization of dyes. Journal of Global Pharma Technology, 10(05):193-202, (2018)
9. Kaewlaoyong A, Cheng CY, Lin C, Chen JR, Huang WY, Sriprom P. White rot fungus *Pleurotus pulmonarius* enhanced bioremediation of highly PCDD/F-contaminated field soil via solid state fermentation. Science of the Total Environment 738, 139670, (2020).
10. Lallawmsanga. Elevated levels of laccase synthesis by *Pleurotus pulmonarius* BPSM10 and its potential as a dye decolorizing agent, (2019).
11. Camassola M, Rosa LO, Calloni R, Gaio TA, Dillon AJP. Secretion of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus* strains cultivate in solid-state using Pinus spp. Sawdust. Brazilian Journal of Microbiology 44, 1, 207-213 (2013).
12. Ezike TC, Ezugwu AL, Udeh JO, Eze SOO, Chilaka FC. Purification and characterization of new laccase from *Trametes polyzona* WRF03. Biotechnology Reports 28, e00566, (2020).
13. Rueda AM, Santos YL, Vincant AT, Letourneau M, Hernandez I, Sanchez CI, Moli D, Veyrier FJ, Doucet N. Genome sequencing and functional characterization of a *Dictyopanus pusillus* fungal enzymatic extract offers a promising alternative for lignocellulose pretreatment of oil palm residues. PLoS ONE 15(7): e0227529, (2020).<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227529>.
14. Đinh Cát Điềm. Một số phương pháp xử lý bã thải sau trồng nấm. Nghiên cứu - Ứng dụng KH&CN. Báo Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bến Tre (2016).
15. Trần Thị Thu Hương, Phạm Kiên Cường, Bùi Thị Thu Hà, Đào Hương Giang. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm enzyme ngoại bào từ mùn trồng của các loại nấm ăn phổ biến ở Việt Nam. Tạp chí Nghiên cứu KH&CN quân sự, 31, 146-151 (2014).
16. Sahay R., Yadav R.S.S., Yadav K.D.S, ‘Purification and characterization of laccase secreted by *L. lividus*’, Applied Biochemistry and Biotechnology, 157, 311-320.
17. Betti F, Rosa LR, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Malvessi E, Silveiramm & Dillon AJP. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. Process Biochem 46: 758-764, (2011).