

PHÂN LOẠI VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH LACCASE CỦA CHỦNG XKDNP22 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ/DIOXIN

Nguyễn Thị Lan Anh, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Chủng xạ khuẩn XKDNP22 được phân lập trong lò xử lý tại sân bay Đà Nẵng thuộc dự án "Áp dụng công nghệ xử lý sinh học làm sạch đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Đà Nẵng" trong khuôn khổ hợp tác giữa chuyên gia viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa Học & Công Nghệ Việt Nam và Cục Bảo vệ môi trường Hoa Kỳ (USEPA). Chủng XKDNP22 sinh trưởng được trên môi trường có các chất độc như dịch chiết đất chứa chủ yếu đồng phân dioxin 2,3,7,8-TCDD, chất diệt cỏ (2,4,5-T, 2,4-D), TCD, DCP và pyrene và anthracene. Khuẩn lạc chủng XKDNP22 có màu trắng xám nhạt, hình tròn, khuẩn ty cơ chất màu vàng nhạt, bề mặt lồi. Bào tử chủng XKDNP22 có dạng hình quả trám, lõm hai mặt, được xếp thành chuỗi dài, cuống sinh bào tử phân nhánh. Dựa trên đặc điểm hình thái và so sánh trình tự gen 16S rRNA, chủng XKDNP22 được xếp vào chi *Streptomyces* và có tên là *Streptomyces* sp. XKDNP22. Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng xạ khuẩn này được đăng ký trên GenBank với mã số HQ10690. Chủng XKDNP22 được nuôi trên môi trường GauseM 1/5 có bổ sung 4 g dịch chiết malt, dịch chiết đất và nguồn nitrogen vô cơ KNO₃ lần lượt 5, 6 và 7 g/l cho hoạt tính enzyme laccase tương ứng là 4660, 4688 và 4421 U/l.

Từ khóa: Chất diệt cỏ/dioxin, dịch chiết malt, enzyme laccase, *Streptomyces*, 16S rRNA

MỞ ĐẦU

Enzyme ngoại bào laccase thuộc nhóm oxygen oxidoreductase, enzyme này chứa bốn nguyên tử đồng ở vị trí xúc tác. Enzyme laccase xúc tác quá trình oxy hóa khử nhiều hợp chất phenolic khác nhau, cũng như các diamine, và amin thơm, đồng thời khử oxy phân tử thành nước. Hơn thế nữa, với việc sử dụng các chất trung gian (mediator) những enzyme này có thể xúc tác phản ứng được với nhiều cơ chất. Laccase có mặt ở một số ít thực vật bậc cao, các loại nấm, và một số vi khuẩn. Laccase có nhiều tiềm năng để áp dụng trong công nghệ sinh học và trên vọng cao tiêu thụ trên thị trường. Laccase có thể ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp (Kiskinen *et al.*, 2004).

Trong mười năm qua, laccase đã nhận được rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới, bởi khả năng oxy hóa mạnh cả hợp chất phenolic lẫn hợp chất không phenolic, cũng như các chất ô nhiễm bền vững trong môi trường. Laccase được sử dụng để xử lý nước thải ô nhiễm từ các quá trình sản xuất giấy, vải sợi, công nghiệp dệt nhuộm... Laccase có vai trò quan trọng tham gia vào quá trình phân hủy các hợp chất độc ô nhiễm mạch vòng như PAHs, dioxin, DDT, HCH và TNT v.v. (Nyanhongo *et al.*, 2002). Vì thế, laccase là một

trong những enzyme có nhiều tiềm năng nhất được ứng dụng để tẩy độc đất bị ô nhiễm. Gần đây đã xuất hiện các nghiên cứu về khả năng sinh laccase phân hủy dioxin được công bố. Sinpong đã phân lập được các chủng nấm *Trametes* sp. E15, *Polyporus* sp. E109, và đồng tác giả *Nigroporus* sp. 119 có khả năng phân hủy trên 90% 2,8-DCDD (2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin) sau 30 ngày. Chủng nấm *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249 phân hủy 25,68 ± 1,2% DDT sau 15 ngày nuôi cấy. Ở Việt Nam, Đặng Thị Cẩm Hà và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu xử lý các lô đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin bằng phương pháp phân hủy sinh học (kích thích sinh học) ở các qui mô từ 0,5 đến 100m². Sau 2 năm xử lý, 50-70% tổng độ độc đã giảm (Dang TCH *et al.*, 2007). Trong nghiên cứu của phòng thí nghiệm nơi chúng tôi làm việc cho thấy nhiều vi sinh vật, bao gồm cả nấm sợi, xạ khuẩn và vi khuẩn có khả năng sinh laccase và các enzyme ngoại bào khác. Các enzyme này đều có khả năng phân hủy chất diệt cỏ/dioxin và PAH và các thuốc nhuộm khác nhau.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn sinh enzyme ngoại bào laccase và đánh giá khả năng phân hủy một số các chất ô nhiễm, đồng thời nghiên cứu các yếu tố môi trường nhằm nâng cao khả năng sinh laccase đã được thực hiện. Các kết quả thu được là

minh chứng cho sự thành công của công nghệ phân hủy chất diệt cỏ/dioxin. Các vi sinh vật sinh enzyme ngoại bào laccase sẽ là nguồn nguyên liệu quý cho công nghệ sinh học xử lý ô nhiễm môi trường đối với các chất hữu cơ khó phân hủy (POP) và các chất đa vòng thơm ô nhiễm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập xạ khuẩn

Từ đất ở các công thức khác nhau của các lô xử lý đất nhiễm nặng chất diệt cỏ/ dioxin bằng công nghệ phân hủy sinh học trong khuôn khổ của dự án hợp tác Việt Nam - Hoa Kỳ đã phân lập xạ khuẩn bằng phương pháp làm giàu 3 lần trên môi trường Gause 1/5 chứa dịch chiết đất chứa dioxin (DCĐ) và các chất ô nhiễm khác như 2,4,5-T; 2,4-D; TCD; DCP và PAHs. Các khuẩn lạc xạ khuẩn được tách sạch, kiểm tra khả năng sinh trưởng và phát triển trên các môi trường khác nhau.

Môi trường Gause 1/5

Thành phần môi trường Gause 1/5 như sau: KNO₃ 2,6 g/l, MgSO₄ 0,45 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, Na₂HPO₄ 0,56 g/l, NaCl 1 g/l, K₂HPO₄ 0,1 g/l, FeSO₄ 0,002 g/l, tinh bột 4 g/l.

Môi trường GauseM 1/5

Thành phần cơ bản giống môi trường Gause 1/5 nhưng thay tinh bột thành dịch chiết malt.

Sử dụng 25 ml môi trường Gause 1/5 có bổ sung 1ml DCĐ được chuẩn đến pH 6,8; nuôi ở nhiệt độ 30°C, 200 vòng/phút. Xác định hoạt tính laccase sau mỗi ngày nuôi cấy.

Hình thái bào tử

Chủng XKDNP22 đã được nuôi cấy trên môi trường Gause 1/5 có chứa dịch chiết đất và quan sát hình thái bào tử bằng kính hiển vi điện tử quét SEM JEOL 5410 LV với độ phóng đại 15000 lần.

Phân loại phân tử chủng XKDNP22

Tách chiết DNA tổng số, xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA theo Reyes (Reyes *et al.*, 1998). Sử dụng cặp mồi 341F 5'- ACTCCTACGGGAGG CAGCAG -3' và 907R 5'- CCGTCAATTCCTT AGTTT -3' để nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA của XKDNP22 bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR được làm sạch bởi kit QIAquick (Qiagen). Trình tự nucleotide được phân tích trên máy đọc tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer tại Phòng thí

nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên các phần mềm ClustalX1.83, Bioedit, GenCod, TreeView X. Trình tự đoạn gen 16S rRNA đã được đăng kí trên GenBank.

Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào laccase

Hoạt độ của laccase trong dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn được xác định bằng sự tăng độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 420 nm (Lei *et al.*, 2007).

Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1 μ M sản phẩm từ ABTS trong thời gian 1 phút, ở điều kiện thí nghiệm ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Childs, Bardsley, 1975).

Nghiên cứu ảnh hưởng một số yếu tố môi trường đến sự phát triển và sinh laccase của chủng XKDNP22 đã được thực hiện như sau:

Môi trường Gause 1/5 đã được sử dụng với các nguồn carbon là tinh bột, saccharose, glucose, maltose, lactose, malt extract với nồng độ 4 g/l. Các nguồn nitrogen vô cơ và nitrogen hữu cơ là KNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, cao thịt, pepton, đậu tương tại nồng độ nitrogen trong môi trường nuôi cấy là 2,6 g/l, nồng độ malt extract được khảo sát từ 2 - 25 g và nồng độ KNO₃ từ 0,5 - 10 g đã được sử dụng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn

Từ đất trong các lô đang xử lý khử độc bằng công nghệ sinh học tại sân bay Đà Nẵng, trên môi trường Gause 1/5 có chứa DCĐ, 4 chủng xạ khuẩn đã được phân lập và đặt tên lần lượt là: XKDNP20, XKDNP21, XKDNP22 và XKDNP23.

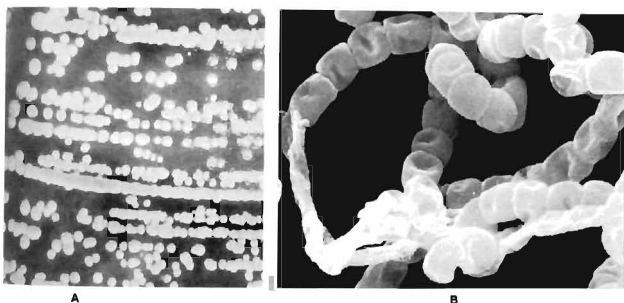
Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy cả 3 chủng XKDNP20, XKDNP21, XKDNP22 đều sinh laccase cao nhất theo thời gian nuôi cấy khác nhau. Tuy nhiên, chủng XKDNP22 sinh tổng hợp laccase cao hơn cả so với 2 chủng cùng nghiên cứu với hoạt độ 640 U/l. Vì vậy, chủng XKDNP22 đã được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng XKDNP22

Khẩn lạc chủng XKDNP22 tròn, khi non có màu trắng, khi già khuẩn lạc có màu xám dần, bề mặt lồi, khuẩn ty cơ chất màu vàng nhạt (Hình 1A). Bào tử của XKDNP22 có hình quả trám, lõm hai mặt, xếp thành chuỗi dài, cuống sinh bào tử phân nhánh (Hình 1B).

Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc và hoạt tính laccase của các chủng xạ khuẩn

Tên chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hoạt tính enzyme laccase cao nhất (U/l)	Thời gian nuôi cấy (ngày)
XKDNP20	Khuẩn lạc màu xám, tròn, khuẩn ty cơ chất màu trắng, bề mặt khuẩn lạc lồi, có sinh giọt tiết màu trắng.	103	5
XKDNP21	Khuẩn lạc màu xám, tròn, khuẩn ty cơ chất màu trắng, bề mặt lồi, khô	3,7	3
XKDNP22	Khuẩn lạc lúc đầu có màu trắng, sau trắng xám nhạt, tròn, khuẩn ty cơ chất màu vàng nhạt, bề mặt lồi.	640	2
XKDNP23	Khuẩn lạc màu xám đậm, tròn, khuẩn ty cơ chất màu trắng, bề mặt lồi, khô.	Không có	5



Hình 1. (A) Hình thái khuẩn lạc (B) Hình thái cường sinh bào tử của chủng XKDNP22 dưới kính hiển vi điện tử quét SEM JEOL 5410 LV với độ phóng đại 15000 lần

Phân loại bằng xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA

Xét theo những đặc điểm hình thái mô tả ở trên, chủng xạ khuẩn XKDNP22 có thể thuộc chi *Streptomyces*. Để khẳng định giả thiết này nghiên cứu phân loại XKDNP22 được tiến hành bằng kỹ thuật xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA.

DNA tổng số của chủng XKDNP22 đã được tách chiết theo phương pháp của Reyes (Reyes *et al.*, 1998) và sử dụng cặp mồi 341F và 907R cho phản ứng PCR để nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng XKDNP22. Sản phẩm PCR đặc hiệu đã được làm sạch và xác định trình tự. Sản phẩm PCR nhân

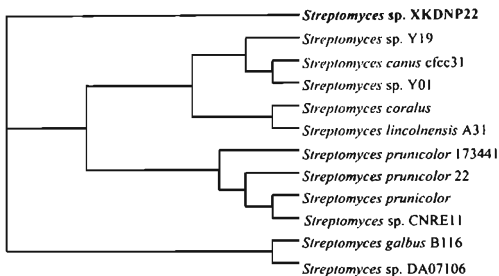
đoạn gen mã hóa 16S rRNA dài 534 bp.

Sơ sánh trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng XKDNP22 với trình tự một số vi sinh vật nhân sơ (Prokaryote) đã được công bố trên GenBank cho thấy chủng XKDNP22 có quan hệ gần gũi với các loài thuộc chi *Streptomyces* (Hình 2).

Chủng XKDNP22 có độ tương đồng cao 100% với các chủng *Streptomyces* sp. Y19(2010), *Streptomyces canus* cfcc31, *Streptomyces* sp. Y01(2010), *galbus* B116, *Streptomyces* sp. DA07106.v.v. Theo một số nghiên cứu đã được công bố thì chủng *Streptomyces* spp., chủng *Streptomyces canus* và chủng *Streptomyces galbus*

cũng có khả năng sinh laccase (Arias *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2008; Kuznetsov *et al.* 1984). Riêng chủng *Streptomyces* spp. còn có khả năng sinh tổng hợp một số enzyme khác như peroxidase, ligninolytic và polyphenol oxidase (Sivakumar *et al.*, 2004). Dựa vào các đặc điểm hình thái và so

sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng XKDNP22 được xếp vào chi *Streptomyces* và được đặt tên là *Streptomyces* sp. XKDNP22. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng xạ khuẩn XKDNP22 được đăng kí trên GenBank với mã số HQ10690.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKDNP22.

Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sự phát triển và khả năng sinh laccase của chủng XKDNP22

Khả năng sinh enzyme ngoại bào laccase phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó có thành phần môi trường, đặc biệt là nồng độ nitrogen, carbon, thời gian nuôi cấy, sự có mặt và nồng độ các chất cảm ứng như Cu^{2+} , veratryl alcohol (VA), gallic acid, catechol, hydroxybenzoic acid, vanillin, pH... Chính vì vậy có rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra tiềm năng nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp laccase bằng sự chọn lọc các điều kiện môi trường thích hợp.

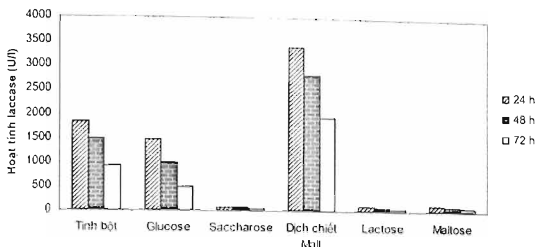
Ảnh hưởng của các nguồn carbon đến khả năng sinh laccase

Các hợp chất carbon vừa là nguồn dinh dưỡng vừa là năng lượng cung cấp năng lượng cho cơ thể. Vì sinh vật nói chung và xạ khuẩn nói riêng có khả năng sử dụng nhiều nguồn carbon khác nhau. Để lựa chọn được nguồn carbon thích hợp thì tinh bột trong môi trường Gause 1/5 được thay thế lần lượt bằng 5 nguồn carbon khác nhau. Cứ sau 24, 48 và 72 h xác định hoạt tính enzyme trong dịch nuôi cấy đã được

xác định và kết quả được trình bày ở hình 3.

Chủng xạ khuẩn XKDNP22 có khả năng sử dụng cả 6 nguồn carbon. Tuy nhiên, ảnh hưởng của các nguồn carbon này lên sự sinh trưởng và sinh enzyme ngoại bào laccase của chủng XKDNP22 không giống nhau. Trên môi trường chứa dịch chiết malt, chủng XKDNP22 sinh hoạt tính enzyme cao nhất là 3397 U/l và thấp nhất là đường saccharose với hoạt tính chỉ đạt 77 U/l sau một ngày nuôi cấy (Hình 3).

Một số loài đã được công bố như *Pleurotus* *ous*, *Schizophyllum commune* Fr. (Adejoye *et al.*, 2009) lại sinh laccase cao trên môi trường có nguồn carbon là lactose. Ngoài ra *Trichoderma viride* và *Trichoderma longibratriatum* sinh tổng hợp laccase rất tốt trên nguồn glucose và saccharose (Verma *et al.*, 2005). Trong khi đó chủng *Aspergillus* sp. FNA phân lập từ đất nhiễm DDT lại chỉ sinh laccase cao nhất trên nguồn saccharose (Đào Thị Ngọc Ánh, 2009). Chủng XKDNP22 cũng sinh enzyme khá cao trên môi trường Gause 1/5 với nguồn carbon là tinh bột và đường glucose. Do vậy, dịch chiết malt đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

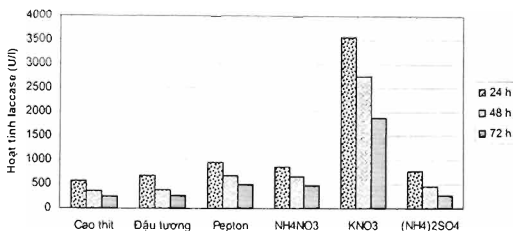


Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sự sinh tổng hợp laccase.

Ảnh hưởng của các nguồn nitrogen đến khả năng sinh enzyme laccase

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitrogen trong môi trường GauseM 1/5, KNO_3 được thay

thế lần lượt bằng các nguồn khác nhau NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, cao thịt, đậu tương và pepton. Cứ sau 24, 48 và 72 h xác định hoạt tính enzyme trong dịch nuôi cấy đã được đo và kết quả thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên sự sinh tổng hợp laccase.

Từ kết quả hình 4 cho thấy chủng nghiên cứu sinh laccase cao nhất sau 24 h nuôi cấy, với nguồn nitrogen là KNO_3 hoạt độ enzyme đo được là 3569 U/l. Hoạt tính enzyme laccase do XKDNP22 sinh tổng hợp với các nguồn nitrogen vô cơ và hữu cơ khác nhau. Đối với nguồn nitrogen hữu cơ, hoạt tính laccase đo được cao nhất trong môi trường có chứa nitrogen là pepton đạt 944 U/l. Chủng *Pleurotus*

eous (Shanmugam *et al.*, 2008), *ostreatus* 32 (Hou *et al.*, 2004), *Trametes pubescens* MB 89 (Galhaup *et al.*, 2002) có hoạt tính laccase cao cũng trên nguồn nitrogen hữu cơ là pepton. Hoạt tính laccase của chủng XKDNP22 giảm lần lượt là 579 U/l và 691 U/l khi nguồn nitrogen là đậu tương và cao thịt (Hình 4). Với nguồn nitrogen vô cơ, hoạt tính laccase đo được cao nhất ở môi trường sử dụng

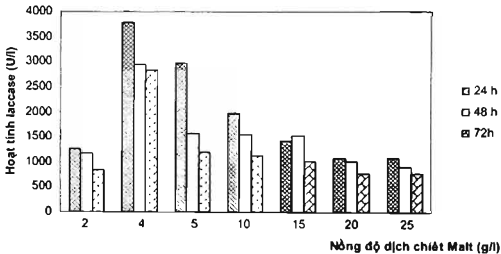
KNO_3 là 3569 U/l. Như vậy KNO_3 thích hợp cho sự sinh tổng hợp laccase bởi chủng XKDNP22. Theo các nghiên cứu đã được công bố, chủng *Streptomyces lavendulae* lại sinh laccase cao trên môi trường có nguồn nitrogen là $(NH_4)_2SO_4$ (Jing, 2010). Trái ngược với chủng *Schizophyllum commune* HP-1 (Patel et al., 2009), các nguồn nitrogen vô cơ là $NaNO_3$ và $(NH_4)_2SO_4$ sinh hoạt tính laccase thấp hơn so với nguồn nitrogen hữu cơ là pepton và cao men. Như vậy, mỗi vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme laccase tốt nhất trên môi trường chứa các nguồn nitrogen khác nhau.

Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết malt lên khả năng sinh laccase

Trong nghiên cứu này chủng XKDNP22 được nuôi cấy trên môi trường GauseM 1/5 với các nồng độ dịch chiết malt khác nhau và sau mỗi ngày nuôi cấy xác định hoạt tính laccase và kết quả thể hiện

trên hình 5.

Hoạt lực laccase cao nhất ở ngày thứ 1 (Hình 5). Ở nồng độ dịch chiết malt 4 g/l chủng XKDNP22 cho hoạt tính cao nhất là 3772 U/l và ở 5 g malt/lít hoạt tính enzyme giảm xuống đến 2953 U/l (Hình 5). Nồng độ dịch chiết malt tăng từ 10 đến 25 g/l thì hoạt tính enzyme giảm theo tỉ lệ thuận. Dịch chiết malt đóng vai trò quan trọng và ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp laccase bởi vì sinh vật. Vì vậy trong nhiều nghiên cứu và cùng trong nghiên cứu này dịch chiết malt đã được sử dụng để tạo ra laccase phục vụ các nghiên cứu cơ bản và các nghiên cứu ứng dụng. Chủng *Streptomyces lavendulae* cho hoạt tính laccase cao ở nồng độ dịch chiết malt là 21,21 g/l (Jing, 2010), còn chủng *Polyporus* sp. sinh hoạt tính laccase cao ở nồng độ là 20 g/l (Li et al., 2010). Qua các minh chứng trình bày ở trên cho thấy mỗi chủng vi sinh vật sinh enzyme laccase cao ở trên môi trường có nồng độ và các nguồn carbon khác nhau.



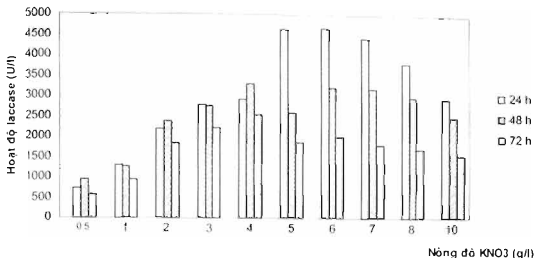
Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết malt lên hoạt tính laccase

Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến khả năng sinh laccase

Sau khi khảo sát nguồn nitrogen, KNO_3 được chọn để nghiên cứu nồng độ thích hợp. Vì vậy nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nitrogen vô cơ KNO_3 lên khả năng sinh laccase của chủng XKDNP22 đã được tiến hành. XKDNP22 được nuôi trong môi trường GauseM 1/5 có bổ sung dịch chiết đất, nồng độ KNO_3 từ 0,5 g/l đến 10 g/l và kết quả được trình bày ở hình 6.

Hoạt tính laccase tăng dần theo chiều tăng của nồng độ KNO_3 . Hoạt lực cao nhất đã phân tích được ở

nồng độ 5, 6, 7 g/l và giảm dần ở nồng độ 8, 10 g/l sau 24 h nuôi cấy (Hình 6). Kết quả này chứng tỏ chủng XKDNP22 sinh enzyme cao trên môi trường giàu nguồn nitrogen vô cơ. Đối với chủng *Schizophyllum commune* (Fr.) với nồng độ $(NH_4)_2SO_4$ và $NaNO_3$ là 10 g/l chúng nghiên cứu cho hoạt tính laccase thấp hơn so với nguồn nitrogen là pepton và cao men (Adejoye et al., 2009). Ngược lại, chủng *Streptomyces lavendulae* sinh tổng hợp laccase cao trên môi trường có nồng độ $(NH_4)_2SO_4$ là 20,9 g/l (Jing, 2010). Qua nghiên cứu ảnh hưởng của KNO_3 một lần nữa khẳng định rằng mỗi chủng vi sinh vật sinh laccase cao ở trên môi trường có nồng độ và các nguồn nitrogen khác nhau.



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ KNO₃ lên khả năng sinh tổng hợp laccase

KẾT LUẬN

Bốn chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ các lô xử lý sinh học tẩy độc chất diệt cỏ/dioxin hợp tác với Cục Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ được đặt tên lần lượt là XKDNP20, XKDNP21, XKDNP22 và XKDNP23. Trong đó có 3 chủng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào laccase là XKDNP20, XKDNP21, XKDNP22.

Chủng XKDNP22 có khuẩn lạc tròn, bề mặt lồi, khuẩn ty cơ chất màu vàng nhạt. Dựa trên đặc điểm hình thái và so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng XKDNP22 thuộc chi *Streptomyces* và được đặt tên là *Streptomyces* sp. XKDNP22. Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng xạ khuẩn này được đăng ký trên GenBank với mã số HQ10690.

Chủng XKDNP22 sinh laccase có hoạt lực cao nhất đạt 4688 U/l trên môi trường chứa dịch chiết malt có nồng độ là 4 g/l và nồng độ KNO₃ là 6 g/l. Trên môi trường GauseM 1/5 có chứa nồng độ nitrogen KNO₃ là 5 và 7 g/l thì chủng xạ khuẩn này cũng sinh laccase cao với hoạt độ lần lượt là 4660 và 4421 U/l.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài độc lập cấp Nhà nước "Nghiên cứu công nghệ sản xuất enzyme ngoại bào laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase (MnP, LiP) từ vi sinh vật phục vụ xử lý các chất ô nhiễm đa vòng thơm", và đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. "Nghiên cứu và xác định

enzyme LiP, MnP và Laccase từ vi sinh vật phân hủy các hợp chất hữu cơ bền vững và các hợp chất vòng thơm ô nhiễm khác". Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học trong việc xác định trình tự gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adejaye OD, Adebayo-Tayo BC, Ogunjobi AA, Afolabi O (2007) Physicochemical studies in *Schizophyllum commune* (Fries) a Nigerian Edible fungus *W Appl Sci J* 2(1): 73-76.
- Anas M E, Arenas M, Rodriguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernandez M (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT3335 *Appl Environ Microbiol* 69: 1953-1958.
- Childs R, Bardsley W (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* 145: 93-103.
- Dang TCH, Nguyen BH, Nghiem NM, Nguyen NQ, Tran NH, Dam TH, Nguyen TT, Nguyen NB (2007) Application of bioremediation technology for detoxification of herbicide/dioxin and DDT contaminated soils *Minist Ecol Nat Resour* 9: 270-274.
- Debing J (2010) Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. *Bioresour Technol* 19: 7592-7597
- Đào Thị Ngọc Ánh (2009) Nghiên cứu phân loại, khả năng phân hủy DDT và sinh laccase của chủng nấm sợi phân lập

từ đất ô nhiễm hỗn hợp thuốc trừ sâu. *Luận văn thạc sĩ sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.*

Eggert C, Temp U, Eriksson KE (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 4(62): 1151-1158.

Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D (2002) Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enz Microb Technol* 30: 529-536.

Hardik P, Akshaya G, Shilpa G (2009) Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResour* 4(1): 268-284.

Hongman H, Jiti Z, Jing W, Cuihong D, Bin Y (2004) Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Proc Biochem* 39(11): 1415-1419.

Kiiskinen L, Kristiina K, Michael B, Erkkö Y, Matti S, Markku S (2004) Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiol* 150: 3065-3074.

Kuznetsov VD, Filippova SN, Rybakova AM (1984) Nature of the brown pigment and the composition of the phenol oxidases of *Streptomyces galbus*. *Microbiol* 53: 193-197.

Lei L, Min Z, Yan W (2007) Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *W J Microbial Biotechnol* 23: 159-166.

Li QG, Shuo XL, Xi BZ, Zi RH, Jun FL (2010) Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus. *W J Microbial Biotechnol* 27(3): 731-735.

Mausam Verma, Satinder K, Brar RD, Tyagi JR, Valéro.

Surampalli RY (2005) Wastewater sludge as a potential raw material for antagonistic fungus (*Trichoderma* sp.): Role of pre-treatment and solids concentration. *Water Resear* 15(39): 3587-3596.

Min Z, Lin Z, Wei W, Chuanping Y (2008) Study on the oxidative system examination and laccase production of wood decay fungus. *J Biotechnol* 136: 326-327.

Nyanhongo GS, Gomes J, Göbitz G, Zvaunya Z, Read JS, Steiner W (2002) Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresour Technol* 3(84): 259-263.

Oluseyi DA, Isola OF (2009) Effect of cultural conditions on biomass and laccase production in submerged medium by *Schizophyllum commune* (FR.), a Nigerian edible mushroom. *Elec J Environ Agric Food Chem* 8(11): 1186-1193.

Patricio PZ, Claudia MP, Elaine LT, Sandra GM, Maria AR, Rosana C (2003) Minussi, Nelson Durán Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Prog Polym Sci* 28: 1015-1048.

Premjet S, Bunthong O, Tachibana S, Premjet D (2009) Screening of Fungi from Natural Source in Thailand for Degradation of Polychlorinated Hydrocarbons. *Amer-Eura J Agric Environ Sci* 5(4): 466-472.

Sivakumar U, Kalaichelvan G, Ramasamy K (2002) Increased Production of Laccase and Associated Ligninolytic Enzymes. *Biotechnol Lett* 17(24): 1437-1442.

Sivakumar U, Kalaichelvan G, Ramasamy K (2004) Protoplast fusion in *Streptomyces* sp. for increased production of laccase and associated ligninolytic enzymes. *W J Microbial Biotechnol* 6(20): 563-568.

Vahidi H, Kobarfard F, Nawjooyan F (2004) Effect of cultivation conditions on growth and antifungal activity of *Mycena leptocephala*. *Afric J Biotechnol* 11(3): 606-609

CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF LACCASE ACTIVITY IN ACTINOMYCES XKDNP22 STRAIN ISOLATED FROM DETOXIFIED PILOTS OF HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL

Nguyen Thi Lan Anh, Dang Thi Cam Ha*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Actinomycete strain XKDNP22 was isolated from aerobic plots for detoxification by bioremediation of heavily contaminated herbicide/ dioxin soil at Da Nang former military base in frame of cooperation between Vietnamese and US EPA scientists. XKDNP22 strain grew in medium GauseM 1/5 containing soil extract liquid which contains mainly 2,3,7,8 -TCDD congener, herbicides (2,4,5-T; 2,4-D), TCD, DCP and PAHs.

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38360892; Fax: 84-4-38363144; E-mail: clangcha80@yahoo.com

Colonies of XKDNP22 have light gray, a round shape, firm substrate bacteria pale yellow, convex surface. Their spores look like variety of canarium with sunken sides and arranges string form. Based on morphological characteristics and comparison of a partial sequence of 16S rRNA gene, XKDNP22 strain was classified in *Streptomyces* genus, and named *Streptomyces* sp. XKDNP22. A partial sequence of 16S rRNA gene (534bp) of *Streptomyces* sp. XKDNP22 was deposited in the Genbank database with accession number is HQ10690. The laccase activity from *Streptomyces*.sp XKDNP22 is 4660, 4688 and 4421 U/l in GauseM 1/5 medium containing 4 g malt, soil extracts and KNO₃, as nitrogen source varied 5, 6 and 7 g/l, respectively.

Keywords: Herbicide/dioxin, Laccase enzyme, Malt extract, *Streptomyces*, 16S rRNA gene