



Original Article

## Cloning, Expression, and Characterization of a Laccase from the White Rot Fungi *Pleurotus pulmonarius* MPN18

Dang Thu Quynh<sup>1,2</sup>, Nguyen Huy Hoang<sup>1,3</sup>, Nguyen Ngoc Lan<sup>1,3</sup>,  
Le Viet Hoang<sup>2</sup>, Do Huu Nghi<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,  
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology,  
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology,  
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 19 August 2021

Revised 23 August 2022; Accepted 27 March 2023

**Abstract:** Laccase (EC 1.10.3.2) is an enzyme belonging to the polyphenol oxidase groups, which plays an important role in the oxidation of a wide variety of aromatic substrates, such as lignin, phenols, polyamines, and aryl diamines, as well as a number of other phenolic compounds or inorganic ions in the presence of oxygen. Laccase is widely applied in many fields, especially in the textile industry, dyeing, and environmental pollution treatment. In this study, we have successfully cloned and expressed cDNA coding for laccase from *Pleurotus pulmonarius* MPN18 (PpLac). cDNA corresponds to the gene laccase (1566 bp) that was inserted into pET 21a(+) vector and expressed in *E. coli* BL21, and the recombinant enzyme was purified through HisTrap™ sp 5mL column. The purified PpLac had an activity of 899.8 U, a 74% yield with a purity of 15.2 -fold, and was checked by SDS-PAGE with a molecular weight of Mw = 55 kDa. The enzyme displayed optimal activity at 50 °C, pH = 4.0. It had an optimal activity of 20-40 °C after 120 min incubation and pH = 4.0 after the incubation in 6 h. In the future, the recombinant enzyme will be characterized for supplementation into an enzyme cocktail for the treatment of lignocellulosic material.

**Keywords:** Expression, laccase, *Pleurotus pulmonarius* MPN18.

\* Corresponding author.

E-mail address: nghi@inpc.vast.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5312>

# Tách dòng, biểu hiện, và khảo sát đặc tính enzyme laccase từ nấm mục trắng *Pleurotus pulmonarius* MPN18

Đặng Thu Quỳnh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Huy Hoàng<sup>1,3</sup>, Nguyễn Ngọc Lan<sup>1,3</sup>,  
Lê Việt Hoàng<sup>2</sup>, Đỗ Hữu Nghị<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,  
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Hóa học Các hợp chất Thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,  
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu hệ gene, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,  
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 19 tháng 8 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 23 tháng 8 năm 2022; Chấp nhận đăng ngày 27 tháng 3 năm 2023

**Tóm tắt:** Laccase (EC 1.10.3.2) là enzyme thuộc họ oxidase, có vai trò quan trọng trong quá trình oxy hóa nhiều loại cơ chất chứa vòng thơm, đặc biệt là lignin, phenol, polyamin, và các aryl diamin cũng như một số các ion vô cơ khi có mặt của oxy. Laccase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt trong ngành công nghiệp dệt, nhuộm, và xử lý ô nhiễm môi trường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tách dòng và biểu hiện thành công cDNA của gene laccase từ nấm mục trắng *Pleurotus pulmonarius* MPN18 (PpLac). cDNA của gene laccase (có kích thước 1566 bp) được gắn vào vector pET 21a (+) và biểu hiện trong *E. coli* BL21, sau đó enzyme được tinh sạch qua cột HisTrap™ sp 5mL. PpLac tinh sạch có hoạt độ 899,8 U, hiệu suất 74% với độ tinh sạch 15,2 lần, và được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE có trọng lượng phân tử  $M_w = 55$  kDa. Enzyme hoạt động tối ưu ở 50 °C và pH 4.0. Enzyme giữ hoạt tính ở 20-40 °C sau 120 phút ủ và pH 4 sau 6 h ủ. Enzyme sẽ được tiếp tục đánh giá tính chất để xem xét khả năng bổ sung hỗn hợp enzyme cho chuyển hóa hiệu quả trong xử lý phụ phẩm nông-lâm nghiệp giàu lignocellulose.

**Từ khóa:** Biểu hiện gene, laccase, *Pleurotus pulmonarius* MPN18.

## 1. Mở đầu

Laccase (EC 1.10.3.2) là một polyphenol oxidase có chứa cofactor là ion đồng, có khả năng oxy hóa đa dạng các hợp chất chứa vòng thơm như phenol, polyamin, và các aryl diamin cũng như một số các ion vô cơ, đặc biệt là lignin [4, 5]. Ưu điểm vượt trội của laccase là có tính oxy hóa mạnh, sử dụng oxy phân tử làm chất nhận điện tử, vì vậy enzyme này có rất nhiều ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp, như xử lý nguồn nước thải ô nhiễm bằng cách loại

bỏ các hợp chất chứa phenol hay ứng dụng trong tẩy trắng bột giấy, tẩy màu thuốc nhuộm vải [6-8]. Đặc biệt laccase còn có ứng dụng trong xử lý phụ phẩm nông-lâm nghiệp giàu lignocellulose, là một trong những nguyên liệu thô phổ biến nhất trong số các phụ phẩm nông-lâm nghiệp của Việt Nam. Trong cấu trúc lignocellulose, lignin là một polyphenol có cấu tạo phức tạp và vững bền, việc phân hủy chúng là vấn đề đang được các nhà nghiên cứu khá quan tâm. Hiện nay, quá trình chuyển hóa lignin thường được thực hiện theo hướng sử dụng hệ enzyme ligninolytic, bao gồm laccase, manganese peroxidases (EC 1.11.1.13), lignin peroxidases (EC 1.11.1.14)), và versatile

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: nghi@inpc.vast.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5312>

peroxidases (EC 1.11.1.16) đang rất được ưa chuộng [3, 7, 9-11].

Laccase được phân bố rộng rãi trong tự nhiên như vi khuẩn, nấm, thực vật, nhưng phổ biến nhất là từ nấm mục trắng. Các chủng tổng hợp laccase trong tự nhiên thường có hoạt tính thấp và đòi hỏi các chất cảm ứng tạo enzyme với giá thành cao. Do vậy, trong thời gian gần đây việc sản xuất laccase tái tổ hợp đã góp phần giảm đi tính phức tạp của quá trình lên men sinh tổng hợp enzyme.

Nấm mục trắng *Pleurotus pulmonarius* thường được phân lập ở những thân cây gỗ mục và còn được biết đến là loài có khả năng sinh laccase rất tốt [12]. Tuy nhiên hiện nay ở trong và ngoài nước vẫn chưa có công bố cụ thể nào về tách dòng và biểu hiện laccase từ loài nấm này. Trong nghiên cứu này, với mong muốn nghiên cứu đặc tính và sản xuất laccase với năng suất cao hơn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tách dòng, biểu hiện và khảo sát đặc tính enzyme laccase từ chủng nấm *P. pulmonarius* MPN18 được phân lập từ rừng tự nhiên Mường Phăng (Điện Biên), Việt Nam.

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Vật liệu

Chủng nấm mục trắng *P. pulmonarius* MPN18 được phân lập từ rừng tự nhiên Mường Phăng, Điện Biên và được nuôi trên môi trường thạch khoai tây (PDA) ở nhiệt độ phòng (7 ngày) [13]. Vector tách dòng TA được mua ở hãng iNtRON (Hàn Quốc). Vector biểu hiện pET21 a(+) được mua ở hãng Novagen (Mỹ). Chủng vi khuẩn biến nạp *E. coli* DH5α và *E. coli* BL21 được mua ở hãng Invitrogen.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tách chiết DNA và RNA tổng số của *P. pulmonarius* MPN18

*P. pulmonarius* MPN18 được nuôi trên môi trường PDA từ 3 đến 5 ngày, sau đó bào tử nấm được thu nhận và được nghiền trong ni tơ lỏng. DNA tổng số được tách bằng Kit tách DNA và RNA tổng số được tách bằng Kit tách RNA của nấm (Thermo Scientific). DNA và RNA được

định lượng bằng cách đo độ hấp phụ ở bước sóng 260/280 nm bằng máy đo quang phổ. ADN tổng số được tinh sạch bằng bộ KIT Fermentas. RNA tổng số được tinh sạch bằng cồn qua đêm, sau đó được sử dụng để phiên mã ngược tạo cDNA bằng bộ kit RevertAid First Stand cDNA Synthesis (Thermo Scientific).

#### 2.2.2. Khuếch đại gene Laccase *PpLac*

Để khuếch đại gene laccase từ DNA tổng số và cDNA chúng tôi đã tiến hành thiết kế cặp mồi đặc hiệu từ những phân tích trình tự genome của loài *P. pulmonarius* (Gene bank ID: SJKF01000005.1) trên dữ liệu của ngân hàng gene. Cặp mồi đặc hiệu F1, F2 và F1', F2' được thiết kế và kiểm tra bằng phần mềm Oligo Calc. Phản ứng khuếch đại chuỗi polymerase (PCR) được tiến hành sử dụng cặp mồi trên với thành phần phản ứng gồm 30 ng cDNA, 10 pmol mồi xuôi, 10 pmol mồi ngược, 2x DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher) trong tổng thể tích phản ứng 25  $\mu$ L. Chu trình nhiệt PCR là 95  $^{\circ}$ C trong 5 phút, 95  $^{\circ}$ C trong 30 giây, tiếp đó ở 58  $^{\circ}$ C trong 30 giây và 72  $^{\circ}$ C trong 2 phút, kéo dài chuỗi 72  $^{\circ}$ C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE (Tris acetic acid EDTA) với điện thế 135V trong 30 phút sử dụng thuốc nhuộm ethidium bromide (EtBr). Mồi F1' và F2' được gắn đoạn nucleotide là vị trí cắt của enzyme giới hạn NdeI và XhoI để chèn vào vector tách dòng và vector biểu hiện.

Mồi xuôi F1:

CTCACAAATGGTGCTCTCTAC

Mồi ngược F2:

GTTTATTTACTGGAACCTCGGGAG

Mồi xuôi F1':

CTCACATATGGTGCTCTCTAC (NdeI)

Mồi ngược F2':

GTATTCTCGAGCTGGAACCTCGG (XhoI)

#### 2.2.3. Tách dòng và biểu hiện gene Laccase *PpLac*

Sản phẩm PCR có kích thước phù hợp được phân tách và tinh sạch từ gel agarose bằng Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Mỹ). Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1% trước khi được tạo dòng. Khoảng 40 ng sản phẩm PCR sau tinh sạch

được ủ với 50 ng TA-Cloning Vector II trong phản ứng có 1X đệm gắn, 2 đơn vị T4 DNA Ligase ở 22 °C và được ủ ở 25 phút. Hỗn hợp gắn sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5a bằng phương pháp sốc nhiệt [14]. Tế bào *E. coli* DH5a sau đó được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung ampicilin (Amp) với nồng độ 50 µg/µL trong 16 giờ ở 37 °C, lựa chọn khuẩn lạc có hình thái màu trắng.

Tiếp đó, gene Lac trong TA vector sau đó được tách ra và khuếch đại bằng cặp mồi F1' và F2' có gắn enzyme giới hạn NdeI và XhoI. Sản phẩm PCR và vector pET 21a (+) được cắt với 2 enzyme giới hạn NdeI và XhoI, nối vòng bằng T4 DNA Ligase tạo vector tái tổ hợp. Vector tái tổ hợp sau đó được biến nạp vào *E. coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt [14]. Tế bào sau đó được cấy trang trên mặt thạch có bổ sung Amp<sup>+</sup>, nuôi qua đêm ở 37 °C. Khuẩn lạc được lấy riêng rẽ và nuôi trong ống nghiệm chứa 3 mL môi trường lỏng LB/Amp<sup>+</sup>, nuôi lắc qua đêm (225 vòng/phút, 37 °C) rồi tách plasmit để giải trình tự gene. Canh trường khuẩn lạc (2,5 mL) chứa vector tái tổ hợp được chuyển sang bình 1 lít có chứa 250 mL môi trường lỏng LB/Amp<sup>+</sup>, nuôi lắc 225 vòng/phút ở 37 °C trong khoảng 3 giờ (tới khi OD<sub>600nm</sub>=0, 6-0, 8). Bổ sung chất cảm ứng isopropylthio-β-galactoside (IPTG) 1M, tiếp tục nuôi lắc 225 vòng/phút ở 20 °C qua đêm trong thời gian 8 giờ.

#### 2.2.4. Điện di gel polyacrylamide (SDS-PAGE)

Điện di SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất với hệ điện di đứng (XCell SureLock™ Mini-Cell, Invitrogen, Karlsruhe, CHLB Đức hoặc OmniPage Mini; Cleaver Scientific, Warwickshire, UK). Phương pháp này được sử dụng để đánh giá độ tinh sạch của protein dưới điều kiện biến tính cũng như xác định trọng lượng phân tử (MW) của protein enzyme. Protein phân tách điện di được quan sát sau khi nhuộm với Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma).

#### 2.2.5. Tách chiết, tinh sạch protein enzyme

Sau khi nuôi cấy, dịch tế bào được ly tâm loại bỏ môi trường thu cặn và siêu âm trong đệm natri Tris-HCl pH 6,5 nhằm phá vỡ tế bào (tất cả quy trình được thực hiện ở 4 °C). Sau đó

tiếp tục ly tâm ở 20.000 vòng/phút loại bỏ cặn và thu được dịch chiết. Dịch enzyme thô biểu hiện hoạt tính được tinh sạch qua cột HisTrap™ sp 5 mL (GE Healthcare, Sweden), protein có hoạt tính đã được thiết kế mang đuôi 6His ở đầu N nên khi đi qua cột sắc kí HisTrap, protein sẽ được giữ lại trên cột nhờ ái lực của đuôi 6His và ion Ni<sup>2+</sup>. Sau đó rửa giải bằng dung dịch natri Tris-HCl (pH 6,5) 10 mM có bổ sung 0-500 mM Imidazole. Protein sau đó được cô và loại muối qua cột 10 kDa cut-off (LongerPump K235 với màng UFP 10MW, Amersham BioScience, Westborough, MA, USA, hoặc amicon Ultra Centrifugal Filters, Millipore, Bedford, USA) ở 11 °C. Mẫu được lưu giữ ở -80 °C.

#### 2.2.6. Xác định hoạt tính Laccase (EC 1.10.3.2)

Hoạt tính Laccase được xác định bằng đo quang phổ theo mô tả của Gochev với cơ chất sử dụng là ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzothiazoline- (6) -sulphonic acid], Boehringer). Hỗn hợp phản ứng laccase trong tổng thể tích 1 ml chứa 0,3 ml enzyme được pha loãng vào dung dịch đệm (acetate 100 mM, pH 5,5) và 0,7 ml 0,02 M ABTS. Phản ứng được theo dõi bằng cách đo sự thay đổi OD ở bước sóng 415nm trong 2 phút. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U) được xác định là lượng enzyme cần thiết để xúc tác oxy hóa 1 µmol ABTS trong một phút [15-17].

#### 2.2.7. Khảo sát đặc tính của enzyme laccase tinh sạch

##### Xác định nhiệt độ và pH tối ưu

Nhiệt độ và pH tối ưu của enzyme tinh sạch được xác định bằng cách đo hoạt tính enzyme theo phương pháp đã mô tả ở mục 2.2.6. Để khảo sát pH tối ưu của enzyme tinh sạch được xác định trong bộ đệm natri acetate 100 mM (pH 3, 0-6,0), ở nhiệt độ 40 °C. Khảo sát nhiệt độ tối ưu được thực hiện trong khoảng 20-60 °C tại pH tối ưu.

##### Xác định độ bền nhiệt và độ bền pH

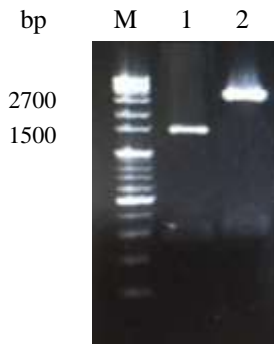
Để đánh giá độ bền nhiệt của enzyme tinh sạch, dịch enzyme (20 µL cho mỗi phản ứng) được ủ ở nhiệt độ 20,40 và 6 °C tại pH tối ưu, xác định hoạt tính sau khi ủ tại 20; 40; 60;80; 100 và 120 phút. Độ bền pH của enzyme được xác định tại ba điểm pH 4,0 (đệm natri acetate);

pH 6,0 (đệm Tris-HCl); pH 8,0 (đệm phosphate) ở nhiệt độ tối ưu, hoạt tính được xác định sau khoảng thời gian ủ trong 6 giờ. Thí nghiệm được lập lại 3 lần, enzyme trước khi ủ được xem là 100%.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Phản ứng khuếch đại gene và vùng mã hóa enzyme laccase

Sinh khối *P. pulmonarius* MPN18 sau 5 ngày nuôi cấy được thu hồi và tách chiết RNA, DNA tổng số. RNA được tinh sạch và sử dụng như một mạch khuôn để phiên mã ngược tạo cDNA. Tiếp đó, cặp mồi đặc hiệu (F1' và F2') được sử dụng để khuếch đại gene PpLac từ mạch khuôn cDNA. Trong khi đó, cặp mồi F1 và F2 được sử dụng để khuếch đại gene *Lac* từ mạch khuôn DNA tổng số. Hình 1 đã cho thấy kết quả phản ứng PCR của gene laccase từ cDNA và DNA tổng số với kích thước tương ứng khoảng 1500 bp và 2700 bp. Do đó, sản phẩm PCR tiếp tục được tinh sạch và sử dụng cho bước tách dòng.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại PCR từ mạch khuôn cDNA thu được sau khi phiên mã ngược từ RNA (lane 1), từ DNA tổng số (lane 2) của chủng nấm *P. pulmonarius* MPN18.

#### 3.2. Tách dòng gene PpLac

Sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại gene *Lac* được gắn vào vector TA-Cloning Vector II và được biến nạp vào trong tế bào chủ *E. coli* DH5a.

Khuẩn lạc thu được tiếp tục nuôi và tiến hành tách plasmid, sau đó khuếch đại bằng cặp mồi F1' và F2' có gắn enzyme giới hạn NdeI và XhoI. Sản phẩm PCR và vector pET 21a (+)

được cắt với 2 enzyme giới hạn NdeI và XhoI, sau đó được nối vòng bằng T4 DNA Ligase tạo vector tái tổ hợp và được biến nạp vào trong tế bào *E. coli* BL21. Khuẩn lạc được nuôi, tách plasmid tái tổ hợp và giải trình tự.

Kết quả giải trình tự cho thấy cDNA của gene PpLac có độ dài 1566 bp (Hình 2).

PpLac	ATGGTGCCTCTACTAAGCTCGCTGCTCTGTGGCTTCGCTCCCTTCGTTCTGCTGGG	60
PsLac	ATGGTGCCTCTACTAAGCTCGCTGCTCTGTGGCTTCGCTCCCTTCGTTCTGCTGGGCTC	60
PpLac	ACGAAGAATCGACTTCCACATTGCAAAAGACGTTGTCTCCAGACAGCGCTTCGAGGCG	120
PsLac	ACGAAGAATCGACTTCCACATTGCAAAAGACGTTGTCTCCAGACAGCGCTTCGAGGCGC	120
PpLac	AGGGCATTACAGTCAATGGCATCTCCCTGGGACGCCGTATATCTCGAGAAGAAGCAG	180
PsLac	AGGGCAATCACATCAATGGCATCTCCCGGGACGCCGTATATCTCGAGAAGAATGAC	180
PpLac	AAGTCCAGATCAATCACTAATGAACCTGACGGACCTGGCATGGTGCAGTACCTCC	240
PsLac	AAGTCCAGATCAAACTAATGAATGACAGACCCCGCATGGCGGCGAGTACCTCC	240
PpLac	ATCCATTGGCAGGTTTATCCAAATAAACCTCCGGCATGACGGGCTTCCTTGGTT	300
PsLac	ATCCATTGGCAGGTTTATCCAAATAAACCTCCGGCATGACGGGCTTCCTTGGTT	300
PpLac	AACCAGTGCCTGATCCCGCACTCTACTTCCCTTACGACTCGATACCGGAGGCGAG	360
PsLac	AACCAGTGCCTGATCCCGCACTCTACTTCCCTTACGACTCGATACCGGAGGCGAG	360
PpLac	ACCGGAACACTGTTATCCACTCCACTTGTCTACGCAATATTCGACGGCTTCCTGGT	420
PsLac	ACCGGAACACTGTTATCCACTCCACTTGTCTACGCAATATTCGATGGACTTCGGGT	420
PpLac	TCTTTCATGTTTATGATCCCAAGTCTCTGAGCACTGTGACGATGTGATGATGAG	480
PsLac	TCTTTCATGTTTATGATCCCAAGTCTCTGAGCACTGTGACGATGTGATGATGAG	480
PpLac	AGCACCATCATCACCTTAGCAGATTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG	540
PsLac	AGCACCATCATCACCTTAGCAGATTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG	540
PpLac	TTCTTCCAACTGGTTCGGTCCGATTCGCGACCTGGTTTATGATCAAGGTTGTGACGA	600
PsLac	TTCTTCCAACTGGTTCGGTCCGATTCGCGACCTGGTTTATGATCAAGGTTGTGACGA	600
PpLac	TTCAAGGGGGCCCTTGTTCCTTAAGCGCTCATCAAGTTGAGCAGGCAAGCGCTAC	660
PsLac	TTCAAGGGGGCCCTTGTTCCTTAAGCGCTCATCAAGTTGAGCAGGCAAGCGCTAT	660
PpLac	AGAAGATTCCGCTCATCCAGATTTCATGCTGCTCTTCTTCACTTCTTATGACAC	720
PsLac	A--GGTTCGCGCTTATCCAGATCTCATGCGCCCTTCTTCACTTCTTATGACAC	717
PpLac	CACACATTGATGCAATTGAATTCGAGGCATAGAGCAGCCACACACCGCCAGAAC	780
PsLac	CACACATTGATGCAATTGAATTCGAGGCATAGAGCAGCCACACACCGCCAGAAC	777
PpLac	ATTGATATCTATGCTGCTCAACGCTGGCTGATCATGCTCCAGCCCAACAGACATGAC	840
PsLac	ATCGATATCTATGCTGCTCAGCGTGGCTGATCATGCTCAACGCCCAACAGACATGAC	837
PpLac	AATCTACTGATCCGGGCGCACTCACAGGGGAAACCCCGAGTAAACCTAAGCTGGAC	900
PsLac	AATCTACTGATCCGGGCGCACTCACAGGGGAAACCCCGAGTAAACCTAAGCTGGAT	897
PpLac	ATATCGTTGATCAGGGCCATCCTTGGTTACAGGGTGTCCCGCTGTGAGCCCAACACA	960
PsLac	GTATCATGATCAGGGCCATCCTTGGTTACAGGGTGTCCCGCTGTGAGCCCAACACTCA	957
PpLac	GTTGCGACTACTGGAGGCCAAGCTCAATGATGCGCATATGCAACCAATGCTCAGGAA	1020
PsLac	CTCGGACTACCGAAGCTCAGAGCTCAATGATGCGCATATGCAACCAATGCTCAGGAA	1017
PpLac	GGTCCCGGAACTGGGCAACCGTCCCGCAGACATGCCATCACTTGAACATGCCCCAG	1080
PsLac	GGTCCCGGAACTGGGCACTGTCCCGCAGATATGCCATCACTTGAACATGCCCCAG	1077
PpLac	CCGAACCCCAATCTTGGATATCAACGGCAATTCGATCTCTCTCTCTCTGCTCCAGTG	1140
PsLac	CCTAACCCCTCAATCTTGGATATTAATGGCATATGATCTCTCTCTCTCTGCTCCAGTG	1137
PpLac	TTGCTCCAGATGCTTAGCGGTGCTGCGAAACCAAGACTTCTCTCCATCGGAACAGTC	1200
PsLac	TTGCTCCAGATGCTTAGCGGTGCTGCGAAACCAAGACTTCTCTCCATCGGAACAGTC	1197
PpLac	ATCATCTTGCCCGCAACAGCTTATTGAAGTCTCTATCCCGGTGCGCGCGCATCTCT	1260
PsLac	ATCATCTTGCCCGCAACAGCTTATTGAAGTCTCTATCCCGGTGCGCGCGCATCTCT	1257
PpLac	TTCCAGTAA	1569
PsLac	TTCCAGTAA	1566

Hình 2. So sánh trình tự cDNA của gene laccase từ chủng *P. pulmonarius* MPN18 (PpLac) và *P. sajor-caju* (PsLac).

Kiểm tra độ tương đồng gene *PpLac* với công cụ Blast trên ngân hàng gene Genbank cho thấy *PpLac* tương đồng 89,85% với gene *lac3* của chủng *Pleurotus sajor-caju* (Genbank ID: AJ507326.1).

Bên cạnh đó kết quả giải trình tự gene laccase có độ dài 2696 bp trong đó có 22 exon, 21 intron như ở Hình 3.

```

ATGGTGCTCTCTACTAAGCTGTTGCCCTTGTCGCCCTCTCCCTTCGTCTTTGCTGTCACCAAGA
AATTGGACTTTCACATTGCGAACGACTAGTCTCTCCGGACGGCTCGAGCGACGAggagccattttg
catgtcaccattgatggagcactcactcctgggtgtagGGAATCACAGTCAATGGCATCTCCCGGGGA
CGCGtaagccttactgtactcactgcgcccttgaactctttatagCGGTCATATTGCAAGAATGACAA
GGTCCAGtaagtcattgatgtaatttgatctccttcacagcttcgtagATCAAACTAATAATGAATTGA
CAGACCCGGCATGGGGCAGTACTCCATGctcagctgcctccagccataaaaaaaaaaacctcagcagcc
tcgatatagCAATGGCAGGTTTTGTCACATAAAACCTCCGGCATGAGCGGGCCTTCgtgagtcagatc
atcacacagcgcctgtactactcaagttgacttgttTTCGTTAACAGTGCCTCCTCCAACTACT
TTCTTATGATTTCGATACCGCAGGACAGACCGGAACTACTGctcgcgcgagctctgcttgaag
aacagctcacacaactctcagTACCACTCCCACTGTCTACGCAATATTGTGATGGACTTCGGGTTCC
TTCTGCTGTATGctggcccctcttgaagcgttcaggagctgcacagcagtagATCTCAACGATCCTTT
GAAGCATCTTATGATGTTGATGACGctactgcacgctctcctcaagagcgcgactgactgaattcaacacag
AGAGCACCATCATCACTTGGCAGACTGctgactctcaccacagcattcagggatagggtctcaactgagc
TtaagTGACCATGATCTTGCTCCCAAGCCAAACAGTCTTCAAACTGGTTCAGTACCGGATCCCC
GACTGCGTTGATCAACGGTGCCTGATCAAGGCGGCCCTGTTCCCTATGCCGTCATCA
ACGTTGAGCAGGCGCAAGCTTATAGtaacagctctccagcctcggagtcgtagcagccagctcctcaagcggaca
gTTCCGCCCTTATCAGATCTCATGCCGCTTCTCACATTCTCAATTGACAATCACACTCGATG
CAATTGAATTTGACGGCAGTACAGACCGGACTCCTGACAGAACATCGATATCACTggttaa
gtatgactgcctcaagctctcctggtgacttacaccttcgGCTCAGCGTGCGTGCATCATGTCACAACG
CAACCAAGCATAGACAATTAATCGGATGTCGCGCTgctgcttttaactcgcgccttcaacattattcagc
agcagcttttactagTAGTCAAGGGGGAACCCCGAGTAAACCCAAAGCtaagtagtagacgcgcgcgc
ctcaacattcagatgagactcactcagGATGATATGATGACTAGCAGGCGCATTCTCGATACAAAGGA
GCCCCGCTGTCGAACCACTCAGTCCGACTACCGGAGTCAAGCTCAATGATGCCGACATG
CACtaagtagctcttcccattggttaagtagtattgattatgtatgtcaccaccagCCATCGCTCAGGAAGT
CCTGGAAATTTGGGCTGTTCCCGAGATATGGCCATCACTTGAACATTGCCCAAGTactagcctcctc
attttcgcctattagaattactcaagcgccttgaagGCTAAACCTCATTCTTTGATATTAAAGGATATCGT
ATCTCTCCCTCGGTCCCAGTGTTCCTTAGCAGTCTTAGCGGTGCTCGAAGCCCAAGACTCTCT
GCCATCGGtaagctcactcgcgctgtaacgctctacagctcagcactgtaggaACAAGATCATCATCTGCCC
GCCAACAAGCTCATTGAAGTTCGATACCGGAGCTGGCCAGTCACTCTTCCATTGtaagtagctctcctg
tgatacacagatgctcgaatattactcagTGCACGGTCACACCTTGCATTGACATTGCCGGTTCGAATG
CGACGTTGTTAACTTGTCAACCACTCGCGTACGCTGCTGCTAgtaagcattcactgaocaaactgtc
tcaagcgaactaagcattcattgTCAACGGTGAACACGACTCCGTTTCTgtaagtagcctcaactac
gagctgaacgcgtgactctttttgTCTGGAACACTGTCGATGTTCTCAGtagtaggaagttgattc
tcgatattttagctcgcgtgagcctcaactaactcagTGATATTGACTGGCATCTGAAGCTGGTCTTG
CCGTTGCTCGCCGAACGACGCTGAAAGTCAATGAGGGCAGCAGGCGCAAAATTGCTACTCAA
GACTGGAagtagcgcagcgcctctgtagtaacgactctctcctctgtagGACACTTGGCCGGCT
TACGATGGCTCGCTCCGAGTCCAGTAA

```

Hình 3. Trình tự gene laccase của chủng *P. pulmonarius* MPN18 (Chữ in nghiêng là trình tự intron).

Tiếp tục so sánh trình tự protein laccase giữa 2 chủng *P. pulmonarius* MPN18 (PpLac) và *Pleurotus sajor-caju* (PSLac) cho thấy kết quả giống nhau tới 99, 81%, chỉ duy nhất sự khác nhau amino acid số 324, ở *PpLac* là

Glycine trong khi đó ở PSLac là Glutamate (Hình 4). Từ những phân tích trên có thể khẳng định rằng đã tách dòng thành công gene *PpLac* từ chủng nấm *P. pulmonarius* MPN18 vào *E. coli* BL21.

```

PpLac: MVLSTKLVAVLQSLPPFAVTKKLFQRIKIDIVDPQFERRAIVTNGIFPQTIVLQKND 68
PSLac: MVLSTKLVAVLQSLPPFAVTKKLFQRIKIDIVDPQFERRAIVTNGIFPQTIVLQKND 68

PpLac: KVVQKTEIMELTDPQRSTSDHAGLQKHETSQDQSPVAVQCIPFNITFLYDFDTAQD 128
PSLac: KVVQKTEIMELTDPQRSTSDHAGLQKHETSQDQSPVAVQCIPFNITFLYDFDTAQD 128

PpLac: YGVVYVYHSLSTQVCDLRFDPVYDPHDFRKLHVDVQDSESTIITLADVYHFLAPHAHQ 188
PSLac: YGVVYVYHSLSTQVCDLRFDPVYDPHDFRKLHVDVQDSESTIITLADVYHFLAPHAHQ 188

PpLac: FRQTGSVPFPDTGLDQVSRVFQSPVYVAVVVEGSRVYRFLIQDSCRPFPTSDNH 248
PSLac: FRQTGSVPFPDTGLDQVSRVFQSPVYVAVVVEGSRVYRFLIQDSCRPFPTSDNH 248

PpLac: TFDIEFQGEHQPTFAQNDIVAAQRAIIIVAVQITDNYVHRAPLRGGFAGRHLDV 308
PSLac: TFDIEFQGEHQPTFAQNDIVAAQRAIIIVAVQITDNYVHRAPLRGGFAGRHLDV 308

PpLac: SLIRAILRYKGAWEPTSVAATGGHLNDQHPHFAQEGPHLGTGGPPHATLILAQF 368
PSLac: SLIRAILRYKGAWEPTSVAATGGHLNDQHPHFAQEGPHLGTGGPPHATLILAQF 368

PpLac: NPPFDEINGSYLSPVAVLLQMLSGARKPDFLPSQVITLFAWHLIEVSEPGAGHFF 428
PSLac: NPPFDEINGSYLSPVAVLLQMLSGARKPDFLPSQVITLFAWHLIEVSEPGAGHFF 428

PpLac: HLHGTFTDIRVYNSGVNALLVPPRRDLTFHGQITFRFFSSGSGAHLFCHIDNHLE 488
PSLac: HLHGTFTDIRVYNSGVNALLVPPRRDLTFHGQITFRFFSSGSGAHLFCHIDNHLE 488

PpLac: SLAVVFAERPAVNVGGQDQVTDQNTLCPAYDGLAPEKQ 521
PSLac: SLAVVFAERPAVNVGGQDQVTDQNTLCPAYDGLAPEKQ 521

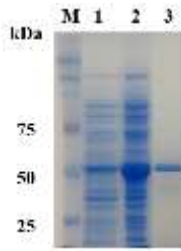
```

Hình 4. So sánh trình tự protein laccase của chủng *P. pulmonarius* MPN18 (PpLac) và *P. sajor-caju* (PSLac).

3.3. Biểu hiện gene mã hóa laccase trong *E. coli* BL21

Khuẩn lạc có vector pET 21a (+) và laccase được nuôi lỏng trong môi trường LB/Amp<sup>+</sup> với chất cảm ứng IPTG. Thu được enzyme thô bằng phương pháp siêu âm tế bào. Sau đó dịch enzyme được tinh sạch qua cột HisTrap™ sp, dịch enzyme thô và enzyme tinh sạch được điện di kiểm tra gel polyacrylamide 12% (Hình 5). Kết quả cho thấy dịch enzyme thô (lane 1) có 1 băng đậm có kích thước khoảng 55 kDa, sau khi tinh sạch qua cột HisTrap™ sp (lane 2) thu được protein có 1 băng đậm duy nhất có kích thước trùng với băng đậm của dịch enzyme thô (55 kDa).

Sau quá trình tinh sạch qua 2 cột HisTrap™ sp và màng 10 kDa cut-off đã thu được lượng enzyme tinh sạch là 103, 6 mg, tương đương 899,8 U và hiệu suất 74% với độ tinh sạch 15, 2 lần (Bảng 1). Enzyme tinh sạch có trọng lượng phân tử Mw = 55 kDa, sau đó được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc tính protein enzyme.



Hình 5. Phân tích SDS-PAGE về sự biểu hiện và tinh sạch của PpLac. M: thang chuẩn protein, lane 1: dịch chiết tế bào không cảm ứng bởi IPTG, lane 2: dịch enzyme thô, lane 3: PpLac sau khi tinh sạch qua cột HisTrap<sup>TM</sup> sp.

### 3.4. Đặc tính hóa-lý enzyme laccase

#### 3.4.1. Nhiệt độ và pH tối ưu

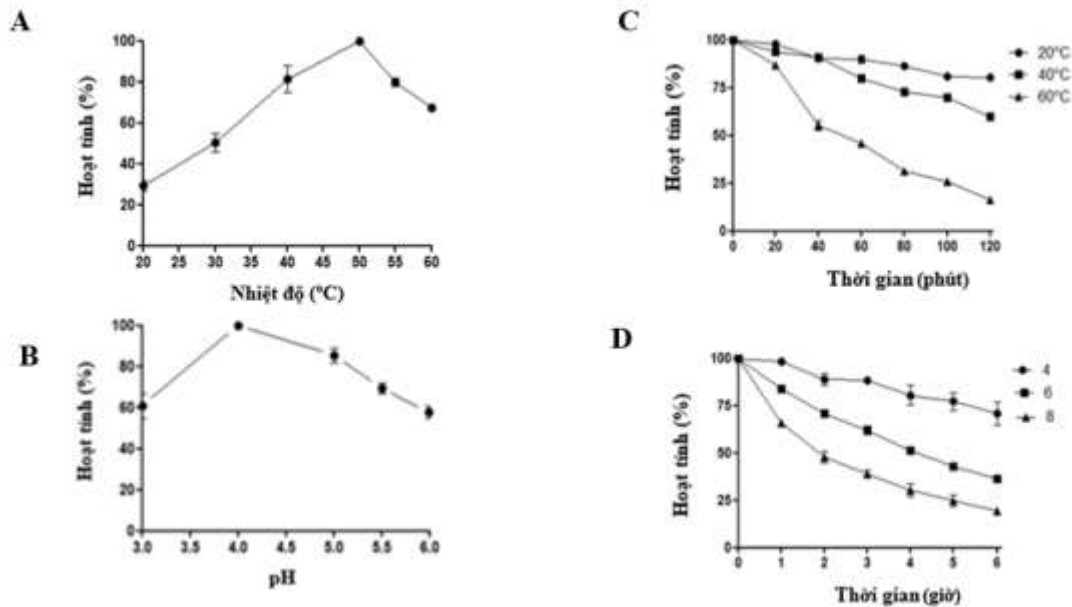
Nhiệt độ tối ưu của phản ứng giữa enzyme laccase tinh sạch và cơ chất ATBS được tiến

hành trong khoảng nhiệt độ từ 20-60 °C. Kết quả cho thấy hoạt tính laccase tăng dần từ từ nhiệt độ 20 °C tới 50 °C (100%), và bắt đầu giảm dần hoạt tính từ sau 50 °C cho tới 60 °C.

Sau khi tăng nhiệt độ thì hoạt tính của enzyme giảm dần chỉ còn xấp xỉ 60% ở 60 °C (Hình 6A). Giá trị pH cũng được xác định tối ưu trong khoảng từ 3,0-6,0. Hoạt tính laccase được đo ở nhiệt độ tối ưu 50 °C ở từng giá trị pH. Ở pH 4,0 hoạt tính laccase đạt 100% so với những giá trị pH khác, hoạt tính bắt đầu tương đối giảm dần từ ở pH 4,5 và giảm xuống xấp xỉ 50% ở pH 6.0 (Hình 6 B), nhìn chung laccase hoạt động tốt ở pH axit hơn là kiềm. Do vậy, hoạt tính của enzyme laccase tái tổ hợp có giá trị cao nhất ở 50°C và ở pH 4, 0.

Bảng 1. Tóm tắt quá trình tinh sạch enzyme laccase

Các bước tinh sạch	Tổng thể tích (mL)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính riêng (U mg <sup>-1</sup> )	Hiệu suất (%)	Độ tinh sạch (lần)
Dịch chiết thô	250	2132, 4	1214, 5	0, 57	100	1
HisTrap <sup>TM</sup> sp	9	197, 9	979, 5	4, 9	80	3, 1
10 kDa cut-off	5	103, 6	899, 8	8, 7	74	15, 2



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và pH (B), độ bền nhiệt (C) và pH (D) đến hoạt tính của laccase tái tổ hợp tinh sạch.

### 3.4.2. Độ bền nhiệt và pH của enzyme laccase

Enzyme tương đối bền ở nhiệt độ 20 °C sau 120 phút ủ, tuy nhiên ở 40 °C sau 60 phút hoạt tính oxi hóa ATBS bắt giảm dần, sau khi ủ ở 120 phút hoạt tính laccase chỉ còn xấp xỉ 60%. Hoạt tính của enzyme giảm nhanh ở 60 °C và mất xấp xỉ 85% hoạt tính sau 120 phút ủ ở nhiệt độ này. Kết quả này cho thấy rằng laccase khá bền ở nhiệt độ vừa phải (nhiệt độ phòng) và kém bền khi nhiệt độ tăng dần (Hình 6 C). Enzyme tinh sạch cho thấy bền hoạt tính ở pH 4,0, sau 6 tiếng ủ hoạt tính laccase xấp xỉ gần 80% so với ban đầu. Ở pH 6,0 hoạt tính giảm dần đều, sau 6 tiếng ủ chỉ còn lại 40% hoạt tính ban đầu, và ở pH 8,0 hoạt tính laccase giảm mạnh, sau 6 tiếng ủ hoạt tính bị mất 80% so với hoạt tính ban đầu (Hình 6 D).

Độ bền nhiệt của laccase tái tổ hợp trong nghiên cứu này tương tự với enzyme laccase tái tổ hợp từ nấm mục trắng *Pleurotus ostreatus* biểu hiện ở nấm men *Pichia pastoris* [18]. Ở nhiệt độ vừa phải (30-40 °C), enzyme có hoạt tính thay đổi không đáng kể sau khoảng 120 phút ủ khi tăng dần nhiệt độ enzyme có biểu hiện mất dần hoạt tính. Độ bền pH của laccase tái tổ hợp cũng có nhiều điểm tương đồng với những nghiên cứu trước đó, laccase chủ yếu hoạt động tốt ở pH 3,0-4,0 [15, 18-20]. Như vậy, laccase tái tổ hợp từ chủng *E. coli* BL21 trong nghiên cứu này tương đối bền ở nhiệt độ 20-40 °C và pH 4, 0.

## 4. Kết luận

cDNA của laccase được tách dòng thành công (kích thước 1566 bp) từ *P. pulmonarius* MPN18 vào *E. coli* DH5α và biểu hiện thành công vào *E. coli* BL21 với dịch enzyme tinh sạch có hoạt độ 899,8 U và hiệu suất 74% với độ tinh sạch 15,2 lần. Enzyme tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE có trọng lượng phân tử Mw = 55 kDa. Enzyme có nhiệt độ tối ưu ở 50 °C và pH 4,0. Hoạt tính của enzyme tương đối bền ở 20-40 °C sau 120 phút ủ và pH 4 sau 6 h ủ. Enzyme sẽ được tiếp tục đánh giá tính chất khác để xem xét khả năng bổ sung hỗn hợp enzyme cho chuyển hóa hiệu quả

trong xử lý phụ phẩm nông-lâm nghiệp giàu lignocellulose.

## Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí thực hiện nhiệm vụ Nghị định thư Việt Nam - CHLB Đức, mã số: NĐT.45.GER/18 (Bộ KH&CN).

## Tài liệu tham khảo

- [1] P. Pham, D. Le, L. Dong, Conversion of Lignocellulosic Biomass: From Waste to Promising Feedstock for Bioethanol Production of Second Generation, Vietnam Journal of Science of Lac Hong University, 2017, pp. 159-164 (in Vietnamese).
- [2] T. Shahzadi, S. Mehmood, M. Irshad, Z. Anwar, A. Afroz, N. Zeeshan, U. Rashid, K. Sughra, Advances in Lignocellulosic Biotechnology: A Brief Review on Lignocellulosic Biomass and Cellulases, Adv Biosci Biotechnol, Vol. 5, No. 3, 2014, pp. 246-251, <https://doi.org/10.4236/abb.2014.53031>.
- [3] D. Kracher, R. Ludwig, Cellobiose Dehydrogenase, An Essential Enzyme for Lignocellulose Degradation in Nature - a Review/Cellobiosedehydrogenase: Ein Essentielles Enzym Für den Lignozelluloseabbau in der Natur-Eine Übersicht, J. Environ, Manage, Vol. 67, No. 3, 2016, pp. 145-163, <https://doi.org/10.1515/boku-2016-0013>.
- [4] S. Souza, S. Melo, R. Oliveira, Ligninolytic Enzyme Production by Ganoderma spp, Enzyme. Microb, Technol, Vol. 37, No. 3, 2005, pp. 324-329, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.007>.
- [5] A. Dias, J. Matos, I. Fraga, A. Sampaio, M. Bezerra, An Easy Method for Screening and Detection of Laccase Activity, Open, Biotechnol, J, Vol. 11, 2017, pp. 89-93, <https://doi.org/10.2174/1874070701711010089>.
- [6] K. Murugesan, M. Kim, S. Chang, Effect of Metal Ions on Reactive Dye Decolorization by Laccase from *Ganoderma lucidum*, J. Hazard, Mater, Vol. 168, No. 1, 2009, pp. 523-529, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.075>.
- [7] D. Arora, M. Chander, K. Gill, Involvement of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase and Laccase in Degradation and Selective Ligninolysis of Wheat Straw, Int. Biodeterior,



- Biodegrad, Vol. 50, No. 2, 2002, pp. 115-120, [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00064-1).
- [8] D. Yanto, N. Auliana, S. Anita, T. Watanabe, Decolorization of Synthetic Textile Dyes by Laccase from Newly Isolated *Trametes hirsuta* EDN084 Mediated by Violuric Acid, *Earth, Environ, Sci*, Vol. 374, 2019, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/374/1/012005>.
- [9] I. Sudiana, I. Sastrawidana, I. Sukarta, Decolorization Study of Remazol Black B Textile Dye using Local Fungi of *Ganoderma* sp. and Their Ligninolytic Enzymes, *Environ, Sci, Technol*, Vol. 11, No. 1, 2018, pp. 16-22, <https://doi.org/10.3923/jest.2018.16.22>.
- [10] S. Kawai, T. Umezawa, T. Higuchi, Degradation Mechanisms of Phenolic  $\beta$ -1 Lignin Substructure Model Compounds by Laccase of *Coriolus versicolor*, *Arch, Biochem, Biophys*, Vol. 262, No. 1, 1988, pp. 99-110, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90172-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90172-5).
- [11] A. Leonowicz, N. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. W. Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, J. Rogalski, Fungal Laccase: Properties and Activity on Lignin, *J. Basic Microbiol*, Vol. 41, No. 3, 2001, pp. 185-227, [https://doi.org/10.1002/15214028\(200107\)41:3/4<185::aid-jobm185>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/15214028(200107)41:3/4<185::aid-jobm185>3.0.co;2-t).
- [12] V. Leo, A. Passari, I. K. Muniraj, S. Uthandi, A. Hashem, E. F. Abd\_Allah, A. A. Alqarawi, P. Singh, Elevated levels of Laccase Synthesis by *Pleurotus pulmonarius* BPSM10 and its Potential as a Dye Decolorizing Agent, *Saudi J. Biol. Sci*, Vol. 26, No. 3, 2019, pp. 464-468, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.006>.
- [13] G. V. Dinh, D. T. Quynh, D. H. Nghi, Screening Carbohydrate Esterase and Oxidase Enzyme from Fungi Isolated in Cuc Phuong (Ninh Binh) and Muong Phang (Dien Bien), *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> National Scientific Conference of Vietnam Museum System*, No. 57, 2021, pp. 470-479.
- [14] S. Sambrook, R. D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 2003.
- [15] D. Linke, H. Bouws, T. Peters, M. Nimtz, R. G. Berger, H. Zorn, Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and Cloning, *J. Agric, Food, Chem*, Vol. 53, No. 24, 2005, pp. 9498-9505, <https://doi.org/10.1021/jf052012f>.
- [16] M. Q. Ai, F. F. Wang, F. Huang, Purification and Characterization of a Thermostable Laccase from *Trametes trogii* and its Ability in Modification of Kraft Lignin, *J. Microbiol, Biotechnol*, Vol. 25, No. 8, 2015, pp. 1361-1370, <https://doi.org/10.4014/jmb.1502.02022>.
- [17] N. Garg, N. Bieler, T. Kenzom, M. Chhabra, M. A. Schumacher, S. Mishra, Cloning, Sequence Analysis, Expression of *Cyathus bulleri* Laccase in *Pichia pastoris* and Characterization of Recombinant Laccase, *BMC, Biotech*, Vol. 12, 2012, pp. 1-12, <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-75>.
- [18] Q. Song, X. Deng, R. Q. Song, Expression of *Pleurotus ostreatus* Laccase Gene in *Pichia pastoris* and its Degradation of Corn Stover Lignin, *Microorganisms*, Vol. 8, No. 4, 2020, pp. 601, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040601>.
- [19] L. Lu, T. N. Wang, T. F. Xu, J. Y. Wang, C. L. Wang, M. Zhao, Cloning and Expression of Thermo-alkali-stable Laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its Characterization, *Bioresour, Technol*, Vol. 134, 2013, pp. 81-86, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.015>.
- [20] S. Couto, A. Rodríguez, R. Paterson, R. Lima, J. Teixeira, Laccase Activity from the Fungus *Trametes hirsuta* using an Air-lift Bioreactor, *Lett, Appl, Microbiol*, Vol. 42, 2006, pp. 612-616, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01879.x>.